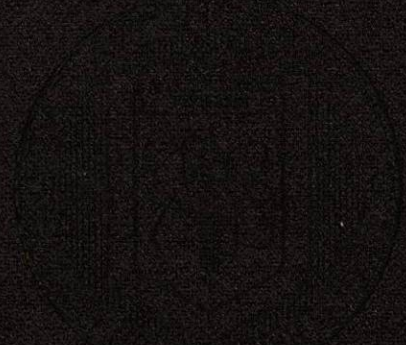


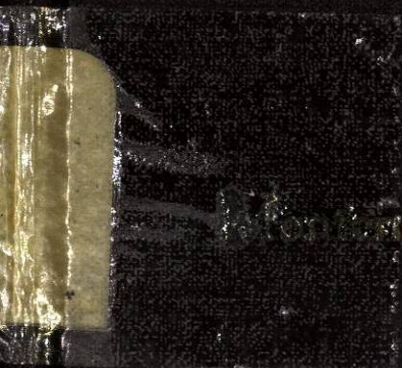
UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY  
130 St. George Street, 4th Floor  
Toronto, Ontario M5S 1A5



UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY  
130 St. George Street, 4th Floor  
Toronto, Ontario M5S 1A5

UNIVERSITY OF TORONTO  
LIBRARY  
130 St. George Street, 4th Floor  
Toronto, Ontario M5S 1A5

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY  
130 St. George Street, 4th Floor  
Toronto, Ontario M5S 1A5



UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY  
130 St. George Street, 4th Floor  
Toronto, Ontario M5S 1A5

T  
RC280  
.U8  
G6  
c.1



1080074987

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.

DETECCION DE SECUENCIAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16  
EN CARCINOMA CERVICOUTERINO HUMANO.

TESIS

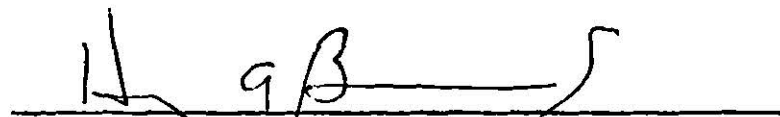
QUE EN OPCION AL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

MANUEL LEONARDO GONZALEZ GARAY.

DIRECTOR DE TESIS

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'H. A. B. S.', is written over a horizontal line.

DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA.

MONTERREY, N. L.

ABRIL DE 1988.

T  
PC220  
.U8  
68



(74987)

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.

DETECCION DE SECUENCIAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16  
EN CARCINOMA CERVICOUTERINO HUMANO.

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

MANUEL LEONARDO GONZALEZ GARAY.

COMISION DE TESIS:

PRESIDENTE:



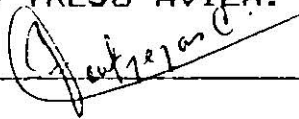
Q.B.P. y M. C. DIANA RESENDEZ PEREZ.

SECRETARIO:



DRA. LAURA TREJO AVILA.

VOCAL:



Q.B.P. JUAN F. CONTRERAS CORDERO.

MÓNTERREY, N. L.

ABRIL DE 1988.

## DEDICATORIA

En recuerdo al Dr. José Eleuterio González a los cien años de su fallecimiento.

A mi madre, Nora Garay, mujer ejemplar digna de admiración.

A una mujer muy especial Gabriela Cárdenas.

A mis amigos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina de la U. A. N. L. por todas las facilidades otorgadas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de este trabajo y por la beca tesis que me fué otorgada.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña por su valiosaa asesoría.

Al Dr. Juan Francisco González por su constante apoyo y asesoría.

Al Dr. Patricio Gariglio por su asesoría y por permitirme la estancia en su laboratorio.

Al Maestro en Ciencias Ramiro Ramírez por su valiosa ayuda durante el presente trabajo.

A los residentes del departamento de Ginecología y Obstetricia por su constante ayuda en la obtención de biopsias.

Por su contribución crítica a la composición final de este escrito, a la Maestra en Ciencias Diana Reséndez Pérez, a la Q.B.P. Julie B. Silva, a la Dra. Herminia Martínez, al Q.F.B. Diego E. Rincón, al Biol. Alfredo Varela E. y a la Dra. Laura Trejo.

Por su contribución a la composición artística de este trabajo a la Arq. Minerva Cárdenas, a el Dr. Antonio Luna y a los Biólogos Eduardo Estrada y Alfredo Varela.

A los Drs. Jesús Valdes y Alejandro García por sus valiosos consejos.

A los M.C. Edmundo Rodríguez, Luis Salazar, Oscar Briones y a los Drs. Ulises Adame y Jesús Valdes por el hospedaje durante mi estancia en México.

A los miembros del laboratorio del Dr. Patricio Gariglio.

A los miembros de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas.



## INDICE

	PAGINA
LISTA DE ABREVIATURAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iv
AREA DE TRABAJO .....	v
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCION .....</b>	<b>3</b>
<b>III. HIPOTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>V. MATERIAL</b>	
A. ORIGEN DE REACTIVOS .....	21
B. MATERIAL BIOLÓGICO .....	22
<b>VI. METODOS.</b>	
A. PREPARACION DE LA SONDA.	
1. Caracterización y Purificación del plásmido pHPV-16.	
a. Minipreparaciones de plásmidos .....	23
b. Electroforesis en geles de agarosa .....	26
c. Cinética enzimática con DNA de plásmidos .....	26
d. Digestion de DNA de plasmidos .....	27
e. Preparación de plásmidos a gran escala .....	27
2. Marcaje del plásmido.	
a. Marcaje radiactivo del plásmido .....	29
b. Medición de la radiactividad .....	29
c. Marcaje con biotina del plásmido .....	30

## B. OBTENCION Y ANALISIS DE DNA GENÓMICO.

1.	Comparación de métodos para la purificación de leucocitos.	
a.	Método de Ficoll Hypaque .....	30
b.	Método de sedimentación .....	32
c.	Método de choque osmótico .....	32
d.	Evaluación de los métodos .....	32
2.	Aislamiento de DNA.	
a.	Homogenización de tejidos .....	33
b.	Extracción fenólica .....	33
3.	Digestión del DNA genómico con endonucleasas de restricción.	
a.	Cinética con endonucleasas de restricción de DNA genómico .....	34
b.	Digestión del DNA genómico con endonucleasas de restricción .....	34

## C.- HIBRIDIZACIONES DE DNA EN FILTROS.

1.	Técnica directa.	
	Dot blot en papel de nylon .....	35
2.	Transferencia de DNA en gel a filtros por la técnica de Southern.	
a.	Experimento de número de copias .....	39
b.	Preparación del gel para transferencia a membrana de nylon .....	39
c.	Preparación de gel para transferencia a nitrocelulosa .....	40
d.	Transferencia a membranas .....	40
3.	Hibridización molecular.	
a.	Prehibridización e hibridización en filtro de nylon .....	41

b.	Prehibridización e hibridización en filtro de nitrocelulosa .....	41
c.	Lavado del filtro .....	42
d.	Preparación de filtro para rehibri- dización nylon .....	42
4.	Detección de híbridos.	
a.	Autoradiografía .....	43
b.	Reacciones cromogénicas .....	43

## VII. RESULTADOS.

A.	MARCAJE DE LA SONDA .....	45
B.	OBTENCION Y ANALISIS DEL DNA GENOMICO .....	49
C.	DETECCION DE GENES.	
1.	Evaluación de métodos para detectar secuencias génicas .....	55
2.	Presencia del genoma de HPV-16 en carcinomas cervicouterinos	
a.	Técnica directa .....	55
b.	Técnica de Southern .....	60

## VIII. DISCUSION.

A.	MARCAJE DE LA SONDA .....	76
B.	OBTENCION Y ANALISIS DEL DNA GENOMICO .....	76
C.	DETECCION DE GENES.	
1.	Evaluación de métodos para detectar secuencias génicas .....	78
2.	Presencia del genoma de HPV-16 en carcinomas cervicouterinos .....	79

IX.	CONCLUSIONES .....	83
-----	--------------------	----

X.	CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS .....	84
----	-------------------------------------	----

XI.	LITERATURA CITADA .....	86
-----	-------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

X	Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo.
M	Concentración Molar
mM	Concentración milimolar
N	Concentración Normal
g	Gramos
mg	Miligramos
ug	Microgramos
ng	Nanogramos
l	Litros
ml	Mililitros
ul	Microlitros
h	Horas
min	Minutos
xg	x número de veces la fuerza de gravedad
pH	Logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno.
pb	Pares de bases
Kpb	Kilopares de bases
°C	Grados centígrados
v	Voltios
HPV	Papiloma virus humano
CIS	Carcinoma <u>in situ</u>
CaCU	Carcinoma cervico uterino
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical, una denominación que abarca todos los grados de displasia desde la leve hasta el carcinoma <u>in situ</u> .
tm	Temperatura media de hibridización
uCi	Microcurie.
DNA	ácido desoxiribonucleico.
RNA	ácido ribonucleico.

## LISTA DE FIGURAS

		PAGINA
Figura # 1.	Mapa de restricción del papiloma virus humano tipo 16 .....	12
Figura # 2.	Purificación y caracterización del plásmido PHPV-16 .....	24
Figura # 3.	Método de Translación de la muesca .....	25
Figura # 4.	Evaluación de tres métodos para recuperar leucocitos de sangre periférica requeridos en el aislamiento de DNA genómico .....	31
Figura # 5.	Análisis de varios métodos para detectar secuencias génicas .....	36
Figura # 6.	Metodología utilizada para la detección de papilomavirus humano en cáncer cervicouterino .....	37
Figura # 7.	Aparato utilizado en la técnica de "Dot Blot" .....	38
Figura # 8.	Patrones esperados de las dos posibles configuraciones del plásmido PHPV-16 al ser digeridas con <u>Hinc II</u> y <u>Eco RI</u> .....	46
Figura # 9.	Análisis del DNA de PHPV-16 por digestiones con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa .....	47
Figura # 10.	Resumen de los patrones de restricción del plásmido PHPV-16 .....	48
Figura # 11.	Comportamiento electroforético de DNAs genómicos sin digerir .....	53
Figura # 12.	Perfil de absorbancia en el rango de luz ultravioleta de una muestra de DNA .....	54
Figura # 13.	Experimento para determinar los niveles inferiores de detección de la técnica de Southern usando <sup>32</sup> P .....	57
Figura # 14.	Experimento para determinar los niveles inferiores de detección de la técnica de Southern usando peroxidasa .....	58

Figura # 15.	Experimento para determinar los niveles inferiores de detección de la técnica de Southern usando fosfatasa alcalina .....	59
Figura # 16.	Análisis de muestras de DNAs genómicos por la técnica de "Dot Blot" .....	61
Figura # 17.	Actividades de las endonucleasas de restricción <u>Eco</u> RI y <u>Pst</u> I determinadas por cinéticas enzimáticas .....	62
Figura # 18.	Cinética enzimática con DNA genómico .....	63
Figura # 19.	Perfil electroforético de los DNAs genómicos digeridos con <u>Eco</u> RI .....	65
Figura # 20.	Técnica de Southern para la detección de HPV-16 practicada con membranas de nylon .....	66
Figura # 21.	Técnica de Southern para la detección de HPV-16 usando membranas de nitrocelulosa y diferentes condiciones de lavado.	
	A.- Tumores cervicales, T1 a T10 .....	67
	B.- Nueve tumores cervicales y uno vulvar .....	68
	C.- Diez muestras de tejido cervical .....	69
Figura # 22.	Análisis por la técnica de Southern de los DNAs digeridos con <u>Pst</u> I, positivos para HPV .....	70
Figura # 23.	Resumen gráfico de los resultados obtenidos en la detección de HPV en las muestras cervicales .....	73

## LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla # 1.	Comparación de la incidencia de cáncer en la mujer de diversos Países .....	4
Tabla # 2.	Diferencia en la mortalidad por cáncer cervicouterino entre las mujeres de diferentes clases sociales en Inglaterra .....	5
Tabla # 3.	Disminución en la mortalidad por cáncer cervicouterino en varios países durante 1950-1960 .....	7
Tabla # 4.	Porcentaje de papilomavirus tipo 16 encontrado en carcinoma cervicouterino escamoso e indiferenciado .....	13
Tabla # 5.	Porcentaje de papilomavirus tipo 16 encontrado en lesiones preneoplásicas cervicales .....	14
Tabla # 6.	Parámetros obtenidos al contar los leucocitos obtenidos por tres diferentes métodos y de tres diferentes individuos .....	50
Tabla # 7.	Evaluación de los tres diferentes métodos para la purificación de leucocitos por el análisis de varianza y la comparación múltiple de Newman-Keuls .....	51
Tabla # 8.	Rendimiento de la extracción de DNA de Tejido cervical y sangre periférica de los pacientes analizados .....	56
Tabla # 9.	Resumen de las características de las muestras analizadas y de los resultados obtenidos .....	72
Tabla # 10.	Resumen de los patrones de migración de HPV en las muestras de DNA digeridas con las endonucleasas de restricción <u>Eco</u> RI y <u>Pst</u> I .....	75

## AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en la Unidad de laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas. Recibimos el apoyo de los departamentos de Oncología, Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario, Facultad de Medicina de la U. A. N. L. y del laboratorio del Dr. Patricio Gariglio del departamento de Biología y Patología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en la Cd. de México. Además de la asesoría de mi director de tesis, recibí asesoría de los Drs. Juan Francisco González (Hospital universitario de la U. A. N. L.) y Patricio Gariglio (CINVESTAV-IPN).



## RESUMEN.

El cáncer cervicouterino (CaCU) es una de las enfermedades responsables del mayor número de muertes de mujeres adultas en el mundo. En México la incidencia de esta enfermedad es muy alta. Trabajos epidemiológicos han demostrado su origen venéreo señalando al Virus del Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16) como uno de los principales agentes causales. En el presente trabajo estudiamos el DNA extraído de muestras de pacientes con CaCU y con otros trastornos ginecológicos. De las 30 muestras cervicales estudiadas, 20 fueron de CaCU, seis de pacientes sanas sin signos citológicos de anormalidad, una de displasia marcada (NIC III), una de carcinoma vulvar, otra de una mujer sometida a histerectomía radical por cervicitis inespecífica y finalmente una de una mujer con carcinoma vaginal. Nuestro estudio consistió en analizar la presencia del genoma del virus del papiloma humano en el DNA de estas muestras cervicales.

Dividimos nuestro trabajo en tres fases. Durante la primera producimos una sonda con el DNA de HPV-16. Esta etapa comprendió la caracterización del plásmido con endonucleasas de restricción, su aislamiento a gran escala y su marcaje tanto radiactivo como con biotina. Durante la segunda fase seleccionamos un método eficiente para obtener leucocitos a partir de sangre periférica y establecimos las condiciones necesarias para aislar y digerir con endonucleasas de restricción DNA genómico de células humanas. En la tercera etapa adaptamos los métodos para detectar genes; primeramente contrastamos la sensibilidad de dos métodos cromogénicos y de un método radiactivo para detectar secuencias génicas y finalmente, detectamos el DNA de HPV tanto por un método rápido ("Dot blot") como por el análisis con la técnica de Southern.

Utilizando el método rápido encontramos secuencias específicas de HPV-16 en ocho muestras de CaCU, en una muestra de DNA extraída de leucocitos y en dos muestras de CaCU que no reunían nuestros criterios de integridad y pureza. Cuando recurrimos a

la técnica de Southern, detectamos secuencias de HPV en 11 de las veinte muestras de CaCU (54 %). De estas muestras positivas, seis dieron señal específica para HPV-16. En las diez muestras restantes, de las 30 analizadas, detectamos DNA de HPV en la muestra de NIC III, logramos observar señal específica para HPV-16 en una de las muestras de mujeres sanas y en la sangre periférica de una paciente con expansión de la enfermedad.

Cuando agrupamos las muestras de acuerdo con el grado de severidad de la enfermedad en cuatro estadios clínicos, encontramos una mayor frecuencia de HPV en los estadios tempranos, sin embargo no encontramos correlación entre el número de copias de HPV por célula y el grado de severidad de la enfermedad.

Finalmente el análisis con endonucleasas de restricción de las muestras positivas nos indican que en algunas muestras, el DNA de HPV puede estar integrado en el genoma de las células infectadas.

Al finalizar este trabajo logramos cumplir satisfactoriamente con los objetivos propuestos al inicio del mismo. Detectamos secuencias de HPV en el 54 % de los casos de CaCU, por medio de la implementación, en nuestro laboratorio, de métodos que permiten detectar secuencias génicas en el DNA humano. El poder detectar genes individuales o agentes infecciosos en el DNA de células humanas, abre a su vez una enorme variedad de posibilidades entre las que se encuentra el poder plantear y resolver nuevas incógnitas sobre el papel del virus del papiloma humano en el cáncer cervicouterino.

## INTRODUCCION.

El cáncer cervicouterino (CaCU) se encuentra entre una de las neoplasias responsables de la mayor cantidad de muertes entre las mujeres del hemisferio occidental y en algunos Países constituye la principal causa de muertes de mujeres adultas (1).

La incidencia mundial de CaCU durante el año de 1975 fué de aproximadamente 500,000 mujeres, mientras que un poco más de medio millón de mujeres desarrollaron cáncer de mama. La distribución geográfica de ambos es muy diferente y en algunos Países el CaCU es enmascarado por otras neoplasias y por otras causas de muerte. Por ejemplo, en E.U. durante el año de 1985, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama fueron, cada uno de ellos, responsable de la muerte de más mujeres que el CaCU, aunque mundialmente el CaCU induce más muertes femeninas que cualquier otro tipo de cáncer (2) observar tabla # 1.

Existen fuertes variaciones geográficas en la frecuencia de CaCU, como en el Suroeste de Inglaterra, en Israel y en Escandinavia en donde la incidencia es baja, mientras que en Sudamérica es muy alta (3). Se han observado también variaciones entre diferentes grupos étnicos como en E. U., en la ciudad de Nueva York, en donde la incidencia para mujeres: judías es de 3.6 por 100,000; blancas es de 13.5 por 100,000; negras es de 47.8 por 100,000 y de 97.6 por 100,000 en inmigrantes de Puerto Rico (4). Además existen variaciones conspicuas en la frecuencia de CaCU dentro de una misma población, dependiendo de la clase social a la que pertenecen como se observa en la tabla # 2 en donde se encontró una frecuencia cuatro veces mayor de muerte por CaCU entre las esposas de desempleados, comparadas con las esposas de profesionistas (2).

En E.U. un grupo de alto riesgo lo constituyen las mujeres latinas (4), por ejemplo en Los Angeles, California la incidencia de CaCU es tres veces más alta entre mujeres blancas con apellido español, que entre otras mujeres blancas y las emigrantes nacidas

**TABLA # 1. COMPARACION DE LA INCIDENCIA DE CANCER EN LA MUJER DE DIVERSOS PAISES.**

MILES DE MUJERES EN LAS QUE QUE SE DETECTO CANCER DE: (DURANTE 1975)			
	CERVIX	MAMA	TODOS LOS TIPOS DE CANCER
<b>PAISES DESARROLLADOS</b>			
AMERICA DEL NORTE Y AUSTRALIA	17 (4.2%)	111 (27%)	404
NORTE, SUR Y OESTE DE EUROPA	34 (6%)	142 (25%)	560
ESTE DE EUROPA Y URSS	44 (13%)	51 (15%)	347
JAPON	10 (10%)	12 (12%)	98
<b>SUBTOTAL PORCENTAJE</b>	<b>105 (7%)</b>	<b>316 (22%)</b>	<b>1409 (100%)</b>
<b>PAISES EN VIAS DE DESARROLLO</b>			
CHINA (TAIWAN, HONG KONG Y MONGOLIA)	139 (23%)	59 (10%)	597
INDIA Y EL RESTO DE ASIA	135 (27%)	91 (18%)	501
CENTRO Y SUDAMERICA	44 (20%)	49 (22%)	222
AFRICA	37 (21%)	27 (16%)	173
<b>SUBTOTAL PORCENTAJE</b>	<b>354 (24%)</b>	<b>225 (15%)</b>	<b>1493 (100%)</b>
<b>TOTAL PORCENTAJE</b>	<b>459 (16%)</b>	<b>541 (19%)</b>	<b>2902 (100%)</b>

DE: PETO R. (1986).

**TABLA # 2. DIFERENCIA EN LA MORTALIDAD POR CANCER CERVICOUTERINO ENTRE LAS MUJERES DE DIFERENTES CLASES SOCIALES EN INGLATERRA.**

CLASE SOCIAL EN BASE A LA OCUPACION DEL ESPOSO	PROPORCION NORMALIZADA DE MORTALIDAD EN MUJERES DE 15 A 64 AÑOS.*
I PROFESIONAL	42
II	66
III (NO MANUAL)	69
III (MANUAL)	120
IV	140
V DESEMPLEADOS	161

\* BASADA EN LOS CERTIFICADOS DE DEFUNCION DE 1970 A 1972.

DE: PETO R. (1986).

en Sur o Centro América tienen un aumento de 7.5 veces en la incidencia de CaCU en comparación con las nacidas en E.U. (5).

En México, el CaCU es uno de los problemas más grandes de salud pública, representando del 25 al 50% de las consultas oncológicas en algunos centros hospitalarios del País. La tasa de mortalidad anual por este tipo de neoplasias en la ciudad de México es de 10.9 por cada 100,000 mujeres. Se calcula una tasa de incidencia anual de 63.2 por cada 100,000 mujeres o sea el equivalente a 3,364 nuevos casos anuales (6). En el Noroeste del País el CaCU constituye el 34% de las neoplasias, la frecuencia más alta en ese medio (7).

Se ha sugerido que transcurren más de 10 años desde que aparece la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) hasta que invade el tejido conectivo cercano. Si tomamos en cuenta a las primeras alteraciones microscópicas, posiblemente transcurran más de 15 años hasta que se desarrolle CaCU invasor (4), por lo que se considera fácilmente controlable cuando es diagnosticado en estadios tempranos, además es lo suficientemente localizada como para ser tratada en forma eficaz por cirugía o radioterapia cuando es detectada en los primeros estadios (2). El método citológico más comúnmente utilizado en la detección de NIC y CaCU es el Papanicolao, gracias al cual se ha logrado disminuir la frecuencia de CaCU en algunas partes del mundo como en Toledo Ohio, en donde en un lapso de 20 años (1955-1974) la frecuencia disminuyó en un 66% (de 33.5 a 15.7 por cada 100,000 mujeres), mientras que los NIC se duplicaron (4). Así mismo se ha observado una disminución en la mortalidad por este tipo de neoplasia en una gran cantidad de países desarrollados. Observar tabla # 3.

Lamentablemente, aplicar el exámen de Papanicolao en la totalidad de la población femenina en forma rutinaria requiere de una gran cantidad de microscopistas expertos, lo que se traduce en costos muy altos que son difíciles de subsidiar por Países desarrollados y casi imposible por aquellos en vías de desarrollo (2).

**TABLA # 3. DISMINUCION EN LA MORTALIDAD POR CANCER CERVICOUTERINO EN VARIOS PAISES DE 1950 A 1960.**

PAIS	CAMBIO PORCENTUAL EN LA TASA DE MORTALIDAD POR CACU
ALEMANIA ORIENTAL	-40
JAPON	-33
ISRAEL	-32
IRLANDA DEL NORTE	-28
USA	-28
CANADA	-26
SUDAFRICA	-20
AUSTRIA	-19
NUEVA ZELANDA	-18
AUSTRALIA	-16
NORUEGA	-16
CHILE	-14
INGLATERRA	-12
IRLANDA DEL SUR	-11
ESCOSIA	-6
SUIZA	-3
ITALIA	-2
FRANCIA	-2
DINAMARCA	+10

DE: FETO R. (1986).

Por más de 150 años se ha reconocido la existencia de una estrecha relación entre el comportamiento sexual y el CaCU. Observaciones clínicas han demostrado que mujeres vírgenes tienen un bajo riesgo de presentar CaCU, mientras que las mujeres consideradas de alto riesgo presentan ciertas características en común como son: edad temprana del primer coito, edad temprana del primer embarazo, múltiples parejas sexuales, historia de tabaquismo, inestabilidad marital y padecimiento de enfermedades venéreas (3, 8).

Trabajos retrospectivos han detectado incidencias muy altas de CaCU en las segundas esposas de hombres en los que sus primeras desarrollaron CaCU, en parejas de: hombres con cáncer de pene, comerciantes que viajan, marineros, hombres con varias parejas sexuales (9).

Por otra parte existe un riesgo reducido de desarrollar CaCU en mujeres que usan diafragma, en las esposas de hombres que usan preservativos y en las de aquellos circuncidados, lo que indica que el papel masculino es importante en esta enfermedad (10).

Los datos anteriores señalan la existencia de posibles factores oncogénicos transmisibles en forma venérea entre los que se ha sugerido: el esmegma, los espermatozoides y agentes virales (3). Hasta la fecha no existen datos experimentales que nos demuestren que el esmegma sea un carcinógeno. La sugerencia que los espermatozoides sean agentes carcinógenos se basa en que durante el proceso fisiológico de metaplasia, el cervix fagocita y envuelve espermatozoides, sin embargo experimentos *in vitro*, con espermatozoides o con extractos de proteínas básicas de ellos, en cultivos de células de origen cervical, sólo han producido cambios temporales en las células (3). Los agentes virales que han sido involucrados son: el virus del Herpes Simplex tipo 2 (HSV-2) y el virus del papiloma humano (HPV).

#### Virus del Herpes Simplex tipo 2

El HSV-2 es transmitido en forma venérea, las mujeres que han tenido infecciones con este virus tienen un riesgo aumentado



de cinco a nueve veces de desarrollar CaCU comparándolas con mujeres sin infección previas con HSV-2 (11).

Evidencias adicionales provienen de:

- a).- Estudios seroepidemiológicos, los cuales han encontrado una alta correlación entre la incidencia de CaCU y la ocurrencia de anticuerpos contra HSV-2 (11-13).
- b).- Detección de antígenos virales en tejido cervical (11,13).
- c).- Detección de RNA viral y algunos fragmentos del DNA del virus. Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes, además algunos segmentos virales presentan homología con secuencias del DNA humano, de hamster y de ratón, por los que se utilizan solo algunos fragmentos del genoma de este virus como rastreadores moleculares (11-15).
- d).- De la inducción de tumores cervicales en ratas con el HSV-2 inactivado y de la transformación de células de ratón en cultivo con el virus inactivado o con segmentos de su DNA (11,13 y 16), aunque algunos autores no han podido inducir CaCU en ratones, aun en condiciones de exposición prolongada (17).

#### Virus del Papiloma humano.

Los papilomavirus son un grupo altamente heterogéneo de virus de DNA que inducen tumores epiteliales escamosos (verrugas y papilomas) en una amplia gama de aves y mamíferos, incluyendo a el hombre (18, 19).

En los humanos la naturaleza infecciosa y la etiología viral de las verrugas vulgares se confirmó desde 1907 (1, 20), encontrándose asociado al papiloma virus humano (HPV), con una gran diversidad de verrugas de diversas apariencias, tanto morfológica como histológicamente (21). Las técnicas normales de virología no se pueden aplicar a su estudio ya que no hay sistemas de cultivo de tejidos para su propagación in vitro. Debido a la ausencia de tales sistemas de cultivo, no es posible obtener antígenos ni producir anticuerpos, volviéndose las técnicas de biología

molecular la única forma de estudiar las características del HPV (18,20). La clonación molecular del DNA de HPV (en plásmidos o en el bacteriófago lamda) y la hibridización molecular han permitido identificar a más de 40 diferentes tipos de papilomavirus (20, 22). Un papiloma virus es considerado como un nuevo tipo cuando difiere en el 50% de sus secuencias nucleotídicas con respecto a los otros tipos de HPV y se ha encontrado a uno o más de ellos en una lesión particular (20).

De una verruga genital conocida como condiloma acuminado, se clonó el HPV tipo 6, el cual se encontró consistentemente relacionado con esta verruga (23).

Existe una lesión laríngeal conocida como condilomatosis laríngeal que se presenta muy frecuentemente en niños recién nacidos, cuyas madres presentan condilomas acuminados, lo que indica que esta lesión se puede producir por contaminación durante el momento del parto. Basándose en esto se logró aislar a un nuevo tipo de papilomavirus de un papiloma laríngeal (el HPV-11), el cual se encontró en un porcentaje alto de condilomas acuminados (24).

Diversas observaciones clínicas han relacionado el condiloma acuminado con lesiones precancerosas tanto cervicales como vulvares (3, 25), motivando a diversos grupos a tratar de localizar el virus del papiloma en este tipo de lesiones.

#### El virus del papiloma humano en la mujer.

El primer informe de un papilomavirus en carcinoma cervicouterino fué el de Green en 1982 quién encontró a un virus relacionado con el HPV-EV (aislado de un paciente con epidermodiodisplasia verruciformis) en el 6.5% de las muestras de CaCU y en el 20% de los carcinomas vulvares, así como en otras lesiones genitales (26).

Zachow, en el mismo año, detectó secuencias homólogas a HPV-EV en varias lesiones precancerosas y cancerosas de localización genital (27). Posteriormente el grupo de Zur Hausen en 1983, logró detectar secuencias de HPV homólogas a HPV-6 o a HPV-11 en el 20%

de los CaCU invasores de mujeres alemanas (28), logrando clonar y caracterizar al papilomavirus denominado HPV-16 (29).

Aunque no se han identificado partículas virales asociadas con el DNA de HPV-16, su origen viral se confirmó por medio del análisis de la secuencia de la totalidad de su genoma y la comparación con otros tipos de papilomavirus (30) ver figura 1.

A partir de entonces se han aislado otros papilomavirus de CaCU, como el HPV-18 de una muestra de CaCU de una mujer brasileña (31), el HPV-31 de una muestra de CaCU de una mujer estadounidense y el HPV-35 de un adenocarcinoma cervical de una mujer estadounidense (32 y 33).

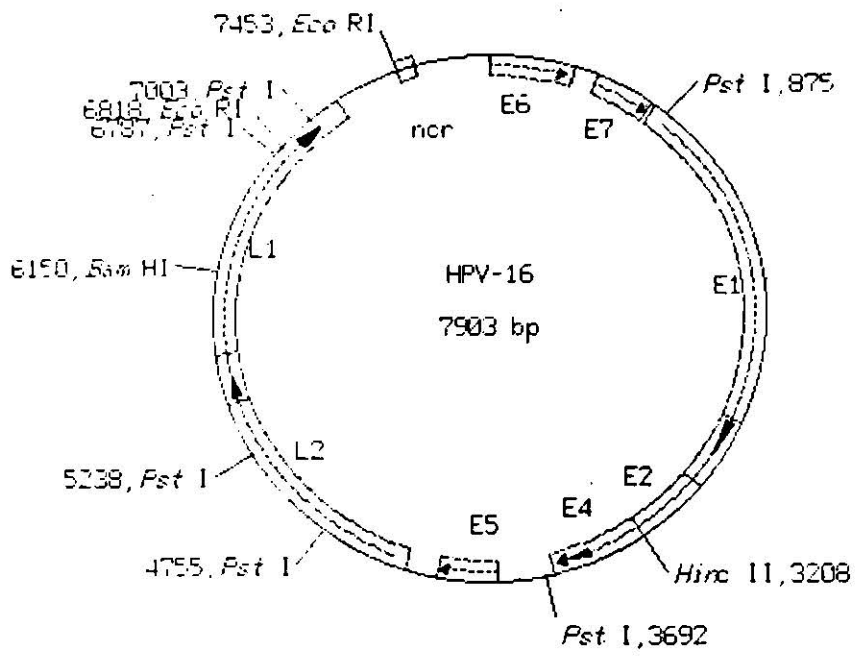
El papiloma virus humano tipo 16 ha sido encontrado constantemente en biopsias de CaCU escamoso proveniente de mujeres de varias regiones geográficas con porcentajes que varían entre el 25 y el 67%, como se aprecia en la tabla # 4 (33-49).

Se ha detectado a HPV-16 en lesiones precancerosas, ver tabla # 5 (33-39, 47-53), en el 17% de las inflamaciones cervicales inespecíficas (54) y en porcentajes que varían del 2 % al 34 % de algunas mujeres con cervix normales (37, 50, 52, 54, 55).

Evidencias directas de infecciones de neonatos por HPV-16 fueron aportadas al detectar secuencias de HPV en el 4% de 70 prepucios de niños recién nacidos (representando el tipo 16 el 67%) y en el 11.1 % de 234 raspados vaginales de mujeres con citología normal que se encontraban en el primer trimestre de embarazo (51, 56).

Un grupo de investigadores realizó examen colposcópico de los órganos genitales de pacientes con NIC localizando lesiones subclínicas que normalmente pasan desapercibidas durante las revisiones ginecológicas, denominadas microverrugas y lesiones intraepiteliales de localización vulvar, vaginal y perianal. Al tomar biopsias de ellas se detectó la presencia de HPV-16 en el 70% de las neoplasias intraepiteliales vulvares y en el 50% de las microverrugas, concluyendo que este tipo de lesiones pueden ser reservorios naturales para HPV-16, pudiendo jugar un papel importante en la infección inicial y en la reinfección de

Figura # 1. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PAPILOMA VIRUS HUMANO TIPO 16.



**TABLA # 4.**

**PORCENTAJE DE PAPILOMAVIRUS TIPO 16  
ENCONTRADO EN CARCINOMA CERVICOUTERINO  
ESCAMOSO E INDIFERENCIADO.**

Pais (referencia)	Porcentaje de HPV-16	número de casos analizados
Alemania (35)	61.1%	18
Alemania (41)	67%	6
subtotal	62.5%	24
Italia (49)	46.15%	13
Inglaterra (36)	45%	11
Inglaterra (37)	33%	3
Inglaterra (40)	87.5%	8
Subtotal	59%	22
E.U. (42)	33%	27
E.U. (39)	25%	12
E.U. (33)	36%	39
E.U. (34)	40%	5
Subtotal	33.7%	83
Japón (38)	50%	6
Japón (43)	36%	50
Japón (44)	40%	5
Japón (48)	55%	9
Subtotal	40%	70
México D.F. (46)	31%	16
Panama (47)	60%	20
Kenya y Brasil (35)	34.8%	23
Brasil (45)	42%	19
<b>Total</b>	<b>42.4%</b>	<b>290</b>

**TABLA # 5. PORCENTAJE DE PAPILOMAVIRUS TIPO 16 ENCONTRADO EN LESIONES PRENEOPLASICAS CERVICALES.**

PAIS (Referencia)	ESTADIO					SE
	I	I/II	II	II/III	III	
Alemania (35)						14% (29)
Alemania (50) <sup>a</sup>		40% (45)			58% (22)	
Italia (49)				75% (4)		
Inglaterra (37)				44% (16)		
Inglaterra (36)	0/3		100% (1)		100% (1)	
E.U. Indiana (52)	8.3% (12)		50% (12)		61% (18)	
E.U. Texas (34)			100% (1)		100% (1)	
E.U. Nueva York (53)						68% (19)
E.U. Minesota (39)	60% (5)		50% (2)			40% (5)
E.U. Washington (33) <sup>a</sup>	14% (14)		50% (10)		100% (2)	
E.U. Indiana (51)	25% (16)		0/2			
Japón (48) <sup>a</sup>	55% (9)		7% (15)		44% (32)	
Japón (38)	23% (13)		32% (25)		57% (35)	
Panama (47)						25% (12)
<b>Total</b>	<b>25%</b> <b>(72)</b>	<b>40%</b> <b>(45)</b>	<b>35%</b> <b>(66)</b>	<b>50%</b> <b>(20)</b>	<b>52%</b> <b>(116)</b>	<b>33%</b> <b>(60)</b>

SE = Sin Especificar.

<sup>a</sup> Se utilizó una mezcla de HPV-16 y HPV-18.

pacientes (57).

Existen otros tipos de lesiones de origen venéreo en la mujer, entre las que se ha encontrado a HPV-16 en porcentajes altos: la enfermedad de Bowen y la papulosis bowenoide con una frecuencia del 60 y 80% respectivamente) (58).

Una fuente de infección de HPV recientemente detectada fueron los espejos vaginales que solamente son lavados y desinfectados con "Savol" (chlorhexidine/cetrimide) después de ser utilizados con pacientes que presentan NIC o CaCU. Encontrando secuencias de HPV en el 11% de los 45 espejos analizados (59-61).

#### El virus del papiloma humano en el hombre.

Con la aceptación del CaCU como una enfermedad venérea surge la necesidad de conocer el tipo de lesiones portadoras del virus en el hombre (62). El cáncer de pene es una enfermedad relativamente rara en la mayor parte de los países, pero en algunos como Brasil la frecuencia es considerablemente alta. Al buscar a HPV-16 en tales carcinomas se le encontró en el 49% de 53 muestras analizadas (63), sin embargo en otros estudios donde se analizaron 18 casos no se pudo detectar a HPV-16, pero si se encontró en cambio a HPV-18 en el 38% de estas muestras (64). Debido a la baja frecuencia de esta enfermedad se ha buscado a HPV-16 en otro tipo de lesiones peneales más frecuentes como: papulosis bowenoide, detectando a HPV-16 en el 85 % de las 20 lesiones analizadas, en el 60% de las enfermedades de Bowen, en el 40% de las enfermedades extragenital de Bowen y en el 66% de los Ca verrucoso de pene. Estos resultados permitieron concluir que este tipo de lesiones son reservorios naturales para HPV-16 (62).

Otra enfermedad común en el hombre es el condiloma acuminado peneal, en este caso se estudiaron las parejas femeninas de 25 hombres con esta enfermedad, 19 mujeres presentaron condilomas acuminados, nueve presentaron citología anómala en la cervix y de estas el 77% presentó a HPV-16. Al analizar molecularmente los condilomas acuminados de los nueve esposos de estas mujeres se encontró a HPV-16 en el 66%, considerando que la presencia de

condilomas acuminados en el hombre son un factor predisponente para CaCU y una posible fuente de diseminación para HPV-16 (57). Se ha informado la detección de secuencias de HPV en el 5.8% de 530 raspados penales de hombres sanos sin signos de lesiones genitales (65).

#### El papel del virus del papiloma humano en el CaCU.

Hasta aquí hemos mencionado una serie de trabajos encaminados a detectar secuencias de HPV-16, sin embargo con estos trabajos no se descarta la posibilidad de que HPV-16 sea un pasajero inocuo de células cancerosas, por lo que a continuación enlistamos una serie de trabajos epidemiológicos encaminados a demostrar que la presencia de este tipo de virus es importante en el desarrollo de la enfermedad.

1. El estadio más temprano de la lesión precancerosa NIC I (también conocido como displasia leve) frecuentemente reverte o permanece sin cambio por muchos años. Dentro de este tipo de lesión se distinguen algunas denominadas koilocíticas o condilomas atípicos, los cuales tienen un alto porcentaje de progresión. Al analizar molecularmente estas lesiones se detectó a HPV-16 en el 70%, mientras que sólo el 7% de los condilomas planos con figuras mitóticas normales presentaron a HPV-16, concluyendo que las lesiones denominadas condilomas atípicos son portadoras de HPV-16 y presentan un alto riesgo de progresar (66).
2. Al investigar a 50 parejas (21 hombres con papulosis Bowenoides o condilomas acuminados y 29 mujeres con NIC o con neoplasias intraepiteliales vulvares) el 50% presentó secuencias de HPV en la lesión de sólo un consorte, 19 parejas presentaron el mismo tipo de papilomavirus, de las cuales el 62% fué del tipo 16, el 21% presentó una mezcla de los tipos 11, 16 y 18, y en el 17% se observó a HPV-6/11 (62).
3. En 1981 se inició un estudio con un grupo de 418 mujeres finlandesas con citología anómala por un lapso de 20 meses; 24% de las lesiones sufrieron regresión, 55% permanecieron y



21% progresaron. De este grupo de mujeres, se analizaron por hibridización molecular las biopsias cervicales de 103, detectando secuencias de HPV en 55; de las cuales el 15% fué del tipo 16. A 28 mujeres se les realizó una segunda biopsia, observando que durante la infección el tipo de HPV puede cambiar a algun otro, en un caso de HPV-6 a HPV-11, en dos muestras de HPV-11 a HPV-16 y en otra de HPV-11 a HPV-18. En algunos casos el DNA de HPV no fué detectado en la segunda biopsia, esto se correlacionó con reversión de la lesión, por el contrario cuando la primera biopsia fué negativa y la segunda fué positiva siempre se observó progresión de la lesión. Se observó progresión en sólo una pequeña fracción del 0 al 13% de las lesiones con HPV-6 ó 11 y en el 45% de las lesiones con HPV-16. Con ésto se aportaron evidencias directas de que una lesión infectada con HPV-16 ó 18 tiene el potencial para progresar de NIC a carcinoma in situ (CIS) y a cancer invasor, además se demostró que esta progresión es más frecuente y más rápida que las producidas por otros tipos de HPV (67).

4. Sugerencias importantes de la infectividad tipo específica de HPV-16 se obtuvieron al detectar a este tipo de virus en la pápula bowenoide de un hombre de 20 años y en el CIS de su pareja femenina de 22 años. Dos meses después de la regresión espontánea de la lesión en el hombre y un mes después de la conización en la mujer surgieron condilomas acuminados en los órganos genitales de ambos, los cuales fueron inducidos por HPV-6/11 (63).

#### El genoma del virus del papiloma humano en CaCU.

Por otro lado, el hecho de encontrar información genética de HPV-16 y de HPV-18 en líneas celulares obtenidas de tumores cervicales (68-69), que han sido mantenidas por décadas sugiere que la presencia de este virus es crítica al menos para el mantenimiento del estado neoplásico. Al analizar el estado físico de HPV-16 (por medio de geles de agarosa bidimensionales y centrifu-

gación en gradientes de densidad) en lesiones cervicales benignas como condilomas, papulosis Bowenoides y displasias leves se le encontró sólo en forma episomal. Por lo que respecta a lesiones malignas (CaCU), el DNA de HPV-16 se encontró en forma integrada en múltiples sitios (70). Muchos autores han detectado el genoma de HPV-16 en forma integrada en lesiones cancerosas y en forma no integrada en lesiones precancerosas. Esto se ha hecho por medios indirectos observando el cambio en el patrón de corte de endonucleasas de restricción sobre el DNA del virus presente en el DNA genómico (38, 36, 45, 41, 35, 37). Cinco fragmentos de DNA genómico humano, que flanquean el sitio de integración del virus fueron clonados y utilizados como sondas (secuencias de DNA marcadas radiactivamente) para observar el estado físico de estas regiones en el DNA del tumor del que se clonaron y en varios otros tumores cervicales (que presentan a HPV-16 en forma integrada). Se concluyó que el DNA de HPV-16 se integra en forma inespecífica sin tener preferencia por alguna región o gen específico, llevándose a cabo frecuentemente en el DNA humano. Por otro lado se ha observado que la integración siempre altera la región temprana E1-E2 del virus (figura # 1). El hecho de que el DNA de HPV-16 se encuentre en forma libre en lesiones benignas y en forma integrada en lesiones malignas indica que la integración del DNA de HPV-16 puede ser un prerequisite para su conversión maligna (70-71).

Lehn et al. no encontró actividad transcripcional de HPV en tres de cuatro cultivos primarios de CaCU analizados, los cuales presentaban HPV-16 integrado en su genoma (72), pero en algunas líneas celulares derivadas de tumores cervicales, en donde HPV-18 se encuentra integrado, se encontró que la transcripción del mismo está limitada a la región E6-E7-E1 (figura # 1). Mediante análisis de secuencia se han encontrado cuatro tipos diferentes de RNAs generados por diferentes procesamientos de las regiones E6-E7-E1 los cuales probablemente dirigen la síntesis de las proteínas E6 y E7 (73). Este hallazgo es sumamente importante puesto

que estas regiones en el genoma de papilomavirus bovino han sido relacionadas con potencial oncogénico, por su capacidad de transformar cultivos de células de ratón (74).

#### Factores predisponentes del CaCU.

El riesgo de CaCU aumenta 100 veces si HPV-16 ó 18 es identificado en células de la mucosa. Experiencias epidemiológicas sugieren que un aumento de ese orden de magnitud refleja una relación causa-efecto. Sin embargo, las características etiológicas de la enfermedad nos indican que además de HPV existen otros factores predisponentes; ya que existe un intervalo aproximado de 20 años entre la edad de la incidencia máxima de la infección venérea viral y la del cáncer invasor. Como explicación a esto, se ha sugerido la participación de cofactores como deficiencias en la dieta de Vitamina A, beta-caroteno, vitamina C, Falacina, infecciones con HSV-2, inmunosupresión, el tabaco y el uso de algunos anticonceptivos orales (8, 9, 10, 46, 75).

## **HIPOTESIS DE TRABAJO.**

El CaCU es una enfermedad venérea posiblemente causada por algunos agentes transmitidos via contacto sexual. Uno de ellos, el papiloma virus tipo 16, ha sido encontrado en porcentajes altos de casos de CaCU en varias regiones geográficas, por lo que postulamos que el DNA de este virus se encuentra presente en tumores de pacientes con CaCU, que asisten al Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Facultad de Medicina, U.A.-N.L.

## **OBJETIVOS.**

### **A. GENERAL.**

Detectar la presencia del genoma del virus HPV tipo 16, así como de otros tipos afines a éste, en carcinomas cervicouterinos de pacientes del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".

### **B. PARTICULARES.**

1. Preparar una sonda con el DNA del plásmido pHPV-16.
2. Adaptar las condiciones necesarias para obtener y analizar DNA genómico.
3. Detectar la presencia del genoma de HPV-16 en tejidos cervicales.

## MATERIALES.

### A. ORIGEN DE LOS REACTIVOS.

Adquirimos de: **Sigma Chemical CO. ST. Louis, MO. U. S. A.**

Los siguientes reactivos: Trizma base, ácido etilen diamino tetra acético (EDTA), dicloro dimetil silano, sephadex G-50 fino, dodecil sulfato de sodio (SDS), cloruro de sodio (NaCl), azul de bromofenol, xylene cianol, glicerol, bromuro de etidio, hidróxido de sodio (NaOH), nonidet P-40 (NP40), cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), glucosa, dextran, citrato de sodio, acetato de amonio, dextran sulfato, fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), amberlita MB-1, albumina sérica bovina (BSA), alcohol isoamílico, ficoll tipo 400, polyvinil pirrolidona, proteinasa K, acetato de sodio, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), RNAsa libre de DNAsas, bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), ampicilina, ADN de esperma de salmón, triton X-100, cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), sulfato de magnesio hepta anhidro (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), formamida, 2-mercaptoetanol, 8-Hidroxiquinoleína, floruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), acetato de magnesio, cloruro de potasio (KCl), acetato de potasio, sacarosa, tiamina (vitamina B1).

de: **Merk de México, S. A.** Alcohol etílico, 2-5 difeniloxazol (PPO), 2-2-p fenil bis (5-feniloxazol) (POPOP), cloroformo, tolueno, ácido acético glacial y ácido sulfúrico concentrado.

de: **Reactivos Monterrey S.A.** Dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Fenol y ácido clorhídrico (HCL).

de: **Amersham International Bucking Hamshire England.**

El sistema para "Nick translation" Code No. 5000 Batch 36 y el fósforo 32 radioactivo Code PB 10165 <a-<sup>32</sup> P>dCTP.

de: **Pharmacia Fine Chemicals Uppsala Sweden.** El Ficoll-Paque.

de: **ENZO Biochem New York U.S.A.** El sistema para "Nick translation" cat No. EBP-803-8 Lote No. 61-T22 y Detek I-hpr Signal Generating System. Cat. No. EBP-820-1 Lote No.7A-S12.

de: **Bethesda Research Laboratories (BRL) Gaithersburg, Maryland U.S.A.** Blue Gene Cat. No. 8279SA. y las siguientes endonucleasas de restricción: Bam HI, Hind III, Kpn I, Hinc II y Msp I.

de: **Schleicher and Schuell U. S. A.** La membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m.

del **Microfiltration Products division, U.S.A.** La membrana de nylon Zeta Bind.

del **Bolsas y Materias Primas Moreno** Las bolsas de plástico.

del **American Scientific Products (atraves de Instrumentos y Equipos Falcon S. A. México.)**. Papel watmann 3MM, Membranas de diálisis, papel watmann G F/C, fibra de vidrio y filtros de Nal-gene 0.45 u.

de: **Farmacias Benavides Monterrey N. L. México.** Las jeringas de plástico de 1 a 20 ml.

de: **DIFCO Laboratories Detroit U.S.A.** Triptona y Casaaminoácidos. y por último del **Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología U.N.A.M.. Cuernavaca. Morelos.**

Las endonucleasas de restricción Eco RI y Pst I.

## B. MATERIAL BIOLÓGICO.

Obtuvimos placentas producto de embarazos normales a término inmediatamente después de los alumbramientos. Las trasladamos en hielo, las fraccionamos, las lavamos en solución salina (NaCl 150 mM y EDTA 25 mM pH 8) las congelamos en hielo seco y las almacenamos a -70°C.

Obtuvimos muestras de sangre tanto de pacientes como de voluntarios por medio de una jeringa nueva de 20 ml, las colocamos en un tubo falcon estéril que contenía 200  $\mu$ l de EDTA 500 mM, agitamos vigorosamente y las transportamos a 4°C hasta su procesamiento.

Las muestras cervicales fueron obtenidas de pacientes del Hospital Universitario, a través del Dr. Juan Francisco González, por medio de biopsias o por cortes de piezas quirúrgicas inmediatamente después de histerectomía radical. Las trasladamos en bolsas de plástico en hielo y las procesamos inmediatamente.

Obtuvimos la bacteria Escherichia coli, cepa HB101 portadora del plásmido pHPV-16, donada por el Dr. Seedorf a el Dr. P. Gariglio.

## METODOS

### A. PREPARACION DE LA SONDA.

En primer lugar, caracterizamos el plásmido pHPV-16 mediante análisis con endonucleasas de restricción y lo purificamos a gran escala (figura # 2). Posteriormente, marcamos dicho plásmido tanto radiactivamente como con biotina mediante la técnica de transcripción de la muesca (figura # 3). A continuación describimos las técnicas utilizadas en esta etapa.

#### 1. Caracterización y purificación del plásmido pHPV-16.

a. Minipreparaciones de plásmidos (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 76).

- 1.- Sembramos la bacteria con el plásmido de interés en cuatro ml de medio LB con 100 ug/ml de ampicilina durante 18 h a 37°C en agitación continua.
- 2.- Servimos (tubo a tubo sin pipeta) 1.5 ml del cultivo a un tubo de microcentrifuga, centrifugamos durante un min, decantamos y volvimos a servir sobre la pastilla otros 1.5 ml del cultivo, centrifugamos un min, decantamos y congelamos. Agregamos al mililitro sobrante un volumen de glicerol estéril al 80% y lo almacenamos a -20°C.
- 3.- Descongelamos la pastilla y la resuspendimos en 100 ul de solución I (2 mg/ml de lisozima, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8), agitamos mediante un vortex, e incubamos a 0°C durante 30 min.
- 4.- Agregamos 200 ul de solución II (NaOH 0.2 N, lauril sulfato de sodio <SDS> al 1%), mezclamos rápidamente por inversión e incubamos a 0°C por 5 min.
- 5.- Añadimos 150 ul de solución III (acetato de potasio 3 M, ácido acético 2 M), mezclamos rápidamente por inversión e incubamos a 0°C por 60 min.
- 6.- Centrifugamos por 5 min, recuperamos el sobrenadante en un tubo de microcentrifuga (aprox. 400 ul).
- 7.- Agregamos 200 ul de fenol saturado, mezclamos, añadimos 200 ul de SEVAG, agitamos, centrifugamos por dos min y colectamos la fase superior.
- 8.- Agregamos un ml de etanol absoluto, mezclamos bien por inversión y dejamos precipitar por dos min a temperatura ambiente, centrifugamos por 5 min, decantamos y secamos invirtiendo el tubo por algunos min.
- 9.- Resuspendimos en 200 ul de agua destilada estéril, añadimos 100 ul de acetato de amonio 7.5 M y 700 ul de Etanol absoluto, dejamos reposar por dos min a temperatura ambiente y centrifugamos por 5 min.
- 10.- Decantamos, agregamos 600 ul de etanol al 70% a temperatura ambiente, mezclamos por inversión por varias ocasiones y centrifugamos por tres min.

**Figura # 2. Purificación y caracterización del plásmido pHPV-16.**  
La bacteria transformada con el plásmido pHPV-16 fué crecida en cuatro mililitros de medio, se purificó el DNA del plásmido, se digirió con enzimas de restricción y se analizó en un gel de agarosa. Una vez confirmada la identidad del mismo se relizó su preparación a gran escala.

✦



Figura # 2. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL PLASMIDO pHPV-16.

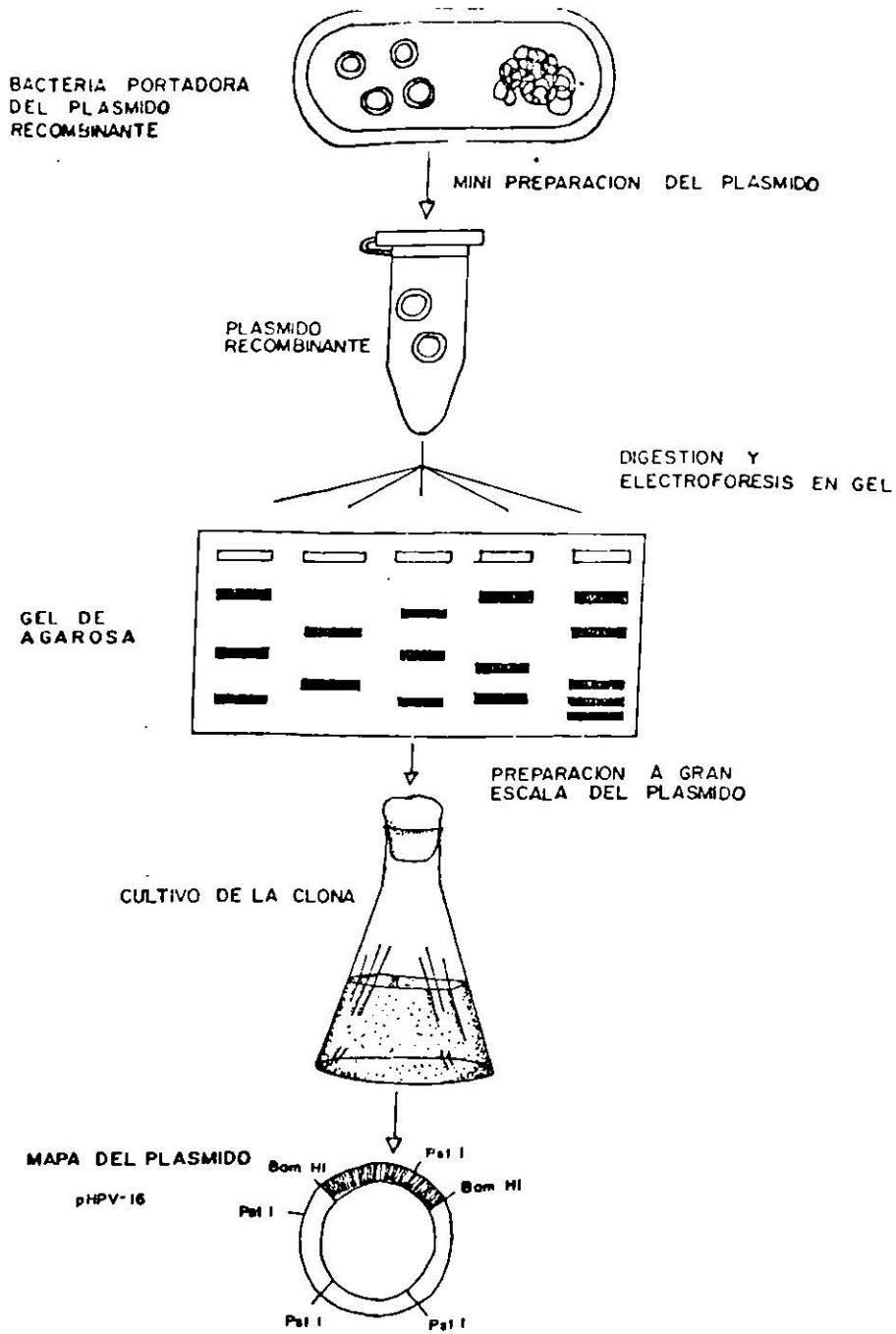
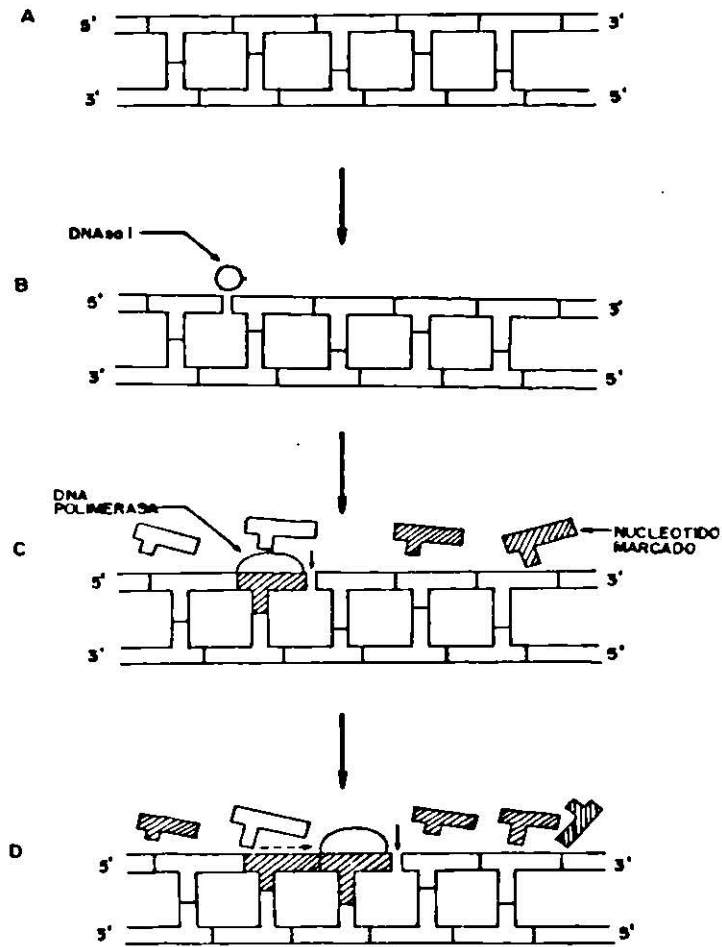


Figura # 3. Método de Translación de la muesca. En A se observa un segmento de un DNA bicatenario. En B se observa la muesca producida por la DNAsa I, la cual actúa aleatoriamente. En C y D se observa la acción de la DNA polimerasa. Apoyándose en el extremo 3' con un grupo OH expuesto en la muesca, esta enzima reemplaza nucleótidos cercanos a la muesca lo cual se aprovecha para incorporar los nucleótidos marcados con radiactividad o con biotina.

☆

Figura # 3. METODO DE TRANSLACION DE LA MUESCA.



- 11.- Decantamos y secamos en la centrifuga desecadora con vacío (SAVANT), disolvimos la pastilla en 18 ul de TE, añadimos dos ul de RNAsa (1mg/ml) e incubamos por 30 min a 37°C.
- 12.- Corrimos dos ul de la muestra en un gel de agarosa al 1% junto con 100, 200, 300 y 400 ng de un plásmido cuya concentración se había determinado por absorbancia a 260 nm. Mediante este procedimiento nos fué posible estimar la calidad y la concentración del plásmido que obtuvimos.
- 13.- Digerimos 200 ng del plásmido con algunas de las enzimas que ya conocíamos que producen cortes característicos en nuestro plásmido.

Nota: Realizamos todas las centrifugaciones a 15,000 xg a temperatura ambiente.

b. Electroforesis en geles de agarosa (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 76).

- 1.- Agregamos la cantidad necesaria de agarosa para alcanzar la concentración deseada a una solución de TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 2 mM, pH 8).
- 2.- Calentamos hasta ebullición, la dejamos enfriar, la servimos en moldes y colocamos el peine adecuado.
- 3.- Colocamos el gel, después de que solidificó totalmente, en una cámara de electroforesis con TAE, servimos las muestras disueltas en amortiguador de corrida 1 X, en los carriles, conectamos la cámara a una fuente de poder y corrimos el gel a 40 v por el tiempo deseado.
- 4.- Teñimos el gel en una solución de bromuro de etidio a dos ug/ml por 20 min.
- 5.- Observamos el gel en el transiluminador de luz UV.

c. Cinética enzimática con DNA de plásmidos (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 76).

- 1.- Colocamos en un tubo de microcentrifuga dos ug de DNA del plásmido deseado, cuatro ul del amortiguador adecuado 10 X y agua suficiente para completar un volumen final de 40 ul.
- 2.- Colocamos 5 ul (250 ng) en cada uno de los 6 tubos previamente enumerados del dos al 7 y 10 ul (500 ng) en un tubo etiquetado con el número 1.
- 3.- Colocamos en el tubo número uno la mitad de la cantidad de enzima máxima a probar por ug (p. ej. cuando iniciamos la cinética con 24 U/ug colocamos 12 U ya que el tubo solo contenía medio microgramo del DNA del plásmido), agitamos el tubo y transferimos 5 ul al tubo número 2, agitamos y repetimos el mismo procedimiento hasta que tuvimos 10 ul en el tubo número 6.
- 4.- Incubamos a la temperatura adecuada por una h.

- 5.- Colocamos un ul de amortiguador de corrida 6 X (azul de bromofenol al 0.25%, xylen cianol al 0.25%, glicerol al 30%, SDS al 0.6% y EDTA 60 mM) a cada tubo con excepción del tubo número 6 al que agregamos dos ul e incubamos por 10 min a 65°C.
  - 6.- Corrimos las muestras en un gel, siguiendo el mismo orden de la numeración, pero usando solo la mitad de la muestra en el tubo número 6.
- d. Digestion con enzimas de restricción de plásmidos (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 76).
- 1.- Colocamos en un tubo eppendorf 200 ng de DNA de plásmido, 0.5 ul del amortiguador enzimático adecuado 10 X, agua suficiente para alcanzar un volumen final de 5 ul y las unidades de enzima previamente determinadas por la cinética enzimática, teniendo la precaución de no agregar más de 1/10 del volumen final de enzima.
  - 2.- Incubamos en las condiciones de reacción sugerida por la casa comercial por lo menos una h.
  - 3.- Colocamos un ul de amortiguador de corrida 6 X e incubamos por 10 min a 65°C.
- e. Preparación de plásmidos a gran escala (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 77).
- 1.- En un matraz de 100 ml con 50 ml de medio LB y 100 ug/ml de ampicilina, inoculamos la bacteria de interés a partir de una colonia aislada y la incubamos durante 18 h a 37°C en agitación continua.
  - 2.- Transferimos a un matraz de dos l con un l de medio M9 y 100 ug/ml de ampicilina, (tomamos 5 ml y los utilizamos como blanco), agitamos a 230 rpm a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.3-0.4.
  - 3.- Añadimos 250 mg de cloranfenicol y continuamos la incubación por 12 h más.
  - 4.- Centrifugamos a 7,500 xg por 10 min a 4°C, descartamos el sobrenadante y congelamos la pastilla a -20°C por 30 min.
  - 6.- Descongelamos la pastilla y la resuspendimos con la ayuda de una pipeta Pasteur en 5 ml de sacarosa al 25% y Tris-HCl 25 mM pH 8.0.
  - 7.- Agregamos 250 ul de una solución de 10 mg/ml de lisozima disuelta en agua destilada estéril y agitamos en hielo por 5 min.
  - 8.- Añadimos un ml de EDTA 500 mM pH 8, agitamos en hielo por dos min.
  - 9.- Agregamos 8 ml de solución de triton X-100 (triton X-100 al 0.1%, EDTA 62.5mM, Tris-HCl 50 mM pH 8) y agitamos por 15 min, en hielo.
  - 10.- Centrifugamos por 30 min a 94,000 xg y recuperamos el sobrenadante en un tubo falcon de 50 ml.

- 11.- Añadimos 19 g de Cloruro de Cesio, aforamos a 20 ml con TE y resuspendimos la solución por agitación suave.
- 12.- Colocamos la solución en un tubo "Quick seal", en obscuridad parcial, agregamos un ml de bromuro de etidio (10 mg/ml) y aceite mineral hasta llenarlo totalmente.
- 13.- Lo sellamos mediante calor, centrifugamos en un rotor VTI 50 a 40,000 rpm por 24 h a 15°C .
- 14.- Localizamos las bandas mediante una lámpara de luz ultravioleta y extrajimos la banda de interés por punción con una jeringa de 5 ml equipada con una aguja 18 G x 1 1/2.
- 15.- Transferimos el líquido extraído a un tubo falcon de 15 ml cubierto con papel aluminio, agregamos un volumen de alcohol isoamílico, mezclamos por inversión durante 5 min, centrifugamos a 1,500 xg por 10 min, eliminamos el sobrenadante y repetimos el mismo procedimiento hasta que el bromuro de etidio (color rojo) fué eliminado totalmente.
- 16.- Dializamos el extracto en dos litros de TE por dos h.
- 17.- Transferimos la solución a un tubo falcon de 15 ml, añadimos RNasa libre de DNAsas a una concentración final de 20 ug/ml e incubamos a 37°C por 30 min.
- 18.- Agregamos lauril sulfato de sodio (SDS) y proteinasa K a concentraciones finales de 0.1 % y 100 ug/ml respectivamente. Incubamos por tres h a 37°C.
- 19.- Añadimos 1/2 volumen de fenol saturado, mezclamos bien, agregamos 1/3 de volumen de SEVAG, mezclamos, centrifugamos por 10 min a 1,500 xg y colectamos el sobrenadante.
- 20.- Recuperamos el sobrenadante, le añadimos un vol de SEVAG y centrifugamos a 1,500 xg por 10 min.
- 21.- Recuperamos el sobrenadante, le agregamos 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, mezclamos por inversión, le añadimos un vol de isopropanol absoluto, mezclamos, dejamos reposar unos min en hielo y centrifugamos a 15,000 xg por 10 min. Lavamos con etanol al 70% y secamos invirtiendo el tubo por algunos min.
- 22.- Resuspendimos en 1.0 ml de agua destilada estéril, agregamos 500 ul de acetato de amonio 7.5 M, y 3.5 ml de etanol absoluto, agitamos, dejamos reposar unos min a temperatura ambiente, centrifugamos 10 min a 15,000 xg, lavamos con dos ml de etanol al 70%, secamos en el SAVANT y resuspendimos en cuatro ml de TE.
- 23.- Tomamos 10 ul del extracto, los colocamos en una celda de cuarzo con un ml de agua destilada y medimos la absorbancia a 230, 260 y 280 nm, determinamos la concentración multiplicando el factor de dilución (101) por la absorbancia a 260 nm y por 50 ug/ml (equivalente a la concentración de DNA que absorbe una unidad de densidad óptica), determinamos la razón de absorbancias 230/260 nm y 260/280.

## 2. Marcaje del plásmido.

a. Marcaje radiactivo del plásmido (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 76, 108 y 109).

- 1.- Colocamos en un tubo eppendorff un  $\mu\text{g}$  del DNA del plásmido a marcar, 20  $\mu\text{l}$  de la solución 1, 5 X (dATP 100  $\mu\text{M}$ , dGTP 100  $\mu\text{M}$  y dTTP, 100  $\mu\text{M}$  en Tris-HCl, Cloruro de Magnesio y 2-mercaptoetanol pH 7.8), 10  $\mu\text{l}$  de ( $^{32}\text{P}$ )dCTP (250 picomoles o un  $\mu\text{Ci}$ ), 10  $\mu\text{l}$  de solución enzimática 10 X (0.5 U/ $\mu\text{l}$  de DNA polimerasa I y 10 pg/ $\mu\text{l}$  de DNAasa I en Tris-HCl, cloruro de magnesio, glicerol y BSA libre de nucleasas pH 7.5) y suficiente agua para alcanzar un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ .
- 2.- Incubamos a 14°C por dos h.
- 3.- Agregamos 10  $\mu\text{l}$  de EDTA 200 mM y SDS al 2% y calentamos a 65°C por 10 min.
- 4.- Elevamos el volumen de la reacción a 200  $\mu\text{l}$  con amortiguador de corrida (NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS al 0.1% y Tris-HCl 50 mM pH 7.5).
- 5.- Colocamos un tubo de microcentrifuga nuevo sin tapa en el fondo de un tubo falcon de 15 ml e introducimos la columna recién preparada (observar preparación de reactivos y materiales).
- 6.- Colocamos en la columna los 200  $\mu\text{l}$  de la reacción y centrifugamos a 1,500 xg por 10 min.
- 7.- Al terminar la corrida, sacamos el tubo mediante unas pinzas largas, medimos el volumen, tapamos el tubo y lo almacenamos a -20°C.

b. Medición de la radiactividad (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 76).

- 1.- De los 200  $\mu\text{l}$  de la solución de "Nick Translation" tomamos por triplicado un  $\mu\text{l}$  antes y un  $\mu\text{l}$  después de pasar por la columna de sephadex G-50 y los colocamos en el centro de discos de papel Whatmann GF/C.
- 2.- Secamos los filtros y los colocamos en viales con 10 ml de líquido de centelleo (PPD al 0.5% y POPOP al 0.03% en tolueno).
- 3.- Analizamos ambos viales, más un vial con líquido de centelleo solo en un contador de centelleo líquido.
- 4.- En el primer filtro medimos la radiactividad total, mientras que en el segundo medimos la radiactividad incorporada en los ácidos nucleicos.

c. Marcaje con biotina del DNA del plásmido (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 78, 79, 80).

- 1.- Colocamos en un tubo eppendorff un ug del DNA del plásmido a marcar, le agregamos 20 ul de solución I 5 X (dATP 100 uM, dGTP 100 uM y dCTP 100 uM en Tris HCl 25 mM, Cloruro de Magnesio 25 mM, 2-mercaptoetanol 500 uM, PMSF 50uM, acetato de Magnesio 2.5 mM y 50 ug/ml de BSA libre de nucleasas pH 7.5), 8 ul de Bio-11 dUTP (300 uM en Tris-HCl 50 mM pH 7.5), 10 ul de solución enzimática 10 X (20 pg/ul de DNasaI, 0.6 U/ul de DNA polimerasa I, Tris-HCl 50 mM, 100 ug/ml de BSA libre de nucleasas, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y glicerol al 50% pH 7.5) y suficiente agua para alcanzar un volumen final de 100 ul.
- 2.- Incubamos a 14°C por dos h.
- 3.- Añadimos 10 ul de EDTA 200 mM y SDS al 2%. Calentamos a 65°C por 10 min.
- 4.- Elevamos el volumen de la reacción a 200 ul con amortiguador de corrida.
- 5.- Colocamos un tubo de microcentrifuga nuevo sin tapa en el fondo de un tubo falcon de 15 ml e introducimos una columna recién preparada.
- 6.- Colocamos en la columna los 200 ul de la reacción y centrifugamos a 1,500 xg por 10 min.
- 7.- Al terminar la corrida sacamos el tubo mediante unas pinzas largas, medimos el volumen, tapamos el tubo y lo almacenamos a -20°C.

## B. OBTENCION DE DNA GENOMICO Y TRATAMIENTO CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION.

Durante esta etapa adaptamos los métodos para obtener y analizar DNA genómico. Primeramente seleccionamos, en base a los rendimientos, el mejor método para purificar leucocitos a partir de sangre periférica. Una vez realizado ésto establecimos las condiciones para aislar y digerir con endonucleasas de restricción DNA genómico de alto peso molecular a partir de varios tejidos (figura # 4). A continuación describimos las técnicas utilizadas en esta etapa.

1. Comparación de métodos para la purificación de leucocitos.
  - a. Método de Ficoll Hypaque (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 81).
    - 1.- Colocamos 4 ml de Ficoll hypaque en un tubo falcon de 15 ml, agregamos 5 ml de sangre (la cual contiene EDTA 5 mM) lentamente sin mezclar las fases, centrifugamos a 400 xg por 40 min a 20°C, tomamos la interfase con una Pipeta Pasteur y la depositamos en un tubo falcon de 15 ml.

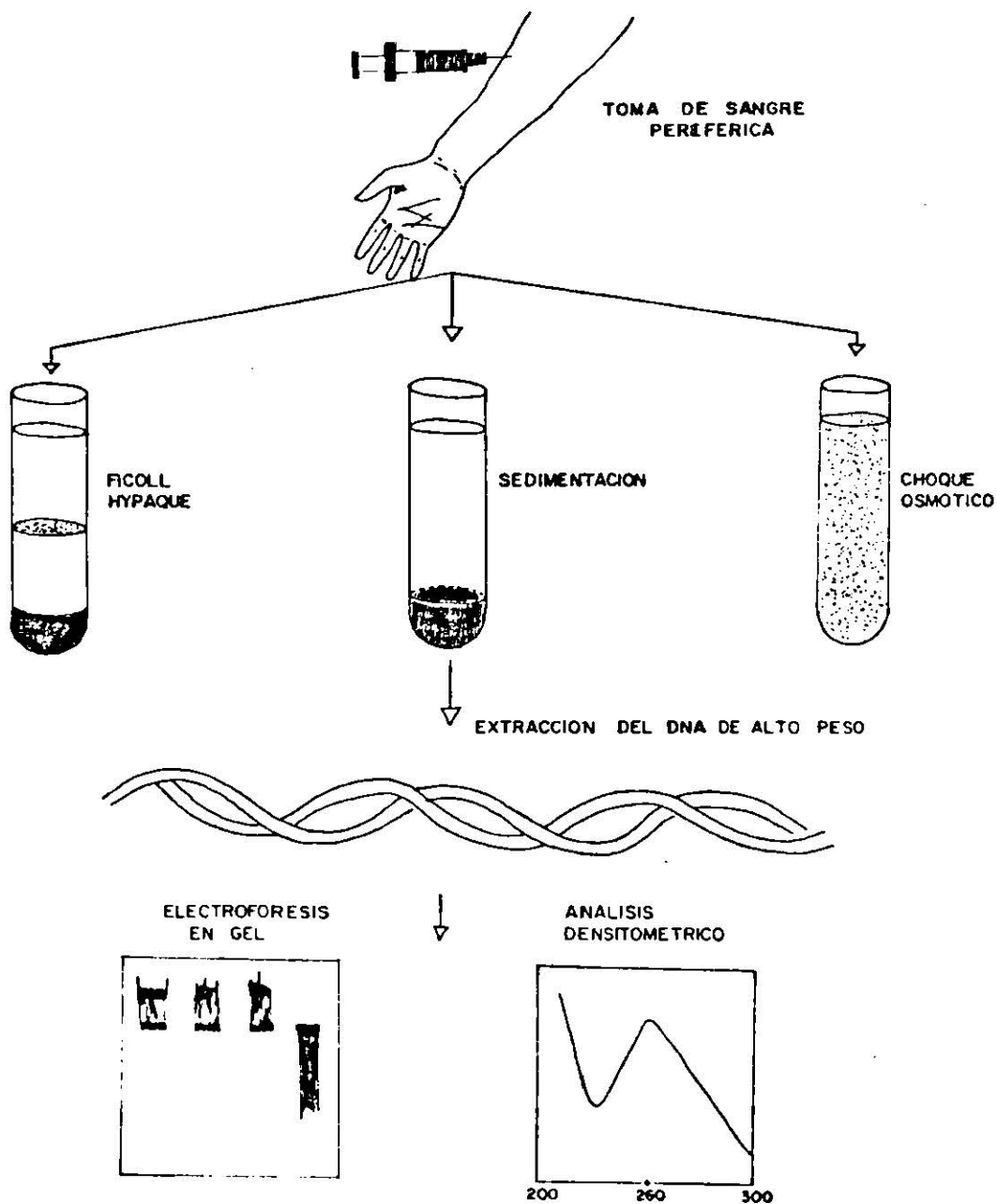


**Figura # 4. Evaluación de tres métodos para recuperar leucocitos de sangre periférica requeridos en el aislamiento de DNA genómico.** Se evaluaron tres métodos para purificar leucocitos: el de Ficoll Hypaque, el de sedimentación y el de choque osmótico. A partir de los leucocitos obtenidos aislamos DNA de alto peso molecular, al cual se le analizó su perfil electroforético en gel de agarosa y su espectro de absorbancia a la luz ultravioleta.



Figura # 4.

EVALUACION DE TRES METODOS PARA RECUPERAR LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA REQUERIDOS EN EL AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO.



- 2.- Añadimos tres vol de solución salina (NaCl 150 mM y EDTA 25 mM pH 8), resuspendimos las células mediante una pipeta Pasteur y centrifugamos a 500 xg por 10 min.
  - 3.- Decantamos, resuspendimos en 10 ml de solución hemolítica (ácido acético al 2% y NH<sub>4</sub>Cl 160 mM) e incubamos en hielo por 10 min.
  - 4.- Centrifugamos a 500 xg por 10 min, decantamos y resuspendimos en 10 ml de solución salina.
- b. Método de sedimentación (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 82-83).
- 1.- Colocamos 5 ml de sangre (la cual contiene EDTA 5 mM) en un tubo falcon de 15 ml, agregamos 2.5 ml de solución de sedimentación (dextran al 3%, NaCl 150 mM, EDTA 20 mM y Glucosa 70 mM). Dejamos sedimentar por 15 min en un ángulo de 45° y de 20-30 min en posición vertical a temperatura ambiente.
  - 2.- Recogimos el sobrenadante en un tubo Falcon de 15 ml y lo centrifugamos a 500 xg por 10 min .
  - 3.- Decantamos, resuspendimos en 10 ml de solución hemolítica (ácido acético al 2% y NH<sub>4</sub>Cl 160 mM) e incubamos en hielo por 10 min.
  - 4.- Centrifugamos a 500 xg por 10 min, decantamos y resuspendimos en 10 ml de solución salina.
- c. Método de choque osmótico (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en la referencia 82, 84).
- 1.- Colocamos 5 ml de sangre (la cual contiene EDTA 5mM) en un tubo Falcon de 15 ml, agregamos 7.5 ml de agua destilada y dejamos incubar a temperatura ambiente por 15 min.
  - 2.- Centrifugamos a 500 xg por 10 min .
  - 3.- Decantamos, resuspendimos en 10 ml de solución hemolítica (ácido acético al 2% y NH<sub>4</sub>Cl 160 mM) e incubamos en hielo por 10 min.
  - 4.- Centrifugamos a 500 xg por 10 min, decantamos y resuspendimos en 10 ml de solución salina.
- d. Evaluación de los métodos (El conteo de leucocitos se realizó de acuerdo a la referencia 85 y el análisis estadístico basandonos en las fórmulas presentadas en la referencia 86).
- 1.- Llenamos la cámara de Neubauer y contamos los leucocitos presentes en cuatro cuadros de 1mm x 1mm x 0.1 mm de grosor y el valor obtenido lo multiplicamos por 2.5 con lo que obtuvimos el numero de leucocitos por ul.
  - 2.- Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza ANOVA y la comparación múltiple de Newman-Keuls.

## 2. Aislamiento de DNA.

a. Homogenización de tejidos (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 46).

- 1.- Colocamos el tejido (aproximadamente 0.5 g) en el homogenizador tipo "Elvehjem Potter", agregamos 5 ml de solución salina e hicimos pasar hasta el fondo, el émbolo 10 a 15 veces.
- 2.- Transferimos a un tubo Falcon de 15 ml y centrifugamos a 500 xg por 10 min. Cuando los tejidos presentarán cantidades considerables de sangre resuspendimos en 10 ml de solución hemolítica, incubamos en hielo por 10 min, centrifugamos a 500 xg por 10 min y decantamos.
- 3.- Lavamos en 10 ml de solución salina, decantamos y proseguimos con la extracción de DNA.

b. Extracción fenólica (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 47, 53, 44).

- 1.- Resuspendimos la pastilla celular en 5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 20 mM, EDTA 25 mM y NaCl 100 mM pH 8.0), agregamos proteinasa K a una concentración final de 200 ug/ml, mezclamos bien y añadimos SDS a una concentración final de 0.1%, mezclamos suavemente e incubamos a 50°C por lo menos por 16 h (en tejidos cervicales, debido a la gran cantidad de queratina que presentan utilizamos 2-Mercaptoetanol a una concentración final del 2%).
- 2.- Aumentamos el volumen de cuatro a cinco veces y continuamos con la incubación por dos h.
- 3.- Agregamos 1/2 volumen de fenol saturado (Tris-HCl 500 mM, NaCl 100 mM y EDTA 10 mM pH 8), agitamos hasta obtener una buena mezcla de fases, añadimos 1/3 volumen de SEVAG (Cloroformo-Alcohol Isoamílico 24:1) y agitamos suavemente por aproximadamente dos min.
- 4.- Centrifugamos 15 min, transferimos cuidadosamente la fase acuosa a un tubo nuevo usando puntas de boca ancha (procurando no traernos la interfase), repetimos el pasos número tres por una o dos ocasiones y centrifugamos por 15 min.
- 5.- Recuperamos el sobrenadante, le agregamos un volumen de SEVAG, agitamos suavemente por aproximadamente dos min, centrifugamos por 15 min, y repetimos ésta operación una vez más.
- 6.- Añadimos RNAsa libre de DNAsas a una concentración final de 100 ug/ml e incubamos a 37°C por dos h.
- 7.- Repetimos los pasos tres, cuatro y cinco, agregamos 1/2 vol. de acetato de amonio 7.5 M, mezclamos suavemente y añadimos dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), mezclamos bien y dejamos a -20°C por una h.
- 8.- Centrifugamos por lo menos una h.
- 9.- Decantamos el sobrenadante y lavamos la pastilla de DNA con

etanol al 70%, cuando la pastilla se despegó centrifugamos de 10 a 15 min.

10.- Añadimos TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM pH 8.0) a la pastilla de DNA y mantuvimos el tubo por uno a dos días a 4 °C. Cuando después de un par de días el DNA no se resuspendió colocamos el tubo a 37°C por una h.

11.- Tomamos 10 ul del extracto, los colocamos en una celda de cuarzo con 1000 ul de agua destilada y leímos la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. Determinamos la concentración multiplicando el factor de dilución (101) por la absorbancia a 260 nm y por 50 ug/ml (equivalente a la concentración de DNA que absorbe una unidad de densidad óptica), determinamos las relaciones de absorbancias 230/260 nm y 260/280 .

12.- Tomamos dos ug de la muestra y la corrimos en un gel.

NOTA: Todas las centrifugaciones las realizamos a 1,500 xg.

### 3. Digestión del DNA genómico con endonucleasas de restricción.

a. Cinética con endonucleasas de restricción de DNA genómico (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 76).

1.- Colocamos en un tubo de microcentrifuga 8 ug de DNA genómico, 16 ul del amortiguador adecuado 10 X y agua suficiente para completar un volumen final de 160 ul y de esta solución dividimos en alícuotas de 20 ul (un ug) en cada uno de los 6 tubos previamente enumerados del dos al siete y 40 ul (dos ug) en un tubo etiquetado con el número uno.

2.- Colocamos en el tubo número uno el doble de la cantidad máxima de enzima de restricción a probar por ug (p. ej. cuando iniciamos la cinética con 24 U/ug, colocamos 48 U ya que el primer tubo contenía dos ug del DNA genómico), agitamos el tubo y transferimos 20 ul al tubo número dos y repetimos el mismo procedimiento hasta haber colocado 40 ul en el tubo número 6.

3.- Incubamos a la temperatura adecuada por 12 h.

4.- Colocamos cuatro ul de amortiguador de corrida 6 X a cada tubo con excepción del tubo número 6 al que agregamos 8 ul e incubamos a 65°C por 10 min.

5.- Corrimos las muestras en un gel de agarosa al 0.9% siguiendo el mismo orden de la numeración, pero utilizando solo la mitad de la muestra en el tubo número 6.

b. Digestión de DNA Genómico (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 76).

1.- Colocamos en un tubo de microcentrifuga 11 ug de DNA genómico, 25 ul del amortiguador adecuado 10 X, agua bidestilada estéril hasta completar un volumen final de 250 ul y las unidades de enzima requeridas para una digestión total, previamente determinadas con la cinética enzimática. Agitamos

- hasta homogenizar la muestra e incubamos a la temperatura recomendada para la digestión (generalmente 37°C) por 16 h.
- 2.- Tomamos 20 ul de la reacción, le agregamos cuatro ul de amortiguador de corrida 6 X e hicimos una electroforesis en un gel de agarosa. Durante ese tiempo guardamos las muestras a 4°C.
  - 3.- Después de verificar la totalidad en la digestión, incubamos el resto de la reacción a 65°C por 20 min.
  - 4.- Colocamos los tubos en el SAVANT hasta que el volumen disminuyó a 100 ul, agregamos 220 ul de etanol absoluto frío y lo dejamos en hielo por lo menos 10 min y centrifugamos por 10 min.
  - 5.- Decantamos el sobrenadante, lavamos con 0.5 ml de Etanol al 70%, y centrifugamos por 5 min.
  - 6.- Secamos en el SAVANT, añadimos 20 ul de amortiguador de corrida 1 X e incubamos a 37°C por 12 h.
- NOTA: Todas las centrifugaciones las realizamos a 15,000 xg en una microcentrífuga.

### C. HIBRIDIZACIONES DE DNA EN FILTROS.

Durante la tercera etapa detectamos el genoma de HPV-16 en carcinomas cervicouterinos humanos.

Para cumplir con este objetivo, contrastamos la sensibilidad de tres métodos para detectar fragmentos específicos de DNA, el primero basado en radiactividad y los dos últimos en reacciones cromogénicas (figura # 5). Después establecimos las condiciones para detectar secuencias génicas, en los DNAs aislados con los métodos descritos en la sección anterior, por un método rápido y finalmente por la técnica de Southern (figuras # 6 y 7). A continuación describimos las técnicas utilizadas en esta etapa.

#### 1. Técnica directa.

"Dot blot" en papel nylon (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 89-91).

- 1.- Colocamos la cantidad de DNA problema en un tubo de microcentrífuga y le agregamos un vol de solución desnaturizante 2 X (NaOH 1 M y NaCl 3 M) e incubamos a 37°C por lo menos una h.
- 2.- Cortamos un fragmento de membrana Zetabind de Nylon del tamaño adecuado y lo colocamos en el aparato "vacusystem" (Amer. Bionetics), aplicamos el vacío, pusimos cada una de las muestras en el pocito adecuado y dejamos que el líquido fuera totalmente absorbido.
- 3.- Desmontamos el aparato, lavamos el filtro en una solución salina de citratos (SSC) 5 X por 5-10 m y lo horneamos por dos h a 80°C.

**Figura # 5. Análisis de varios métodos para detectar secuencias génicas.** La figura superior representa una membrana que ha sido colocada en una bolsa de plástico, e incubada en presencia de la sonda marcada con biotina o con radiactividad. La sonda radiactiva se detecta mediante autoradiografía, en cambio la sonda marcada con biotina es detectada mediante una reacción con estreptavidina acoplada ya sea con peroxidasa o con fosfatasa alcalina.

↴

Figura # 5. ANALISIS DE VARIOS METODOS PARA DETECTAR SECUENCIAS GENICAS.

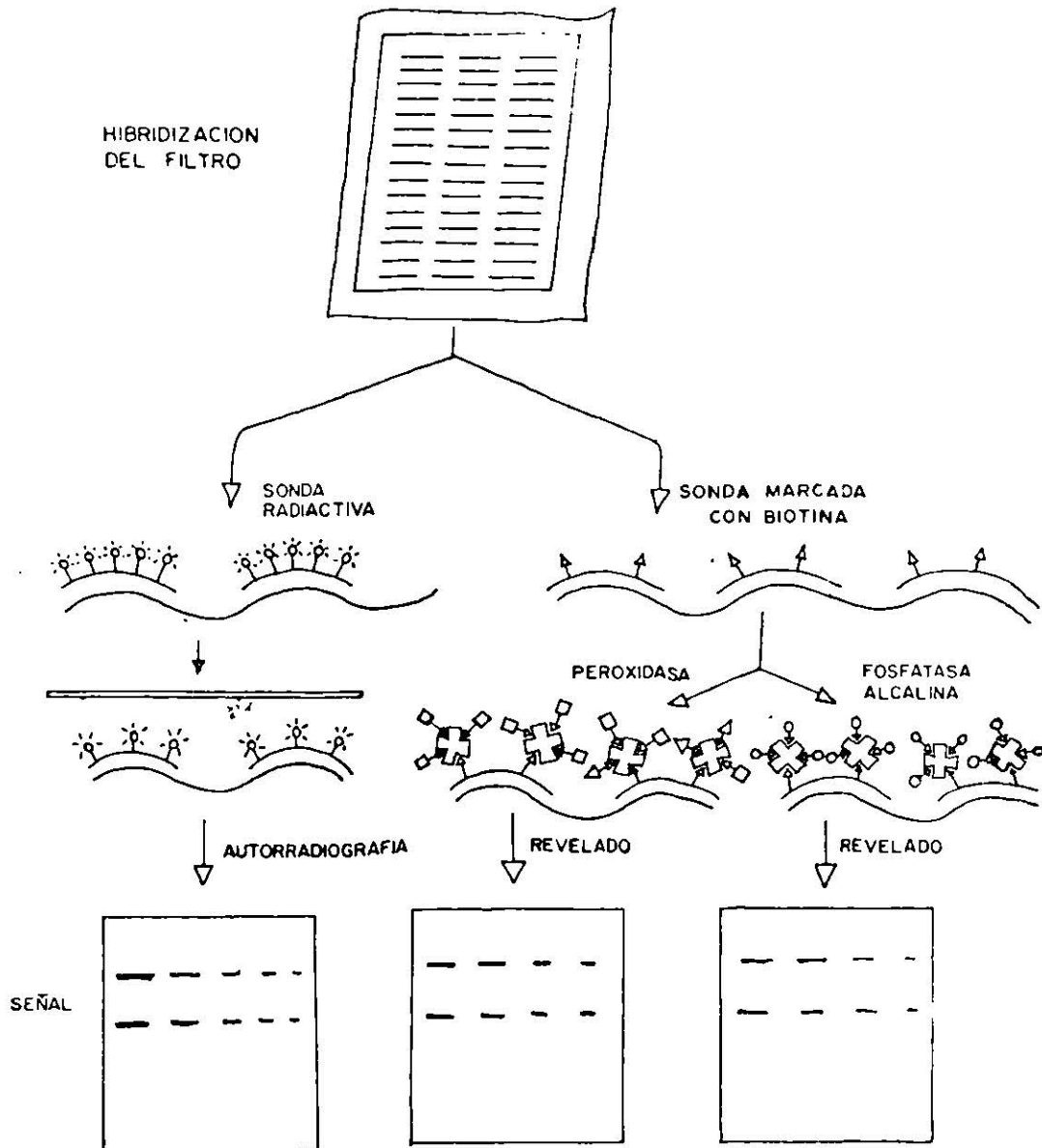




Figura # 6. Metodología utilizada para la detección de papilomavirus en cáncer cervicouterino. Se muestra el diagrama de flujo de la metodología utilizada en la detección del DNA del virus papiloma humano en las muestras de carcinoma cervicouterino.



Figura # 6.

# METODOLOGIA UTILIZADA PARA LA DETECCION DE PAPILOMA-VIRUS HUMANO EN CANCER CERVICOUTERINO.

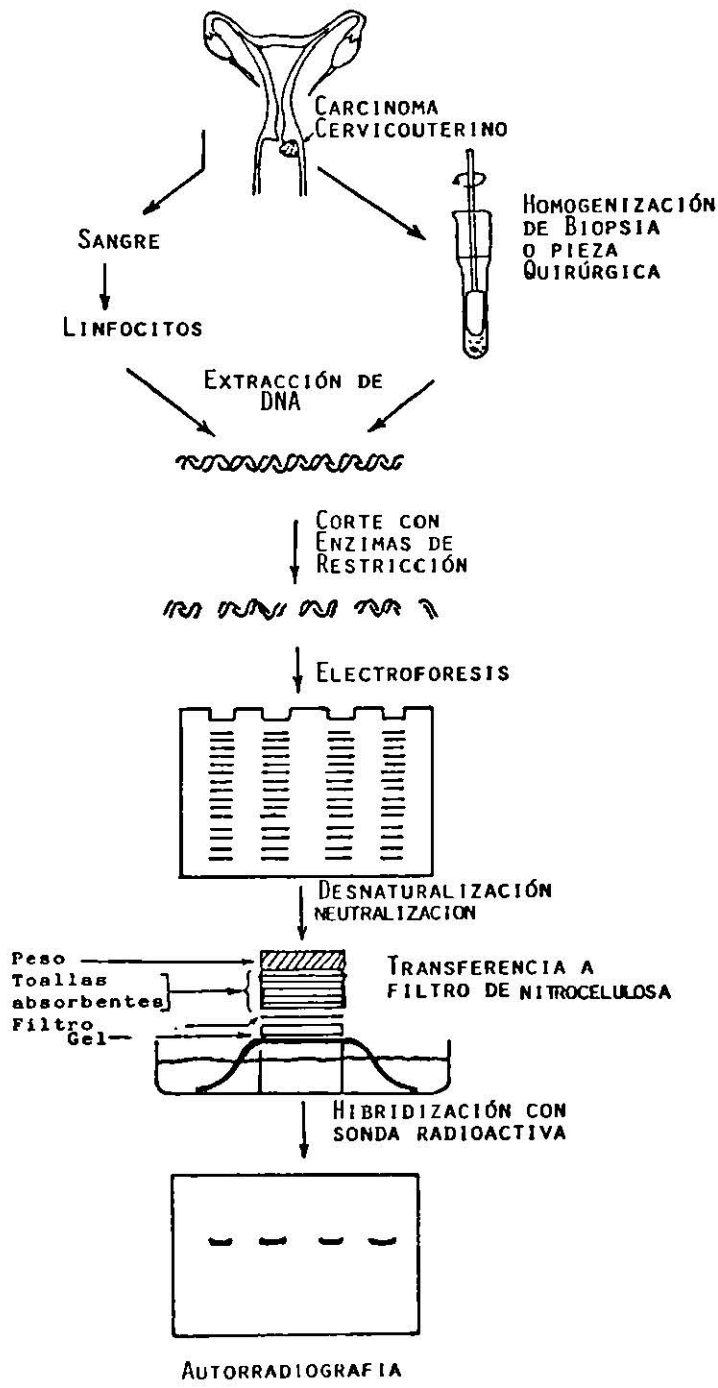
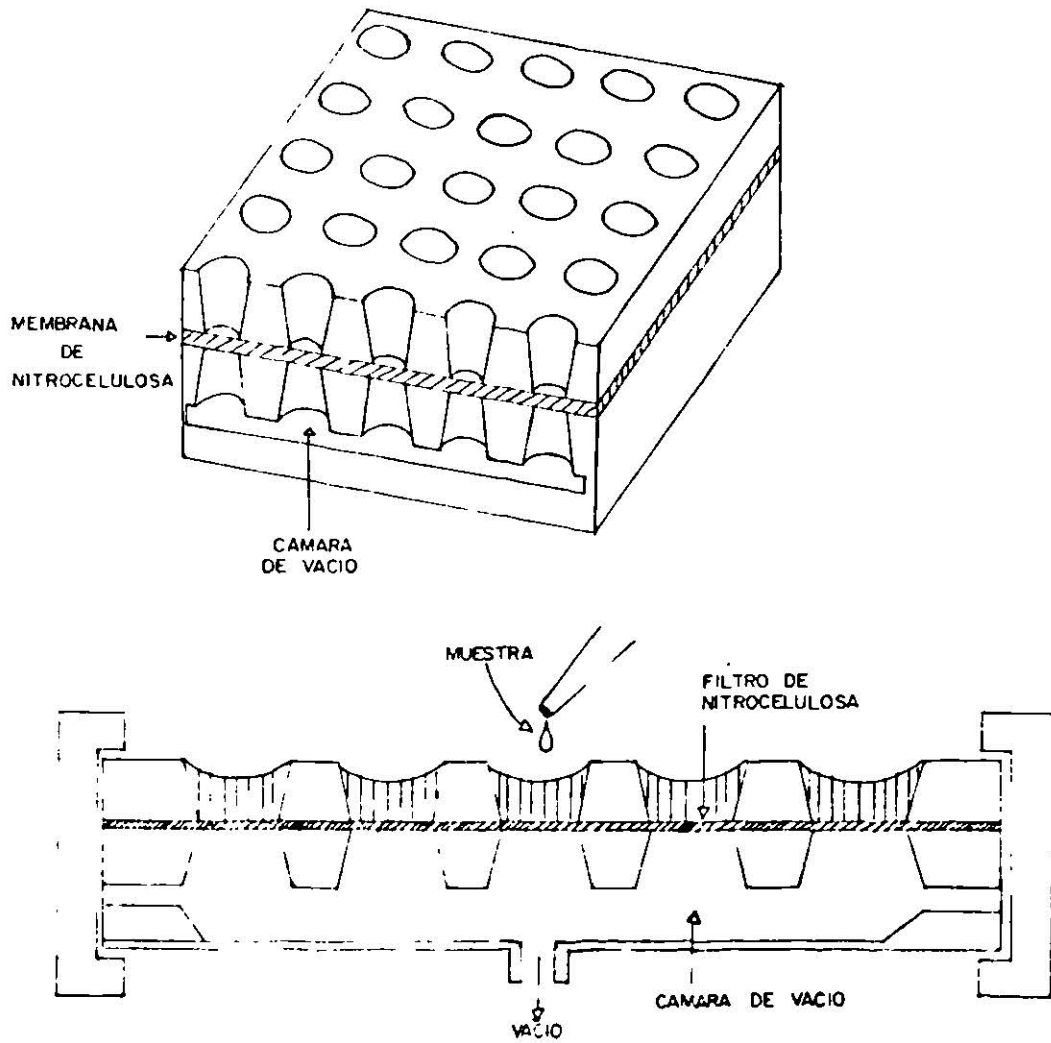


Figura # 7. Aparato utilizado en la técnica de "Dot Blot".

El aparato consiste de dos molduras de acrílico horadada. En la moldura inferior se encuentra una cavidad conectada a una fuente de vacío. Entre ambas se coloca un sello de plástico y la membrana en donde se desea colocar las muestras de DNA. En la figura inferior se observa esquemáticamente como se coloca la muestra.



Figura # 7. APARATO UTILIZADO EN LA TECNICA DE "DOT BLOT".



4.- Introdujimos la membrana a una bolsa de plástico y continuamos con el paso número dos del protocolo para prehibridizar e hibridizar membranas de nylon.

## 2. Transferencia de DNA en el gel a filtros por la técnica de Southern.

a. Experimento de número de copias (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 87).

1.- Digestimos un  $\mu$ g del plásmido pHPV-16 con la enzima Bam HI, para liberar el vector y el inserto, en un volumen de 25  $\mu$ l, paramos la reacción con 5  $\mu$ l de amortiguador de corrida 6 X (concentración final de 33 ng/ $\mu$ l).

2.- Mezclamos 10.5  $\mu$ l de la reacción y 89.5  $\mu$ l de amortiguador de corrida 1 con lo que obtuvimos una concentración de 3.5 ng/ $\mu$ l, el equivalente a 100 copias de HPV-16 por genoma haploide en 10  $\mu$ g de DNA genómico.<sup>1</sup>

3.- Mezclamos 100  $\mu$ l de la solución que contiene 100 copias/ $\mu$ l y 900  $\mu$ l de amortiguador de corrida 1 X con lo que obtuvimos 350 pg/ $\mu$ l, el equivalente a 10 copias por genoma haploide en 10  $\mu$ g de DNA genómico.

4.- Mezclamos 10  $\mu$ l de la solución que contiene 100 copias/ $\mu$ l y 990  $\mu$ l de amortiguador de corrida 1 X con lo que obtuvimos 35 pg/ $\mu$ l de HPV-16, el equivalente a una copia de HPV-16 por genoma haploide en 10  $\mu$ g de DNA genómico.

5.- Mezclamos 200  $\mu$ l de DNA de esperma de salmón 10  $\mu$ g/ $\mu$ l, 600  $\mu$ l de agua destilada estéril y 200  $\mu$ l de amortiguador de corrida 6 X.

6.- Colocamos en cada carril la cantidad de copias deseadas, en los rangos de una a 1000 copias usando combinaciones de las tres soluciones: una copia/ $\mu$ l, 10 copias/ $\mu$ l y 100 copias/ $\mu$ l, acompañados de 5  $\mu$ l de la solución de DNA de esperma de salmón.

b. Preparación del gel para transferirse a membrana de nylon (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 90).

1.- Lavamos el gel de agarosa (después de haberlo observado en el transiluminador) dos veces con agua destilada.

2.- Colocamos el gel en una solución de HCl 0.25 M por 15 min, con agitación constante a temperatura ambiente.

---

<sup>1</sup> Calculamos el equivalente de copia de la siguiente manera: asumimos que el genoma humano haploide tiene  $3 \times 10^9$  pb por lo que el genoma de HPV-16 de 7,900 pb constituye  $2.633 \times 10^{-6}$  partes del genoma humano. Por lo tanto, en 10  $\mu$ g de genoma humano tendremos 26 pg de HPV-16. Como el inserto representa el 74.62% del plásmido pHPV-16, necesitamos 35 pg del plásmido para tener 1 copia del genoma del virus por genoma haploide humano.

- 3.- Lavamos el gel dos veces con agua destilada.
- 4.- Colocamos el gel en solución desnaturalizante 1 X (NaOH 0.5M y NaCl 1.5 M) por 20 min, renovamos la solución e incubamos por otros 20 min.

c. Preparación de gel para transferirse a nitrocelulosa (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 92 y 93).

- 1.- Lavamos el gel de agarosa (después de haberlo observado en el transiluminador) dos veces con agua destilada.
- 2.- Colocamos el gel en una solución de HCl 0.25 M por 15 min.
- 3.- Lavamos el gel dos veces con agua destilada.
- 4.- Colocamos el gel en solución desnaturalizante por 20 min, renovamos la solución e incubamos por otros 20 min.
- 5.- Lavamos el gel dos veces con agua destilada.
- 6.- Colocamos el gel en solución neutralizante (NaCl 3M, Tris-HCl 1M pH 7.5) por 20 min, renovamos la solución e incubamos por otros 20 min.
- 7.- Colocamos el gel en SSC 20 X (NaCl 3 M y citrato de sodio 300 mM pH 7.0) por 10 min.

Nota: Realizamos todos los lavados a temperatura ambiente con agitación suave.

d. Transferencia a membranas (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en la referencia 76,93).

- 1.- Colocamos el gel sobre un papel Whatmann 3 MM, el cual mantiene contacto con la solución apropiada (solución desnaturalizante 1 X para transferir a membranas de nylon o SSC 20 X para transferir a membranas de nitrocelulosa), eliminamos las burbujas mediante la rotación suave de una pipeta de vidrio sobre el gel.
- 2.- Colocamos arriba del gel el filtro adecuado (previamente sumergido en agua bidestilada por 20 min y en la solución de transferencia correspondiente por otros 20 min) y eliminamos las burbujas mediante la rotación suave de una pipeta de vidrio sobre la membrana.
- 3.- Colocamos arriba de la membrana una hoja Whatmann 3MM, arriba de lo cual colocamos una pila de servilletas, un vidrio plano y un peso de aproximadamente 500 g.
- 4.- Reemplazamos las servilletas cada vez que se humedecieron abundantemente y dejamos transferir por 16 h.
- 5.- Removimos las toallas, el papel Whatmann 3MM y sumergimos la membrana en SSC 5 X por 15 min a temperatura ambiente con agitación continua.
- 6.- Colocamos la membrana entre dos hojas de papel Whatmann 3MM y lo horneamos al vacío (25 lbs de presión) a 80°C por 2h.

### 3. Hibridización molecular.

a. Prehibridización e hibridización en filtros de nylon (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 90, 92, 94).

- 1.- Lavamos el filtro por una h en SSC 0.1 X y SDS al 0.5% a 65°C.
- 2.- Introdujimos la membrana a una bolsa de plástico, lo lavamos con solución SSC 6 X brevemente, la eliminamos y agregamos 200 ul por cm<sup>2</sup> de filtro de la solución de prehibridización (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 1 M, formamida desionizada al 50%, SDS al 1%, Solución Denhardt 10 X -BSA al 0.2%, ficoll tipo 400 al 0.2% y polyvinil polorridona al 0.2%- y 500 ug/ml de DNA de esperma de salmón pH 7.9), previamente hervida por 10 min y enfriada directamente en hielo, sellamos la bolsa procurando eliminar la mayor parte de las burbujas e incubamos a 42°C por 16 h en un baño con agitación constante.
- 3.- Sustituimos la solución de prehibridización por (100 ul por cm<sup>2</sup> de filtro de la solución de hibridización (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 1 M, formamida desionizada al 44 %, SDS al 1%, Solución Denhardt 10 X, 500 ug/ml de DNA de esperma de salmón, dextran sulfato al 8 % y 10<sup>6</sup> cpm/ml de sonda radiactiva), previamente hervida por 10 min y enfriada directamente en hielo, sellamos la bolsa procurando eliminar la mayor parte de las burbujas e incubamos a 42°C por 16 h en un baño con agitación constante.
- 4.- Recuperamos la solución de hibridización en un tubo Falcon de 50 ml y la almacenamos a -20°C hasta su reuso.
- 5.- Colocamos el filtro en una charola con solución SSC 2 X y SDS al 0.5%.

b. Prehibridización e hibridización en filtros de nitrocelulosa (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 76,90,95).

- 1.- Después de hornear el filtro lo introdujimos en una bolsa de plástico, lo humedecemos con solución SSC 6 X.
- 2.- Eliminamos la solución anterior y agregamos 200 ul por cm<sup>2</sup> de filtro de solución de prehibridización (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1M, EDTA 5 mM, formamida desionizada - al 20% para baja astringencia o al 50% para alta astringencia -, SDS al 0.1%, solución Denhardt 5 X y 250 ug/ml de DNA de esperma de salmón pH 7.9) previamente hervida por 10 min y enfriada directamente en hielo. Sellamos la bolsa procurando eliminar la mayor parte de las burbujas e incubamos a 42°C por 16 h en un baño con agitación constante.
- 3.- Sustituimos la solución de prehibridización por 100 ul/cm<sup>2</sup> de filtro de la solución de hibridización (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1M, EDTA 5 mM, formamida desionizada - al 20% para baja astringencia o al 50% para alta astringencia -, SDS al 0.1

%, solución Denhardt 1 X , 100 ug/ml de DNA de esperma de salmón y  $10^6$  cpm/ml de sonda radiactiva o 100 ng/ml de sonda biotinilada), previamente hervida por 10 min y enfriada directamente en hielo. Sellamos la bolsa procurando eliminar la mayor parte de las burbujas e incubamos a 42°C por 16 h en un baño con agitación constante.

- 4.- Recuperamos la solución de hibridización en un tubo Falcon de 50 ml y la almacenamos a -20°C hasta su reuso.
- 5.- Colocamos la membrana en una charola con solución SSC 2 X y SDS al 0.5%.

c. Lavado de los filtros (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 32, 92, 96).

- 1.- Lavamos la membrana dos veces a temperatura ambiente, cada lavado de 30 min, con una solución de SSC 2 X y SDS al 0.5% por 30 min.
- 2a.- Agregamos al filtro una solución precalentada a 50°C de SSC 2 X y SDS al 0.5 % e incubamos a 50°C por 1 h. Este lavado es equivalente a una  $t_m$  -40°C (baja astringencia).
- 2b.- Añadimos al filtro una solución precalentada a 50°C de SSC 0.1 X y SDS al 0.5 % e incubamos a 60°C por 1 h. este segundo lavado es equivalente a una  $t_m$  -20°C (alta astringencia).
- 3.- Enjuagamos la membrana en una solución SSC 2 X a temperatura ambiente por 5 a 10 min para eliminar el detergente.
- 4.- Colocamos el filtro en una bolsa de plástico y sellamos la bolsa.

Nota: Realizamos todos los lavados a la temperatura indicada con agitación suave.

d. Preparación del filtro de nylon para rehibridización (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 94).

- 1.- Después de la autorradiografía, lavamos la membrana de Nylon con NaOH 0.4 N a 42°C por 30 min.
- 2.- Reemplazamos la solución anterior por Tris-HCl 25 mM, solución Denhardt 0.5 X y SDS al 0.5% pH 7.9 e incubamos a 95°C por 60 min.
- 3.- Lavamos la membrana en agua destilada a 95°C por 30 min.
- 4.- Secamos el filtro levemente, lo introducimos en una bolsa de plástico y expusimos una película con él por uno a dos días, para asegurarnos que la sonda anterior fué eliminada.
- 5.- Continuamos con el paso número dos del protocolo para hibridizar membranas de nylon.



#### 4. Detección de híbridos.

a. Autorradiografía (El método utilizado es una modificación a la técnica descrita en la referencia 76).

- 1.- Fijamos el filtro (previamente colocado en una bolsa de plástico) a un chasis de autorradiografía por medio de cinta adhesiva.
- 2.- En un cuarto oscuro pegamos una película Kodak de doble emulsión arriba del filtro y colocamos una segunda película arriba de la primera, cerramos el chasis y lo almacenamos a  $-70^{\circ}\text{C}$  por el tiempo necesario.
- 3.- Revelamos la placa superior en un aparato Kodak automático y guardamos el chasis a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta revelar la segunda placa.

b. Reacciones cromogénicas (El método utilizado es una combinación de las técnicas descritas en las referencias 80, 88).

- 1.- Hibridizamos el filtro bajo las condiciones anteriormente descritas excepto por la sustitución de la sonda radiactiva por una sonda biotinilada (100 ng/ml de solución de hibridización). Después de lavar la membrana como se indicó anteriormente la colocamos en una solución SSC 2 X por 5 a 10 min para eliminar restos de detergente.
- 2.- Colocamos el filtro en una bolsa de plástico, le agregamos 200 ul por  $\text{cm}^2$  de filtro de solución bloqueadora (PBS <NaCl 130 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7 mM y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3 mM pH 7.0>; BSA al 2 %, triton X-100 al 0.1%, EDTA 5mM y 100 ug/ml de DNA de esperma de salmón) e incubamos por una h.
- 3.- Substituimos la solución anterior por 50 ul por  $\text{cm}^2$  de filtro de solución de dilución I (PBS, BSA al 1%, EDTA 5mM pH 7.0) y cuatro ul/ml de estreptavidina marcada con peroxidasa o por solución de dilución II (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM pH 7.5) y un ul/ml de estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina e incubamos por una h.
- 4.- Lavamos la membrana por 45 min en solución de lavado ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 500 mM, Triton X-100 al 0.05%, EDTA 1 mM y BSA al 0.1% pH 6.5).
- 5a.- Para revelar a la peroxidasa, lavamos por 15 min en solución predetectora de peroxidasa (SSC 2 X, BSA al 0.1%, Triton X-100 al 0.05% y EDTA 1mM), colocamos la membrana en una bolsa de plástico, añadimos 200 ul por  $\text{cm}^2$  de filtro de solución detectora de peroxidasa (acetato de sodio 100mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.025% y 400 ug/ml de Amino Etil Carbazole (AEC) pH 4.5), incubamos en un lugar oscuro por 30 min y detuvimos la reacción en SSC 2 X.
- 5b.- Para revelar la fosfatasa alcalina, lavamos por 15 min en solución predetectora de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y  $\text{MgCl}_2$  50 mM pH 9.5), colocamos la membrana en una bolsa de plástico, agregamos 200 ul por  $\text{cm}^2$  de filtro

de solución detectora de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 330 ug/ml de Nitro blue tetrazolium (NBT) y 166 ug/ml de 5-bromo 4-cloro 3-Indolylfosfato (BCIP) pH 9.5), incubamos en un lugar obscuro de 30 min a tres h y detuvimos la reacción en 20 mM Tris-HCl y EDTA 487 mM pH 8.0.

Nota: Realizamos todos los lavados a temperatura ambiente con agitación suave.

## RESULTADOS.

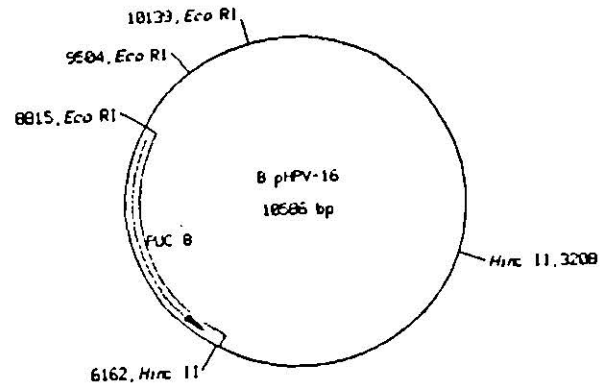
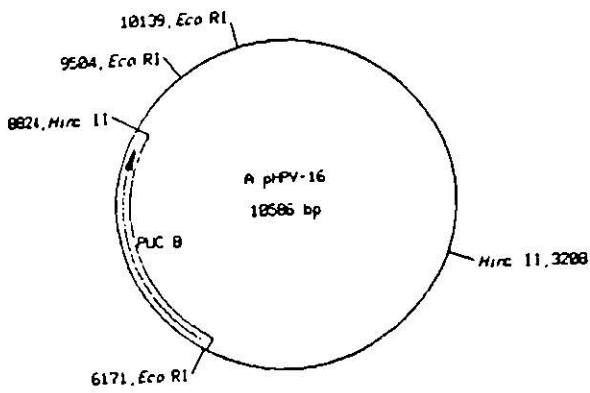
### A. MARCAJE DE LA SÓNDA.

Obtuvimos la bacteria Escherichia coli cepa HB101 que porta el plásmido pHPV-16 (donada por el Dr. Seedorf a través del Dr. Patricio Gariglio) de acuerdo con el método descrito para mini-preparaciones y obtuvimos aproximadamente 4 ug de plásmido. Este plásmido posee el genoma completo de HPV-16 clonado en el sitio único Bam HI de pUC 8. Puesto que este plásmido recombinante puede encontrarse en dos posibles configuraciones, utilizamos las endonucleasas de restricción Eco RI y Hinc II para diferenciar entre ellas (figura # 8), además basándonos en su secuencia de nucleótidos (30), incluimos para hacer las digestiones del DNA de este plásmido, otras enzimas diagnósticas como son Pst I, Hind III, Kpn I y Bam HI. Digerimos 200 ng del plásmido, los analizamos por electroforesis en gel y observamos los patrones de migración (figura # 9). Determinamos que nuestro plásmido posee la orientación B y confirmamos su identidad mediante la comparación de los patrones de restricción esperados contra los observados (figura # 10). Una vez realizado esto, crecimos la bacteria a gran escala, obteniendo aproximadamente dos mg del plásmido, el cual presentó una relación de la absorbancia de 260/280 nm > 1.7. Este DNA fué susceptible de ser cortado con enzimas de restricción y marcado a una actividad específica alta por el método de "Nick Translation" (fig # 3). Con este método la actividad específica es factor dependiente de la pureza del plásmido por lo que el haber obtenido valores entre 1 y 4 x 10<sup>8</sup> cpm/ug, nos indicó una buena calidad del plásmido en cuestión.

Figura # 8. Patrones esperados de las dos posibles configuraciones del plásmido pHPV-16 al ser digeridas con Hinc II y Eco RI. Los diagramas representan las posibles orientaciones de las secuencias de pUC 8 con respecto a HPV-16 y los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción Eco RI y Hinc II. En la parte inferior se observan los tamaños en pares de bases de los fragmentos producidos por estas enzimas para cada una de las dos posibles configuraciones.

Figura # 8.

PATRONES ESPERADOS DE LAS DOS POSIBLES CONFIGURACIONES DEL PLASMIDO pHPV-16 AL SER DIGERIDAS CON Hinc II Y Eco RI.



Enzima	ORIENTACION	
	A	B
HincII	4966 5620	2954 7632
Eco RI	635 3333 6618	635 689 9262

Figura # 9. Análisis del DNA de pHPV-16 por digestiones con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Cada una de los carriles posee 200 ng de DNA. En el primer carril se encuentra el plásmido pHPV-16 sin digerir; observándose dos bandas, una inferior que representa al plásmido en su estado superenrollado, una banda superior que incluye principalmente a la forma relajada. De los carriles dos al nueve se encuentra el plásmido pHPV-16 digerido con varias endonucleasas de restricción. Mientras que en el segundo se encuentra digerido con una enzima que lo lineariza, del tercero al quinto se encuentra digerido con endonucleasas de restricción que presentan dos sitios de corte. El sexto, séptimo y noveno corresponden a cortes con enzimas que poseen múltiples sitios de reconocimiento. En el octavo se presenta una doble digestión con las endonucleasas Bam HI y Pst I. En el décimo carril se encuentra el plásmido pHPV-16-E1 digerido con Eco RI, liberando el vector pUC 8 y un inserto de HPV-16 de 600 pb. En el onceavo se observa al el plásmido pUC 18 linearizado con la endonucleasa Pst I. Finalmente, en el último carril se aprecia el DNA del bacteriofago lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III (el cual nos sirve como marcador de peso molecular, mostrándose los pesos moleculares correspondientes en el extremo derecho).

Figura # 9.

ANALISIS DEL DNA DE pHPV-16 POR DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

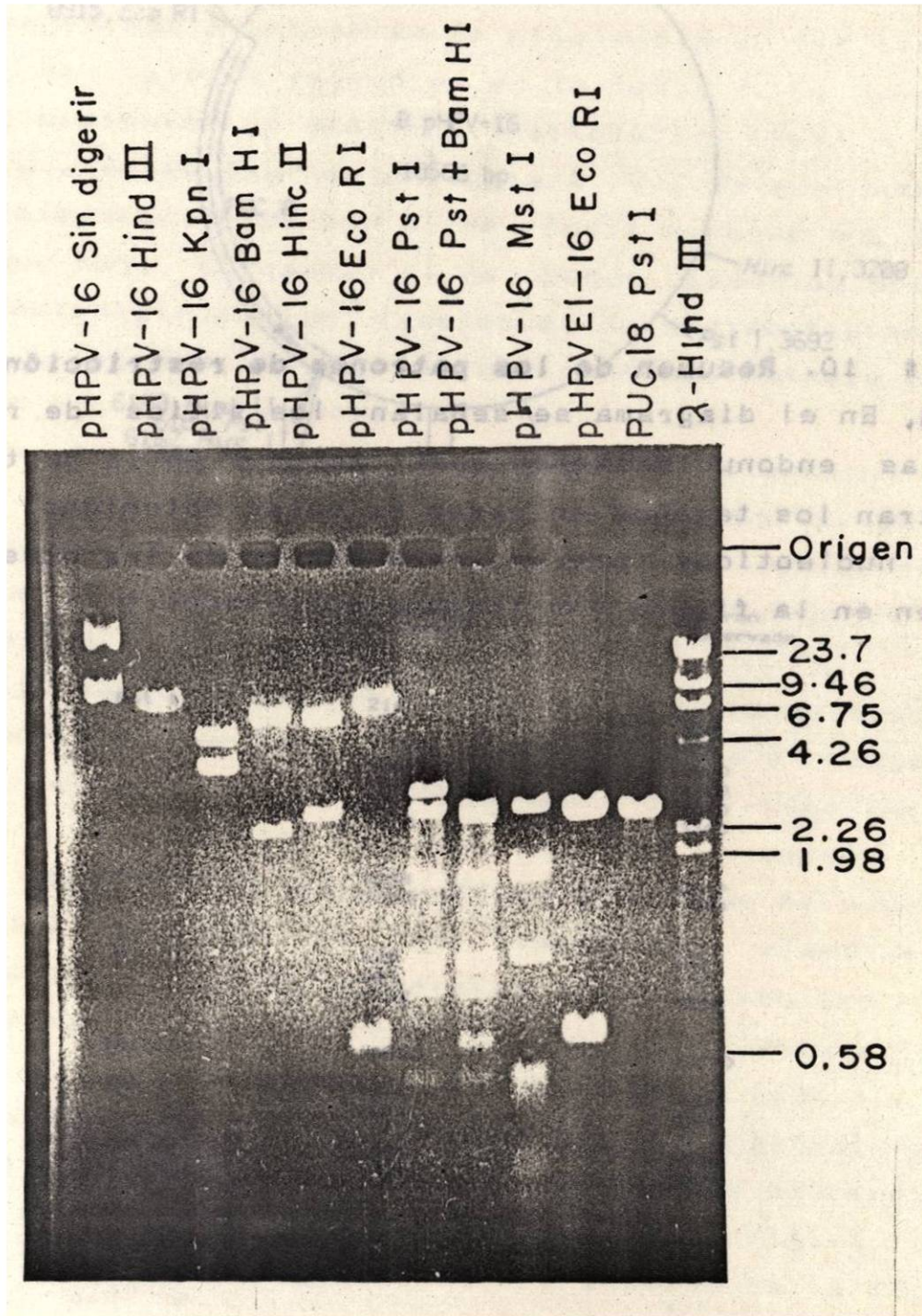
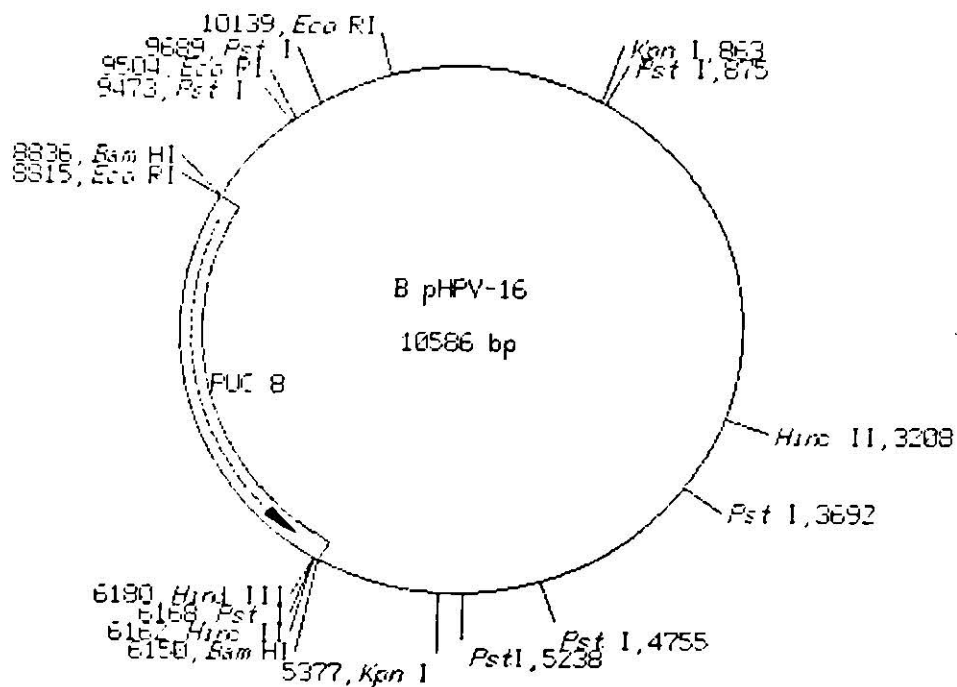


Figura # 10. Resumen de los patrones de restricción del plásmido pHPV-18. En el diagrama se señalan los sitios de reconocimiento de varias endonucleasas de restricción y en la parte inferior se encuentran los tamaños en pares de bases obtenidos de la secuencia de nucleótidos (patron esperado) y de los observados que se incluyen en la figura # 9 (patron observado).



**Figura # 10. RESUMEN DE LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO pHPV-16.**



Enzima	Patron esperado	Patron observado
Pst I	216	—
	483	530
	930	900
	1063	1000
	1772	1700
	2817	2640
	3305	3300
Hinc II	2954	2840
	7632	7000
Eco RI	635	642
	689	703
	9262	9000
Hind III	10586	10340
Kpn I	4514	4200
	6072	5700
Bam HI	2678	2500
	7904	7500

## B. OBTENCION Y ANALISIS DEL DNA GENOMICO

Debido a la gran diversidad de métodos existentes para aislar leucocitos de sangre periférica, decidimos comparar tres de ellos: el de **Ficoll Hypaque** (205), el de **sedimentación** (136,251) y el de **choque osmótico** (200), (Observar la figura # 4). Esta comparación la realizamos con 15 ml de sangre provenientes de tres voluntarios. Dividimos la sangre en tres alícuotas (de 5 ml c/u) y procedimos a comparar la eficiencia de los tres métodos, observando los valores presentes en la tabla # 6, comparamos los resultados mediante un análisis estadístico ANOVA y la comparación múltiple de Newman-Keuls (Tabla # 7). Seleccionamos el método de sedimentación ya que el de ficoll hypaque nos dio un rendimiento muy bajo, en cambio el de choque osmótico presentó rendimientos estadísticamente iguales al de sedimentación, pero los leucocitos obtenidos presentaban una cantidad notable de hemoglobina por lo que lo descartamos.

Ninguno de los tres métodos que evaluamos eliminó la totalidad de los eritrocitos, por lo que utilizamos un lavado selectivo (con una solución normalmente utilizada en el conteo de leucocitos en trabajos clínicos), eliminando efectivamente los eritrocitos sin afectar a los leucocitos.

Una vez seleccionado el método que nos dio mejores resultados en la purificación de leucocitos procedimos a adaptar el método de extracción fenólica de DNA, tanto con leucocitos como con homogenizados de diversos tejidos (hígado, placenta y cervico uterino). Para evaluar la integridad y el peso molecular promedio de nuestras muestras de DNA, realizamos electroforesis en geles de agarosa al 0.6 %, comparamos su migración con el del DNA del bacteriofago lambda en forma íntegra (aproximadamente 49 Kpb) y digerido con la endonucleasa de restricción Hind III, el cual es utilizado en forma rutinaria en nuestro laboratorio ya que nos da un patrón de restricción bien conocido. Las extracciones nos permitieron obtener DNA de alto peso molecular (figura # 11) con un perfil de absorbancia como el que se observa en la figura 12.

**TABLA # 6.**

**PARAMETROS OBTENIDOS AL CONTAR LOS LEUCOCITOS OBTENIDOS POR TRES DIFERENTES METODOS Y DE TRES DIFERENTES INDIVIDUOS.**

VOLUNTARIO	1	2	3
METODO			
A	n = 8 m = 643.7 S = 142.6	n = 14 m = 866.4 S = 184.7	n = 16 m = 709.3 S = 276.8
B	n = 8 m = 1972.5 S = 410.4	n = 19 m = 2912.1 S = 710.2	n = 23 m = 2724.3 S = 349.0
C	n = 8 m = 2145 S = 320.8	n = 16 m = 2864 S = 320.5	n = 16 m = 2000 S = 245.7

TABLA # 7.

EVALUACION DE LOS TRES DIFERENTES METODOS PARA LA PURIFICACION DE LEUCOCITOS POR EL ANALISIS DE VARIANZA Y LA COMPARACION MULTIPLE DE NEWMAN-KEULS.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F obs
Total	23	12830296		
Tratamiento	2	10797559	5398779.5	55.77
Error	21	2032737	96797	

F<sub>0.05 (1) (2) (21)</sub> = 3.47

Comparacion	Dif.	SE	q	p	qe	Con.
2 vs 1	1328.75	110	12.08	2	2.95	M <sub>2</sub> ≠ M <sub>1</sub>
3 vs 1	1501.25	110	13.64	3	3.57	M <sub>3</sub> ≠ M <sub>1</sub>
3 vs 2	172.5	110	1.57	2	2.95	M <sub>3</sub> = M <sub>2</sub>

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F obs
Total	48	51030000		
Tratamiento	2	40978000	2048900	9.376
Error	46	10052000	218521.7	

F<sub>0.05 (1) (2) (46)</sub> = 3.20

Comparacion	Dif.	SE	q	p	qe	Con.
2 vs 1	2045.7	115	12.08	2	2.95	M <sub>2</sub> ≠ M <sub>1</sub>
3 vs 1	1997.95	120.7	16.55	3	3.44	M <sub>3</sub> ≠ M <sub>1</sub>
3 vs 2	47.72	111.7	0.43	2	2.85	M <sub>3</sub> = M <sub>2</sub>

TABLA # 7.

EVALUACION DE LOS TRES DIFERENTES METODOS PARA LA PURIFICACION DE LEUCOCITOS POR EL ANALISIS DE VARIANZA Y LA COMPARACION MULTIPLE DE NEWMAN-KEULS (CONTINUACION).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F obs
Total	54	42310000		
Tratamiento	2	38429000	19214500	257.45
Error	52	3881000	74634.6	

F<sub>0.05 (2) (50)</sub> = 3.18

Comparación	Dif.	SE	q	P	qe	Con.
2 vs 1	2015	61.8	32.57	2	2.82	M <sub>2</sub> ≠ M <sub>1</sub>
3 vs 1	1290.6	68.3	18.9	3	3.44	M <sub>3</sub> ≠ M <sub>1</sub>
3 vs 2	724.34	61.8	11.7	2	2.85	M <sub>3</sub> ≠ M <sub>2</sub>

**Figura # 11. Comportamiento electroforético de DNAs genómicos sin digerir.**

En el primer carril se colocó un  $\mu$ g de DNA de el bacteriofago lambda sin digerir, en el segundo se observa el DNA de lambda digerido con Hind III como marcador de peso molecular. Del tercero al doceavo se colocó un  $\mu$ g de DNA extraído de diversas fuentes, la S representa DNA extraído de sangre periférica, la A DNA de tejidos cervicales sanos, la T DNA de tumor cervicouterino, la P DNA de placenta y finalmente la H DNA de hígado. En el extremo izquierdo se observan los tamaños en kilo pares de bases de los fragmentos del segundo carril.

Figura # 11. COMPORTAMIENTO ELECTROFORETICO DE DNAs GENOMICOS SIN DIGERIR.

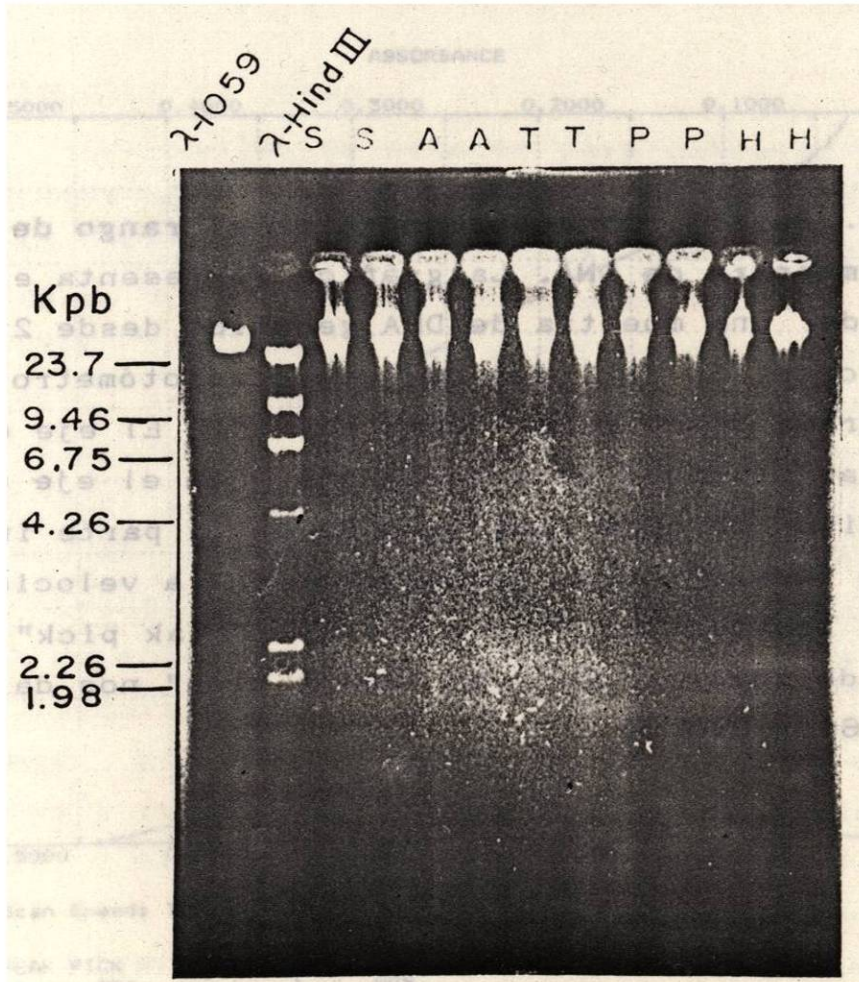
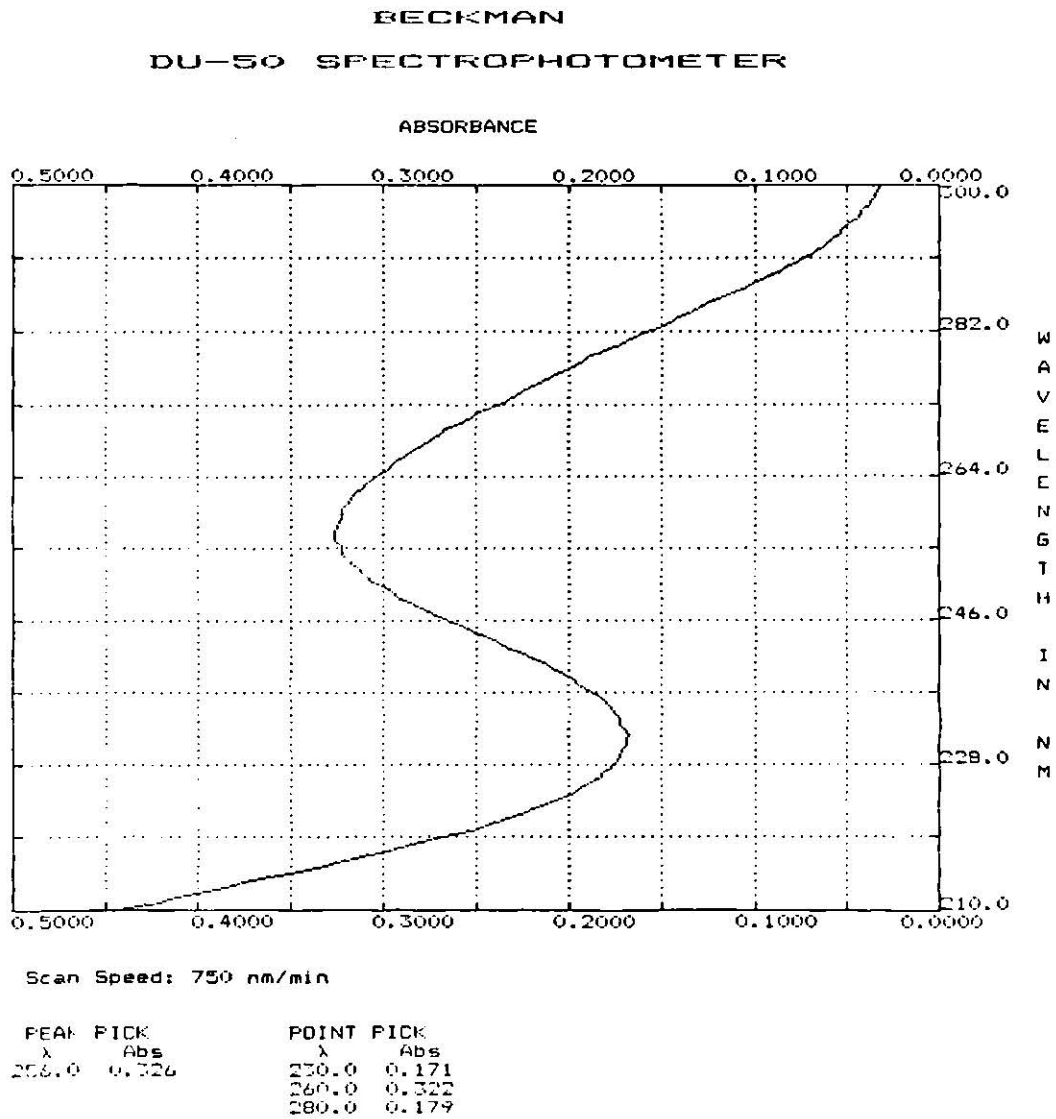


Figura # 12. Perfil de absorbancia en el rango de luz ultravioleta de una muestra de DNA. La gráfica representa el espectro de absorbancia de una muestra de DNA genómico desde 210 a 300 nm de longitud de onda. Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-50 con el programa denominado "Peak point". El eje de las abscisas representa las unidades de absorbancia y en el eje de las ordenadas la longitud de onda. Los valores en la parte inferior representan "Scan Speed", que corresponde a la velocidad en que se realizó la lectura de las muestras. "Peak pick" representa el pico máximo de absorbancia y el "Point pick" nos da la absorbancia a 230, 260 y 280 nm.



Figura # 12. PERFIL DE ABSORBANCIA EN EL RANGO DE LUZ ULTRAVIOLETA DE UNA MUESTRA DE DNA.



Esta figura nos indica que el pico máximo de absorbancia se encuentra en la región de 260 nm, lo que significa que nuestra muestra está representada en su mayor parte por moléculas de DNA. Debido a la gran cantidad de queratina que presentan las muestras de cervix, incluimos 2-mercaptoetanol en las incubaciones con la proteinasa K, lo cual nos ayudó a disgregar el tejido sin afectar las muestras de DNA. Obtuvimos en promedio rendimientos de 1.6 ug de DNA por mg de tejido cervico uterino y de 19.8 ug de DNA por ml de sangre, como se observa en la tabla # 8.

### C. DETECCION DE GENES.

#### 1. Evaluación de métodos para detectar secuencias génicas.

Contrastamos la sensibilidad de dos métodos cromogénicos y del método radiactivo para detectar secuencias específicas de DNA (ver figura # 5). Usamos sondas de biotina y revelamos con estreptavidina acoplada ya sea con fosfatasa alcalina o con peroxidasa, este experimento se realizó con diluciones del plásmido pHPV-16 digerido con Bam HI desde el equivalente a 1000 copias de pHPV-16 por genoma haploide humano hasta 0.28 copias. Cuando usamos sondas marcadas con radiactividad fuimos capaces de detectar 5 copias (130 pg) en solo 12 h de exposición, al exponerlo por 24 h detectamos hasta 1 copia, es decir 26 pg de un genoma de 7.9 Kpb (figura # 13).

Cuando utilizamos al plásmido pHPV-16 marcado con biotina como sonda y revelamos con peroxidasa detectamos en el rango de 15 copias o sea el equivalente a 390 pg de un genoma de 7.9 Kpb (figura # 14). En cambio al utilizar fosfatasa alcalina logramos detectar niveles de 2.5 copia por genoma haploide humano, que equivale a 65 pg de un genoma de 7.9 Kpb (figura # 15).

#### 2. Presencia del genoma de HPV-16 en CaCU.

Técnica directa. Una vez que purificamos el DNA de cada una de las pacientes, por el método descrito en la metodología, aplicamos 10 ug a membranas de nylon por el método de "Dot Blot" figura # 7. Prehibridizamos e hibridizamos el DNA que se encuentra adherido a esta membrana de acuerdo con el protocolo descrito

**TABLA # 8. RENDIMIENTO EN LA EXTRACCION DE DNA DE TEJIDO CERVICAL Y SANGRE PERIFERICA DE LOS PACIENTES ANALIZADOS.**

Fuente	Rango	Número	Media	Varianza
Tejido cervical	0.6-3.4 (ug/mg)	30	1.6	0.54
Sangre Venosa	10-40 (ug/ml)	24	19.80	68.0

**Figura # 13. Experimento para determinar los niveles inferiores de detección de la técnica de Southern usando  $^{32}\text{P}$ .**

Se corrieron en un gel de agarosa diluciones del plásmido pHPV-16 digerido con Bam HI desde 17.5 ng (el equivalente a 500 copias por cada 10 ug de genoma haploide) hasta 10 pg (0.28 copias) del mismo plásmido, se utilizó la técnica de "Southern", hibridizándolo con el plásmido pHPV-16 radiactivo, se lavó en 0.1X SSC a 60°C por una hora y se expuso en una placa por 12 h (fotografía superior), se observa una banda en el carril # 8 (2.5 copias), el equivalente a 65 pg de una banda de 7.9 Kpb. En la fotografía inferior se muestra una exposición por 24 h logrando detectar una banda en el carril # 9 (1 copia) el equivalente a 26 pg de un gen de 7.9 kpb.



**Figura # 14. Experimento para determinar los niveles inferiores de detección de la técnica de Southern usando peroxidasa.**

Se corrieron en un gel de agarosa diluciones del plásmido PHPV-16 digerido con Bam HI desde 35 ng, (el equivalente a 1000 copias por cada 10 ug de genoma haploide) hasta 87.5 pg (2.5 copias), se utilizó la técnica de "Southern", hibrizandolo con el plásmido PHPV-16 marcado con biotina, se lavó en 0.1X SSC a 60°C por una hora. Se observan señales claras al utilizar estreptavidina marcada con peroxidasa, hasta el nivel de 15 copias o sea el equivalente a 390 pgr de un gen de 7.9 Kpb.

**Figura # 14. EXPERIMENTO PARA DETERMINAR LOS NIVELES INFERIORES DE DETECCION DE LA TECNICA DE SOUTHERN USANDO PEROXIDASA.**

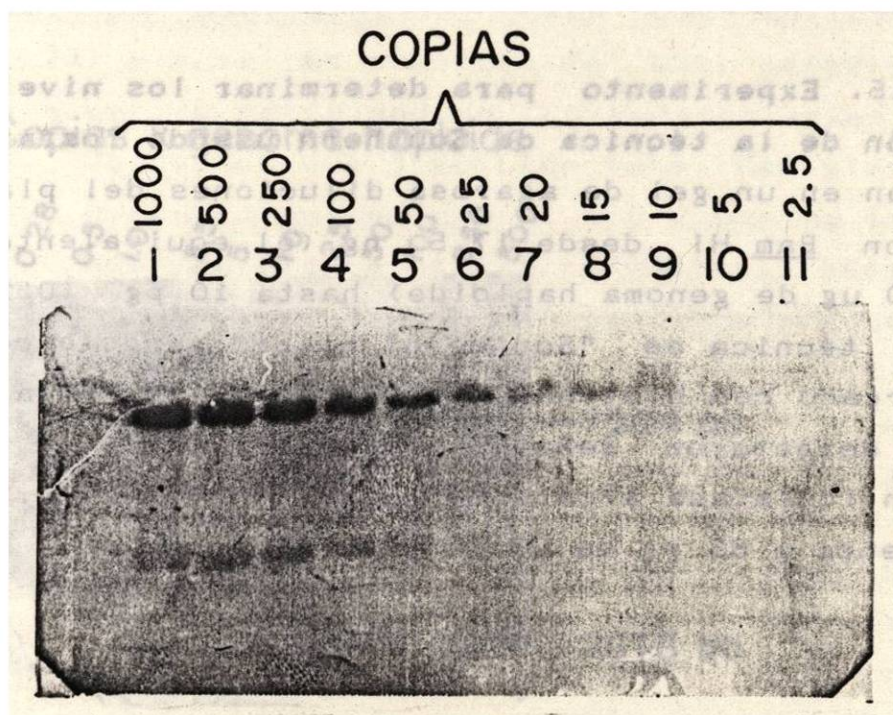
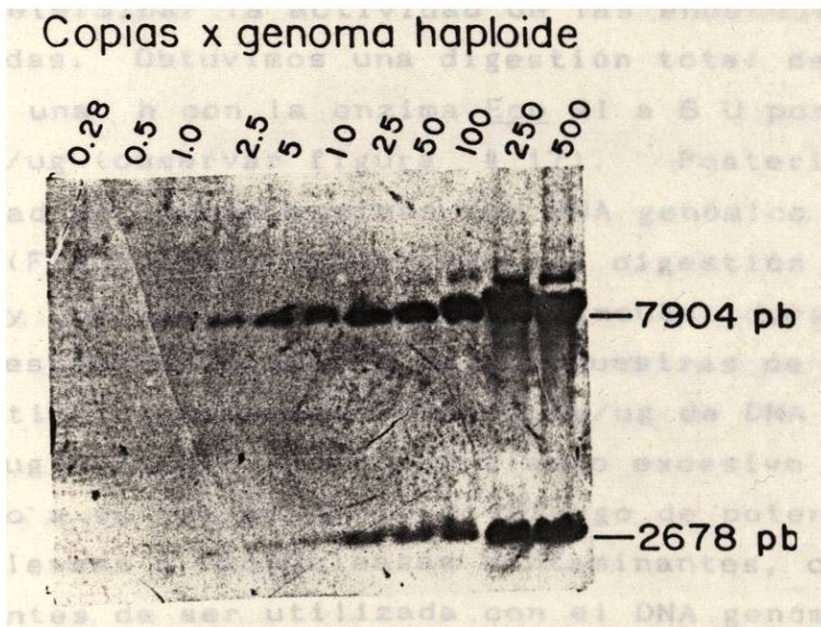


Figura # 15. Experimento para determinar los niveles inferiores de detección de la técnica de Southern usando fosfatasa alcalina. Se corrieron en un gel de agarosa diluciones del plásmido pHPV-16 digerido con Bam HI desde 17.5 ng (el equivalente a 500 copias por cada 10 ug de genoma haploide) hasta 10 pg (0.28 copias), se utilizó la técnica de "Southern" hibridizandolo con el plásmido pHPV-16 marcado con biotina, se lavó en 0.1 X SSC a 60°C por una hora. Se detectaron señales claras por medio de estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina hasta el nivel de 2.5 copias o sea el equivalente a 65 pg de un gen de 7.9 Kpb.



Figura # 15. EXPERIMENTO PARA DETERMINAR LOS NIVELES INFERIORES DE DETECCION DE LA TECNICA DE SOUTHERN USANDO FOSFATASA ALCALINA.



para membranas de nylon y lavamos la membrana en SSC 2 X a 60°C por una h. Por un defecto en el aparato utilizado "manifold" dañamos la membrana en la region que comprende las lineas siete y ocho, lo que ocasiono atrapamiento inespecífico de radiactividad, apesar de que en dicha region no colocamos muestras (figura # 16), sin embargo cuando lavamos la membrana en condiciones muy estrictas (65°C en SSC 0.1 X) eliminamos la mayor cantidad de inespecificidad sin perder la específica. Detectamos señales claramente distinguibles en las muestras T0, T1, T5, T7, T8, T10, S6, T13, T16, T17, NT4 y en una muestra de DNA obtenida de un condiloma acuminado de la region vulvar de una mujer de 27 años.

Técnica de Southern. Para poder aplicar la técnica de Southern (239) a nuestras muestras de DNA, primeramente procedimos a determinar la actividad de las endonucleasas de restricción utilizadas. Obtuvimos una digestión total del plásmido pBR322 al incubar una h con la enzima Eco RI a 6 U por ug de DNA y con Pst I a 3 U/ug (observar figura # 17). Posteriormente probamos la actividad de ambas enzimas con DNA genómico por medio de una cinética (Figura 18), observando una digestión total con 6 U/ug de Eco RI y con 3 U/ug de Pst I, al incubar durante 12 h. Para evitar digestiones parciales en las muestras de DNA genómico, decidimos utilizar un exceso de enzima/ug de DNA (12 U/ug para Eco RI y 10 U/ug para Pst I) por un tiempo excesivo (16 h). Puesto que con esto a su vez se corre el riesgo de potenciar la actividad de endonucleasas o exonucleasas contaminantes, cada enzima fué probada, antes de ser utilizada con el DNA genómico, con un plásmido que presenta un sitio de reconocimiento único para dicha enzima en cantidad excesiva con incubaciones prolongadas de varios días. Al hacer esto, en caso de que la enzima presente contaminación por algunas endonucleasas o exonucleasas observaríamos patrones diferentes al esperado y/o un barrido, correspondiente a degradación del DNA. Sin embargo, no pudimos detectar este tipo de actividad contaminante en las enzimas probadas. Seleccionamos nuestras mejores muestras en base a la concentración obtenida

Figura # 16. **Análisis de muestras de DNAs genómicos por la técnica de "Dot Blot".** Se aplicaron 10 ug de DNA en cada uno de los sitios indicados a continuación por medio del aparato mostrado en la figura # 7. Se hibridizó con el plásmido pHPV-16 marcado radiactivamente siguiendo la metodología descrita en la sección de métodos. La fotografía representa la autorradiografía del filtro después de ser hibridizado y lavado en SSC 2X a 60°C por una hora.

En los sitios A1 a L1, A3 a L3 y A5 a F5 se colocaron las muestras de DNA de los tumores ginecológicos T0-T11, T12-T23 y TA-TF respectivamente. En el sitio G5 se colocó el DNA de la muestra cervical de la paciente con cervicitis inespecífica, en los sitios H5 a K5 el de algunos condilomas acuminados. Finalmente, se colocó el DNA testigo, extraído de la sangre de cada una de las pacientes, en los sitios A2 a L2, A4 a L4 y A6 a L6, cada una debajo de su muestra problema. Las señales de las líneas inferiores (7 y 8) donde no se colocaron muestras, son el resultado de artefactos producidos al maltratar el papel por la aplicación accidental de un exceso de presión por el aparato en esa región del filtro.



Figura # 17. Actividades de las endonucleasas de restricción Eco RI y Pst I, determinadas por cinéticas enzimáticas. En cada carril se corrieron 200 ng del plásmido pBR322 que fué incubado con diferentes U/ug de Eco RI (Figura superior) y Pst I (figura inferior) por una h a 37°C.

Figura # 17. ACTIVIDADES DE LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION Eco RI Y Pst I DETERMINADAS POR CINETICAS ENZIMATICAS.

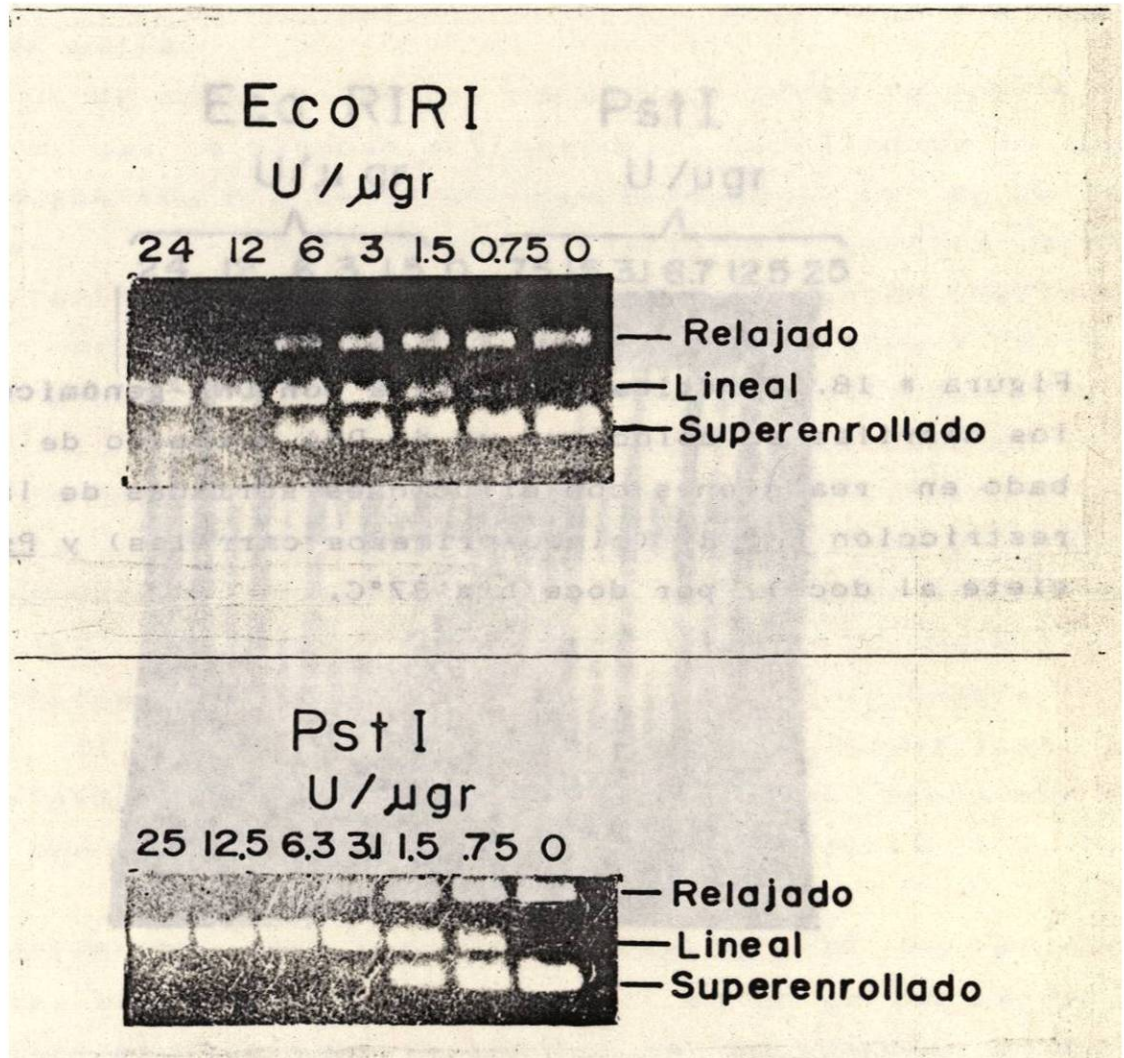
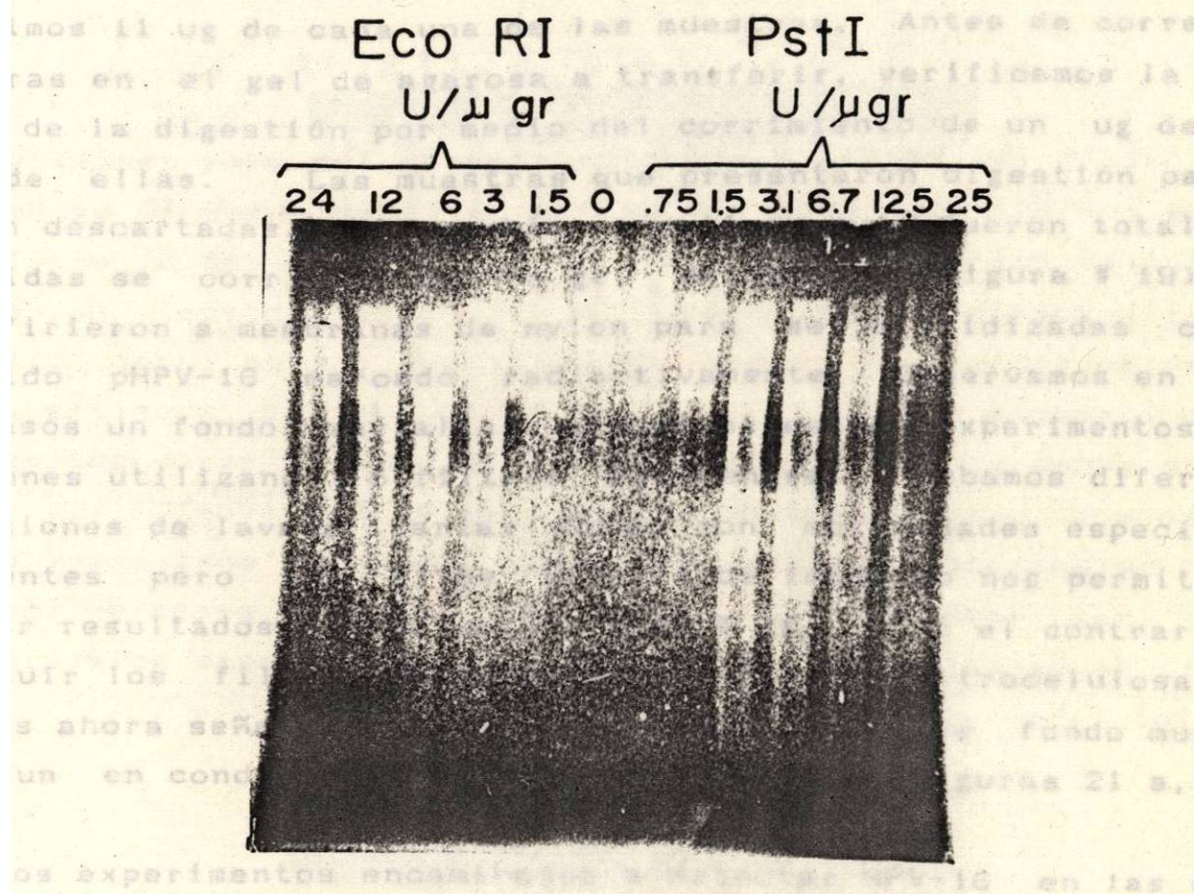


Figura # 18. **Cinética enzimática con DNA genómico.** En cada uno de los carriles se colocó un ug de DNA extraído de placenta e incubado en reacciones con diluciones seriadas de la endonucleasa de restricción Eco RI (cinco primeros carriles) y Pst I (del carril siete al doce), por doce h a 37°C.

Figura # 18. CINETICA ENZIMATICA CON DNA GENOMICO.





(más de 50 ug), a su pureza (relación 260/280 > 1.7) y a su integridad.

Aislamos DNA en cantidad y calidad aceptable de 30 muestras cervicales, seis fueron de pacientes que sufrieron histerectomía radical por padecer de relajaciones pélvicas sin signos citológicos de anormalidad, tres del estadio III, cuatro de cada uno de los estadios I y IV, nueve del estadio II, un caso de Ca epidermioide de cúpula, uno de cervicitis inespecífica, uno de NIC III y uno de Ca de vulva.

Digerimos 11 ug de cada una de las muestras. Antes de correr las muestras en el gel de agarosa a transferir, verificamos la totalidad de la digestión por medio del corrimiento de un ug de cada una de ellas. Las muestras que presentaron digestión parcial fueron descartadas. En cambio aquellas que fueron totalmente digeridas se corrieron en un gel de agarosa (figura # 19) y se transfirieron a membranas de nylon para ser hibridizadas con el plásmido pHPV-16 marcado radiactivamente. Observamos en todos los casos un fondo muy alto, repetimos estos experimentos en 4 ocasiones utilizando 5 filtros diferentes. Probamos diferentes condiciones de lavado, varias sondas con actividades específicas diferentes pero los altos niveles de fondo no nos permitieron obtener resultados confiables (figura # 20). Por el contrario al sustituir los filtros de nylon por filtros de nitrocelulosa, obtuvimos ahora señales muy nítidas, con niveles de fondo muy bajos, aun en condiciones de baja astringencia (figuras 21 a, b, c y 22).

Los experimentos encaminados a detectar HPV-16 en las muestras cervicales consistieron en transferir de un gel de agarosa a filtros de nitrocelulosa (por la técnica de "Southern") 10 muestras de DNA (10 ug de cada una) procedentes de tejido cervical, 10 ug de DNA de placenta y 10 ug de DNA de linfocitos (como testigos negativos) y el equivalente a 1, 10 y 100 copias x genoma haploide del genoma de HPV-16 liberado del vector (como control positivo y para cuantificar el número de copias). Los filtros se lavaron en dos condiciones diferentes. La primera, 50°C en SSC

Figura # 19. Perfil electroforético de los DNAs genómicos digeridos con Eco RI. Cada uno de los carriles posee 10 ug de DNA digeridos con la endonucleasa de restricción Eco RI por 16 h, bajo las condiciones adecuadas. En la parte superior de cada carril se identifica el origen del DNA, que fué de tumor (T1 a T10), o de placenta humana (P). La intensidad de las muestras se observa homogénea y la digestión total se infiere, tanto por este criterio como por la presencia de bandas de DNA repetitivo, las cuales no se aprecian en esta fotografía debido al contraste. En la parte izquierda se indica la posición (en kilo pares de bases) de las bandas obtenidas con el marcador de peso molecular ( $\lambda$  Hind III).

Figura # 19. PERFIL ELECTROFORETICO DE LOS DNAs GENOMICOS DIGERIDOS CON Eco RI.

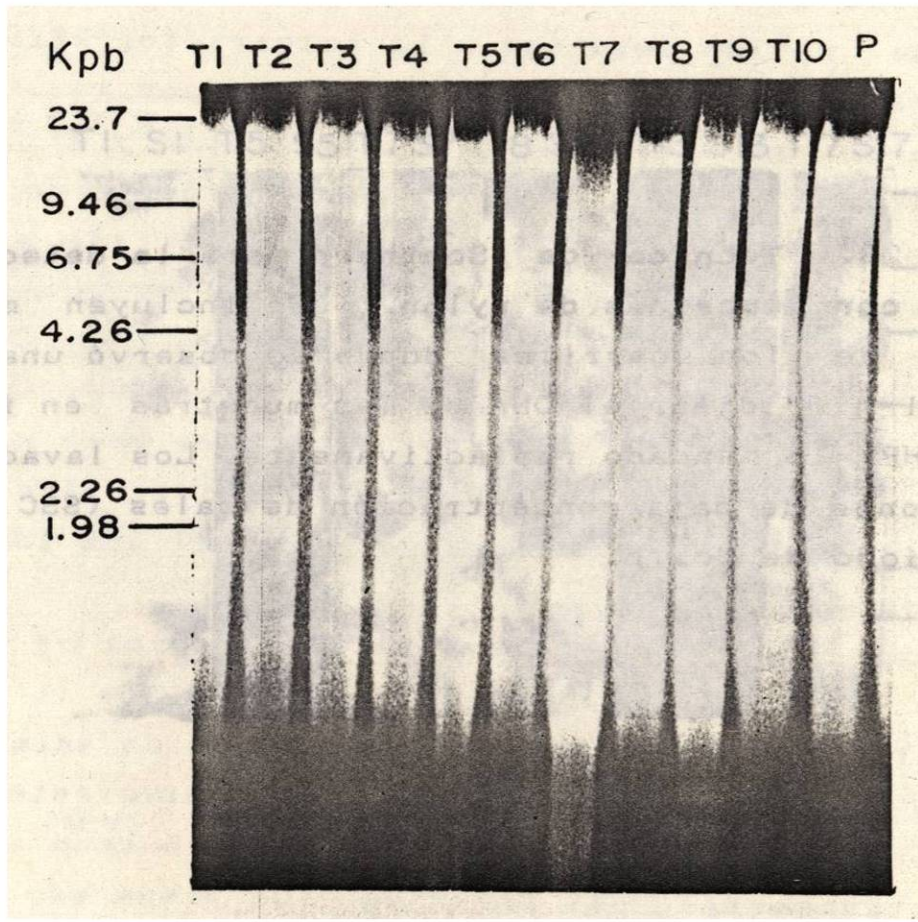


Figura # 20. Técnica de Southern para la detección de HPV-16 practicada con membranas de nylon. Se incluyen muestras representativas de los carriles donde se observó una posible señal positiva al hibridizar el DNA de las muestras en filtros con el plásmido pHPV-16 marcado radiactivamente. Los lavados se hicieron en condiciones de baja concentración de sales (SSC 0.1 X) a 65°C por un periodo de dos h.

Figura # 20. TECNICA DE SOUTHERN PARA LA DETECCION DE HPV-16 PRACTICADA CON MEMBRANAS DE NYLON.

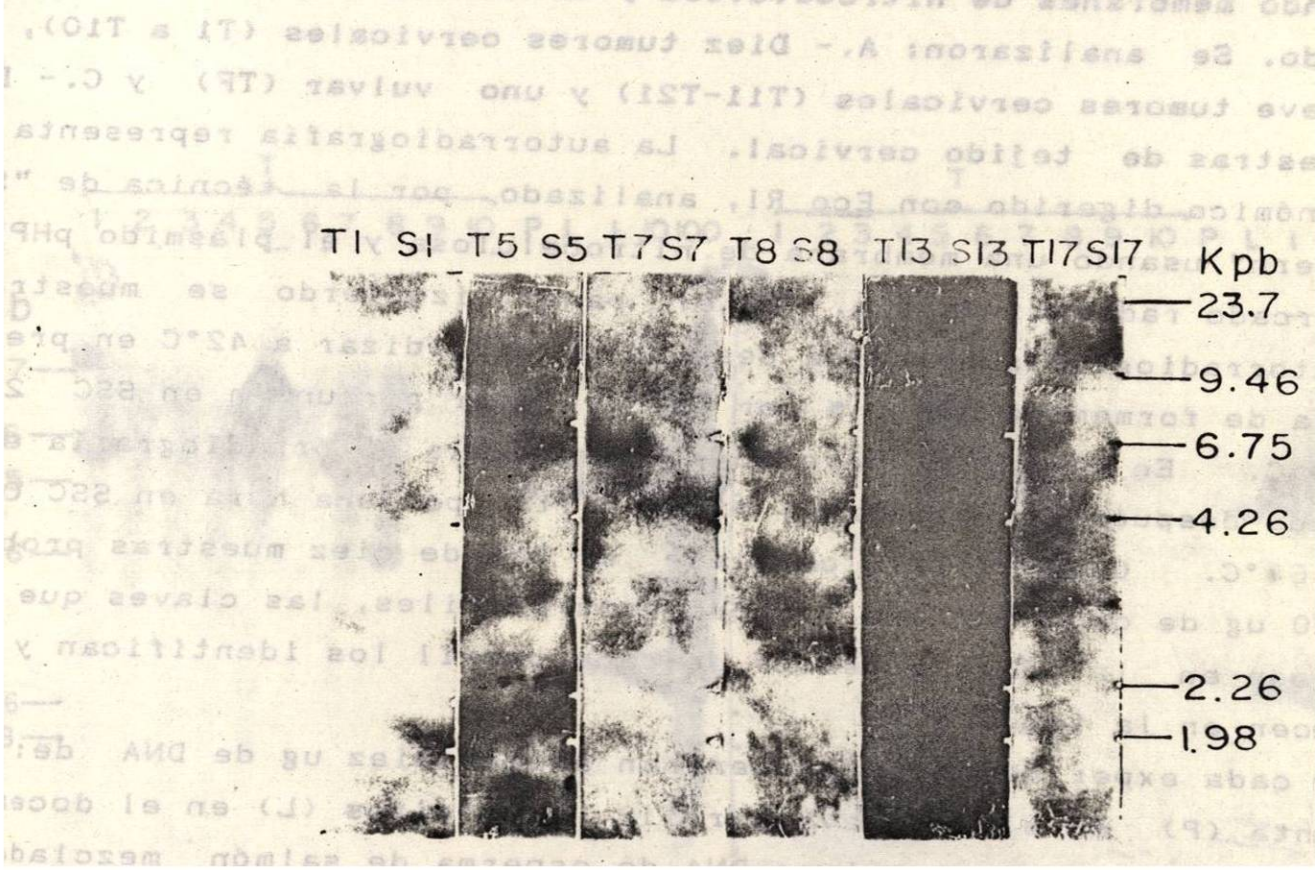


Figura # 21. Técnica de Southern para la detección de HPV-16 usando membranas de nitrocelulosa y diferentes condiciones de lavado. Se analizaron: A.- Diez tumores cervicales (T1 a T10), B.- Nueve tumores cervicales (T11-T21) y uno vulvar (TF) y C.- Diez muestras de tejido cervical. La autorradiografía representa DNA genómico digerido con Eco RI, analizado por la técnica de "Southern" usando una membrana de nitrocelulosa y el plásmido pHPV-16 marcado radiactivamente. En el panel izquierdo se muestra la autorradiografía obtenida después de hibridizar a 42°C en presencia de formamida al 20 % por 16 h y lavar por una h en SSC 2 X a 50°C. En el panel derecho se observa la autorradiografía obtenida después de relavar el mismo filtro por una hora en SSC 0.1 X a 6°C. Cada filtro contiene el DNA de diez muestras problema (10 ug de cada una) en los primeros carriles, las claves que aparecen en la parte superior de cada carril los identifican y aparecen en la tabla # 9.

En cada experimento se encuentran además diez ug de DNA de: placenta (P) en el onceavo carril, leucocitos (L) en el doceavo y del carril trece al quince DNA de esperma de salmón mezclado con cantidades variables de pHPV-16, el equivalente a 1, 10 y 100 copias por cada diez ug de DNA genómico humano (35, 350 y 3,500 pg respectivamente). El plásmido fué preparado como se indica e ilustra en las figuras 13 a 15 y sus respectivas leyendas.

Figura # 21 A.

TECNICA DE SOUTHERN PARA LA DETECCION DE HPV-16 USANDO MEMBRANAS DE NITROCELULOSA Y DIFERENTES CONDICIONES DE LAVADO. ANALISIS DE DIEZ TUMORES CERVICALES, T1 A T10.

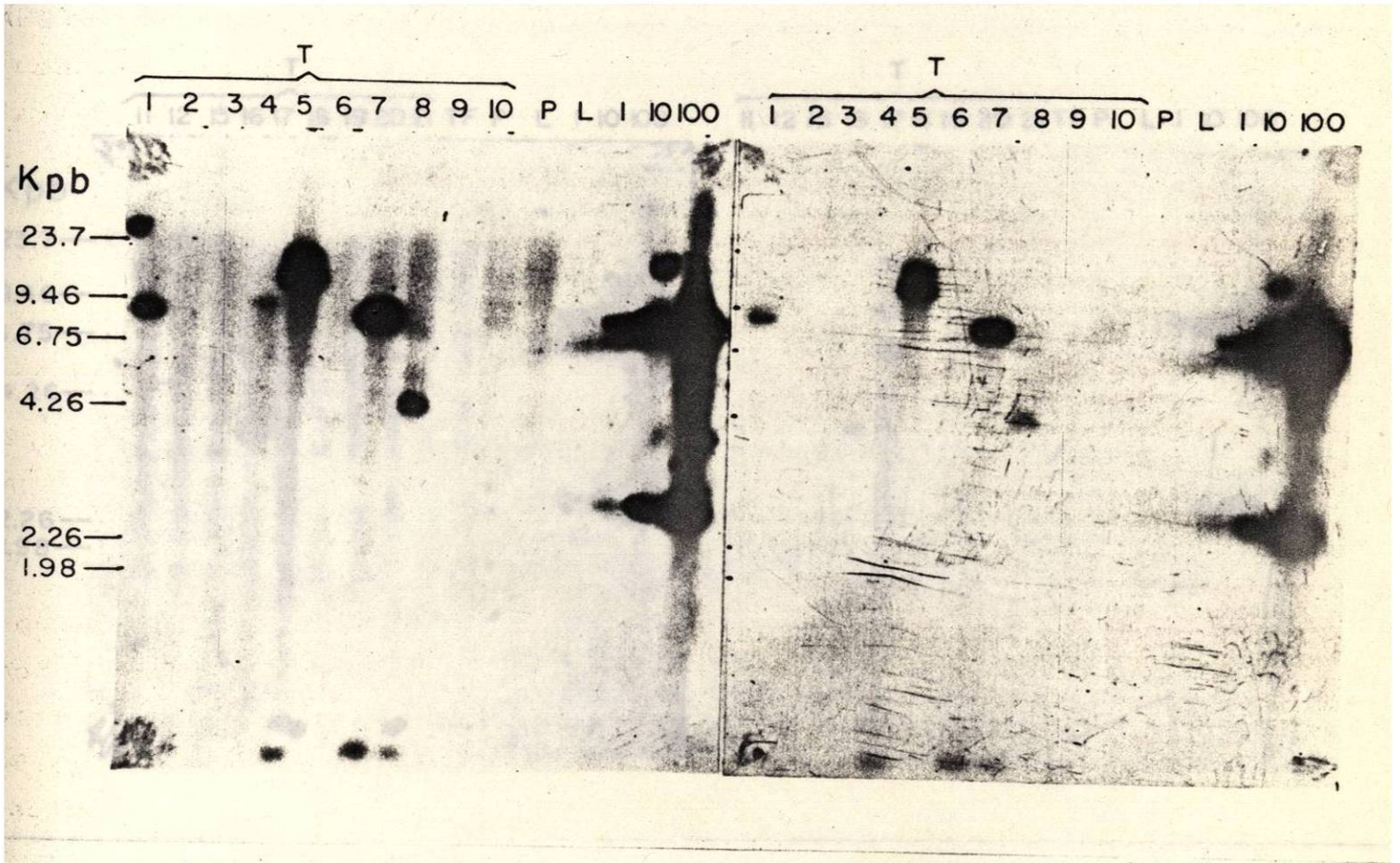


Figura # 21 B.

TECNICA DE SOUTHERN PARA LA DETECCION DE HPV-16 USANDO MEMBRANAS DE NITROCELULOSA Y DIFERENTES CONDICIONES DE LAVADO. ANALISIS DE NUEVE TUMORES CERVICALES Y UNO VULVAR.

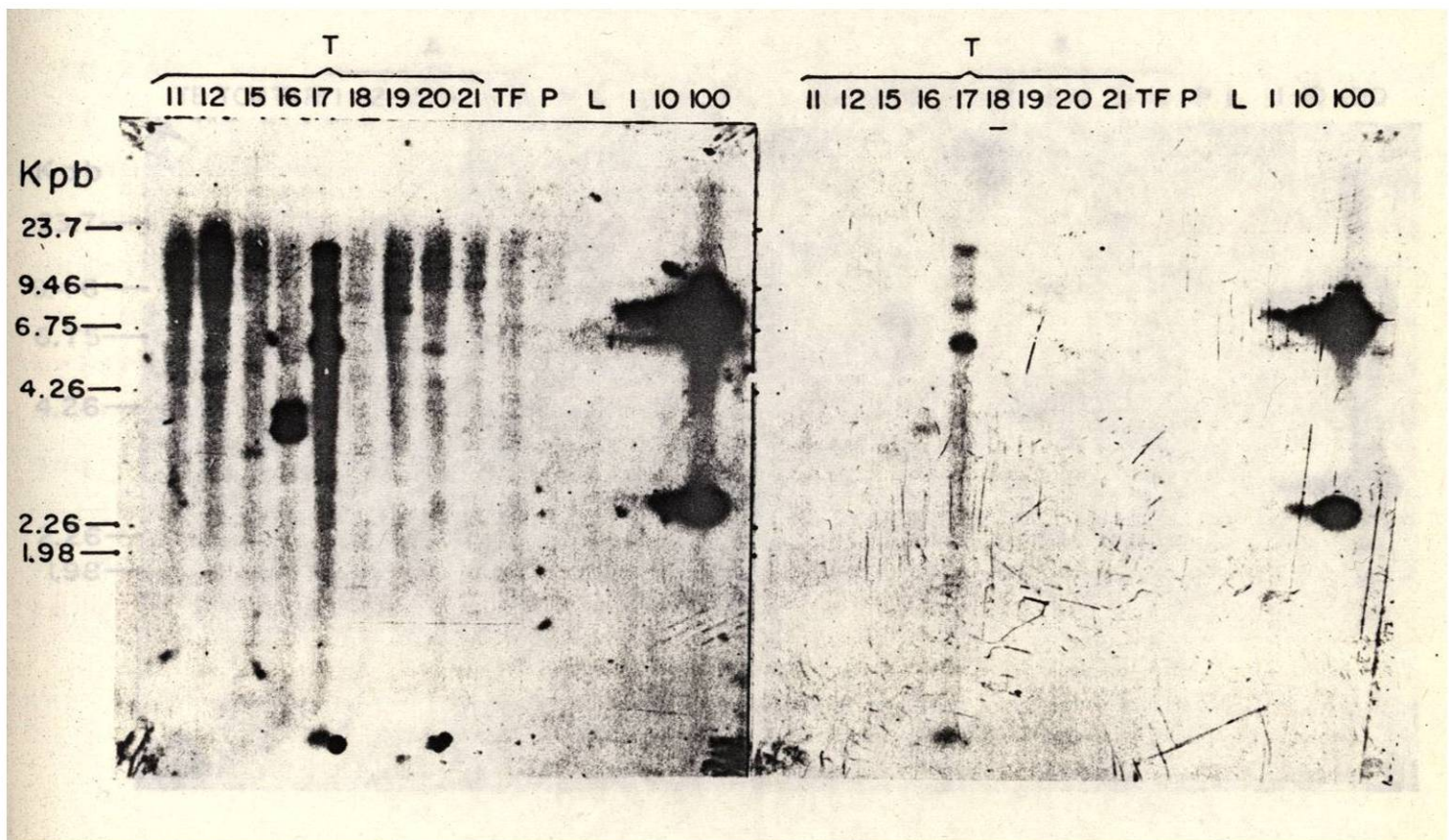




Figura # 21 C.

TECNICA DE SOUTHERN PARA LA DETECCION DE HPV-16 USANDO MEMBRANAS DE NITROCELULOSA Y DIFERENTES CONDICIONES DE LAVADO. ANALISIS DE DIEZ MUESTRAS DE TEJIDO CERVICAL.

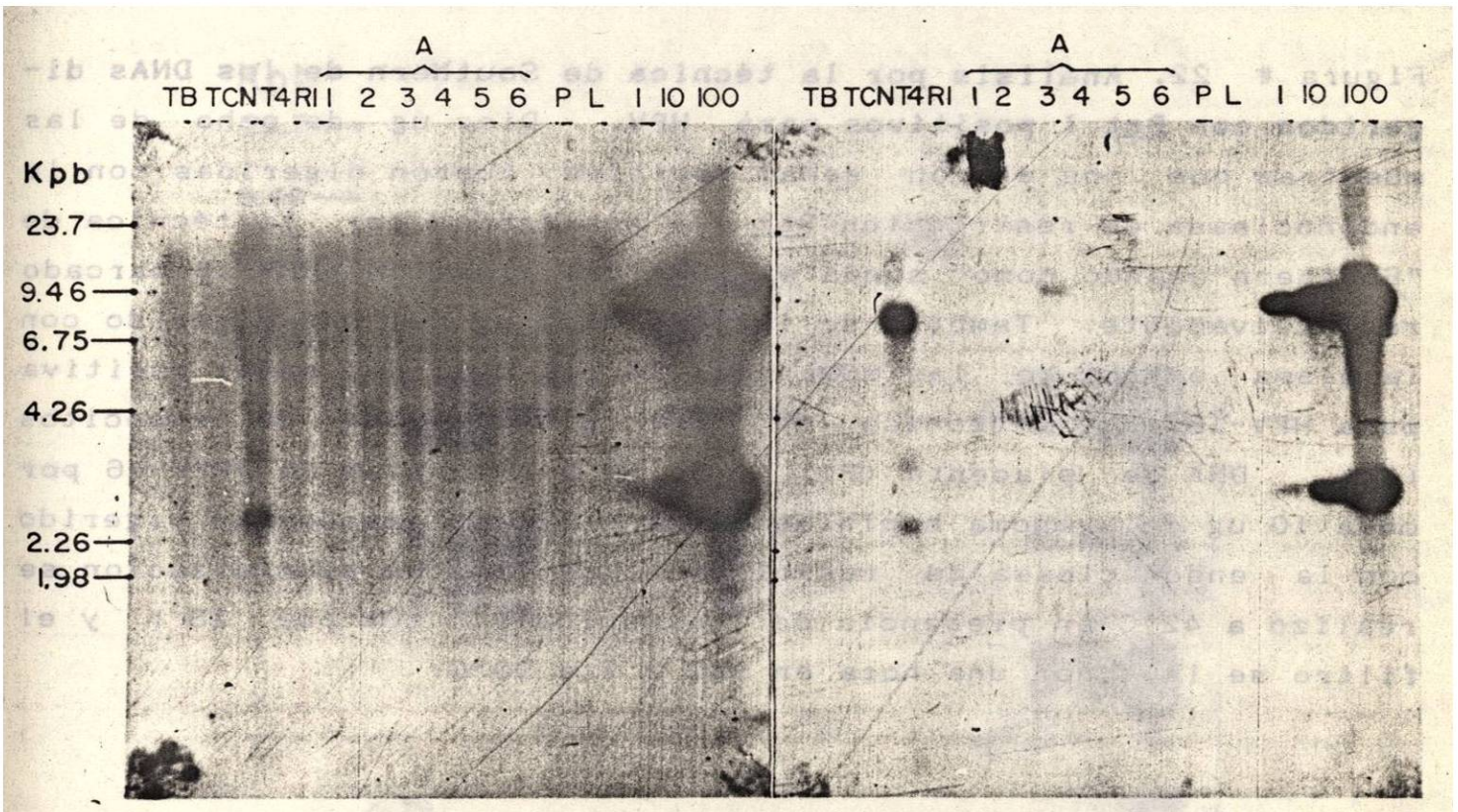
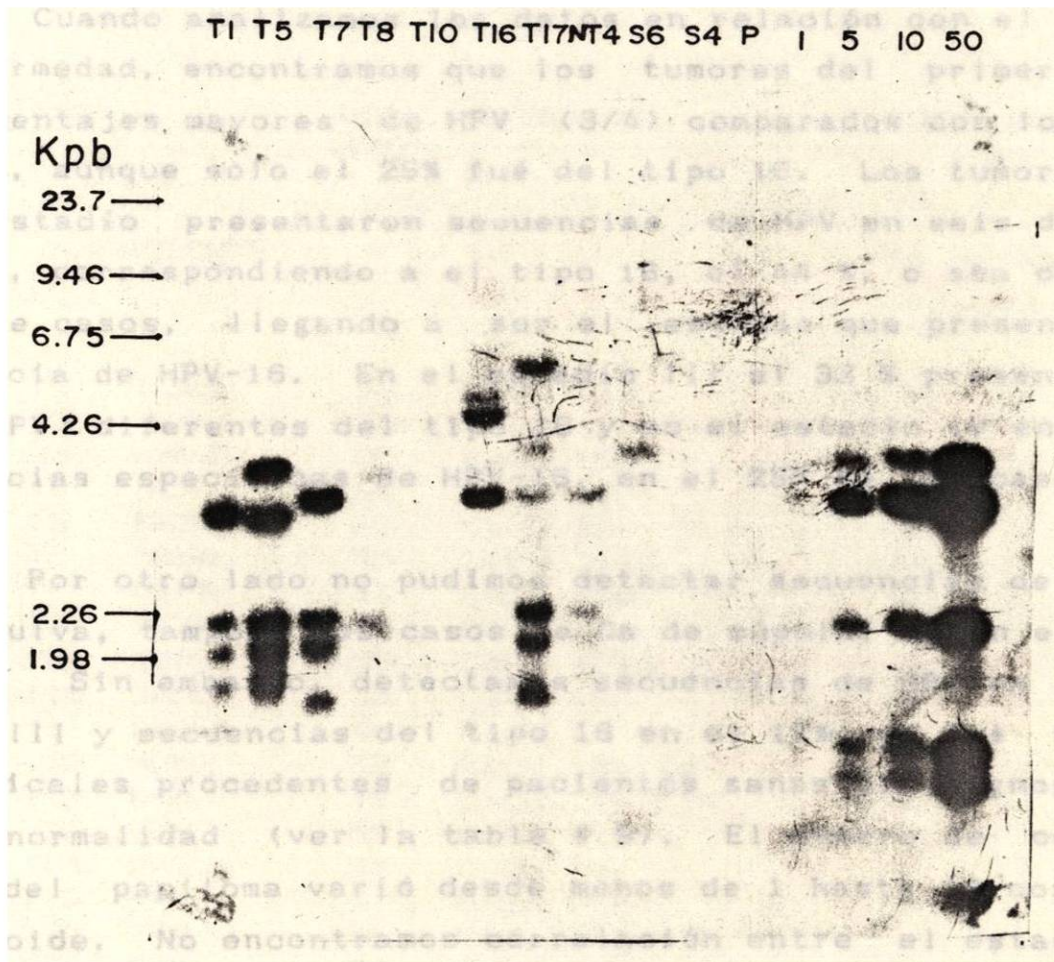


Figura # 22. Análisis por la técnica de Southern de los DNAs digeridos con Pst I positivos para HPV. Diez ug de ocho de las muestras que nos dieron señal positiva fueron digeridas con la endonucleasa de restricción Pst I y analizadas por la técnica de "Southern" usando como sonda el DNA del plásmido pHPV-16 marcado radiactivamente. También se incluye diez ug del DNA digerido con la misma enzima de las muestras: S6 (la cual dio señal positiva para HPV-16 por la técnica de "Dot Blot"), DNA de leucocitos (S4), DNA de placenta (P); 1, 5, 10 y 50 copias de pHPV-16 por cada 10 ug de genoma haploide humano. El plásmido fué digerido con la endonucleasa de restricción Pst I. La hibridización se realizó a 42°C en presencia de formamida al 20% por 16 h y el filtro se lavó por una hora en SSC 2 X a 50°C.

Figura # 22. ANALISIS POR LA TECNICA DE SOUTHERN DE LOS DNAs DIGERIDOS CON Pst I POSITIVOS PARA HPV.



2X, para localizar secuencias del DNA de HPV y la segunda, 60°C en SSC 0.1 X, para detectar solo a HPV-16 (figura 21 a, b y c). Detectamos secuencias de HPV en 11 de las 20 muestras (55%) al utilizar condiciones de hibridización y lavado relajadas (tm-40°C). Al relavar el mismo filtro en condiciones severas (tm-20°C) la señal permaneció en seis muestras, 30 % de los 20 casos de CaCU. Puesto que en estas condiciones de lavado son específicas para alta similitud consideramos que estas últimas señales provienen únicamente del HPV-16 (tabla # 9).

Cuando analizamos los datos en relación con el estadio de la enfermedad, encontramos que los tumores del primero presentaron porcentajes mayores de HPV (3/4) comparados con los otros estadios, aunque solo el 25% fué del tipo 16. Los tumores del segundo estadio presentaron secuencias de HPV en seis de nueve muestras, correspondiendo a el tipo 16, el 44 %, o sea cuatro de los nueve casos, llegando a ser el estadio que presentó mayor frecuencia de HPV-16. En el estadio III el 33 % presentó secuencias de HPV diferentes del tipo 16 y en el estadio IV encontramos secuencias específicas de HPV-16, en el 25% de los casos (figura # 23).

Por otro lado no pudimos detectar secuencias de HPV en el Ca de vulva, tampoco los casos de Ca de cúpula, ni en el de cervicitis. Sin embargo, detectamos secuencias de HPV en la biopsia de NIC III y secuencias del tipo 16 en el 17% de las seis muestras cervicales procedentes de pacientes sanas sin signos citológicos de anormalidad (ver la tabla # 9). El número de copias del virus del papiloma varió desde menos de 1 hasta 10 copias x genoma haploide. No encontramos correlación entre el estadio y el número de copias (Tabla # 9).

De las muestras positivas, seleccionamos nueve, las digerimos con Pst I, las procesamos por la técnica de "Southern", hibridizando contra pHPV-16, y lavamos en SSC 2X a 50°C (ver figura # 21). El tamaño de los fragmentos observados con ambas enzimas se presenta en la tabla # 10. Observamos además en una muestra de DNA extraída de sangre (S6), positiva por el método de la gota

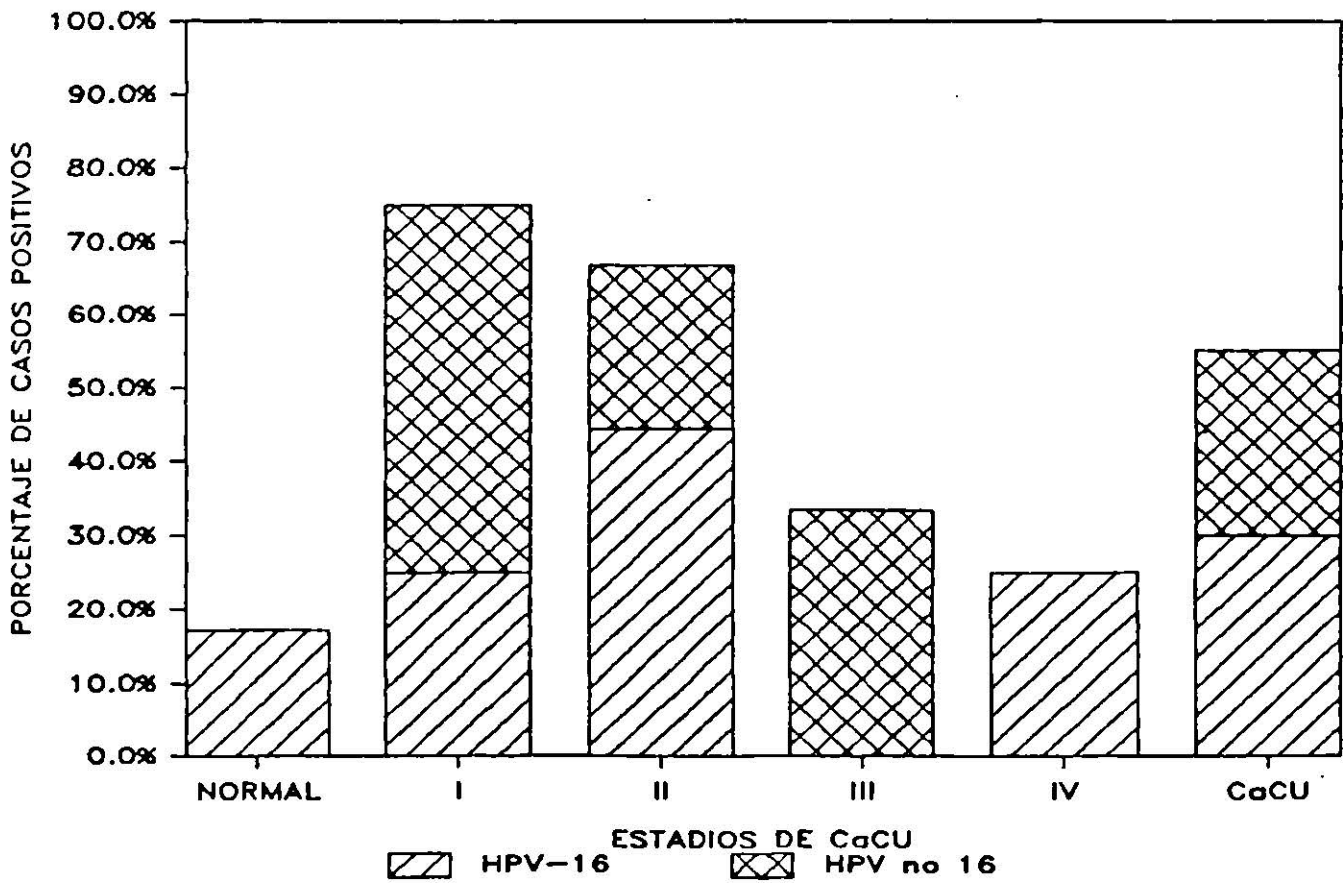
TABLA # 9.

RESUMEN DE LAS CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS Y DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

MUESTRAS	PACIENTE	EDAD AÑOS	ESTADIOS	PRESENCIA DEL DNA DE PAPILOMAVIRUS		número de copias	
				Tm de lavado -40	-20		
1.-	T1	MCRS	59	CaCU IIB	+	+	1-10
2.-	T2	IEB	34	CaCU cúpula.	-	-	
3.-	T3	LMVJ	60	CaCU IIB	-	-	
4.-	T4	GCM	61	CaCU IB	+	-	< 1
5.-	T5	MBB	65	CaCU IA	+	+	5-10
6.-	T6	MAGA	45	CaCU IIIB	-	-	
7.-	T7	MIPR	43	CaCU IIB	+	+	5-10
8.-	T8	MLTH	30	CaCU IIB	+	+	1-5
9.-	T9	JBP	53	CaCU IIIA	-	-	
10.-	T10	JARL	35	CaCU IV	-	-	
11.-	T11	APP	48	CaCU IA	-	-	
12.-	T12	MEMR	33	CaCU IB-IIA	+	-	1
13.-	T15	FLA	49	CaCU II-IIIA	+	-	< 1
14.-	T16	MSM	58	CaCU II	+	-	1-5
15.-	T17	PML	54	CaCU IV	+	+	5-10
16.-	T18	JHE	47	CaCU IIB	-	-	
17.-	T19	SFR	35	NIC III	+	-	< 1
18.-	T20	BBA	54	CaCU IIB	+	-	< 1
19.-	T21	EMM	36	CaCU IIB	-	-	
20.-	TB	AMM	52	CaCU IIIB-IV	-	-	
21.-	TC	CRG	73	CaCU IV	-	-	
22.-	TF	MYMM	45	Ca de Vulva.	-	-	
23.-	NT4	CRM	48	CaCU IIB	+	+	1-5
24.-	A1	MSP	53	Normal.	-	-	
25.-	A2	VGG	38	Normal.	-	-	
26.-	A3	DER	44	Normal.	+	+	< 1
27.-	A4	MRM	39	Normal.	-	-	
28.-	A5	CLM	55	Normal.	-	-	
29.-	A6	MTS	43	Normal.	-	-	
30.-	R1	MLZL	45	Cervicitis	-	-	
				TOTAL	13	7	

Figura # 23. Resumen gráfico de los resultados obtenidos en la detección de HPV en las muestras cervicales. El eje de las ordenadas representa el porcentaje de muestras positivas, en el de las abscisas se muestran seis categorías, la primera representa seis tejidos cervicales sanos. Los números romanos del I al IV representan los estadios de las muestras de CaCU. Se analizaron cuatro muestras de los estadios I y IV, tres del estadio III y nueve muestras del estadio II. En la última columna se presentan los datos obtenidos de las 20 muestras de CaCU analizadas. La altura total de la columna representa el porcentaje de secuencias de HPV, la región de rayas inclinadas representa las secuencias de HPV-16 y la región de cuadrícula, secuencias de HPV que no corresponden al tipo 16.

Figura # 23. RESUMEN GRAFICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETECCION DE HPV EN LAS MUESTRAS CERVICALES.



seca (figura # 16), una banda de 4 Kpb al ser digerida con Pst I (figura # 22 carril # 9).

En la muestra T1, procesada con la enzima Eco RI, observamos una banda de aproximadamente 8.2 Kpb y al cortarla con la endonucleasa Pst I observamos cuatro bandas, de las cuales al menos dos (2.3 y 2.0 Kpb) no concuerdan con el patron esperado. En la muestra T5 observamos tres bandas (15.3, 12 y 1 Kpb). Al digerir esta muestra (T5) con Pst I encontramos un patron parecido al de la muestra T1, más una banda de 3.5 Kpb. La muestra T7 es la que concuerda más con el patron esperado para HPV-16 en forma libre como episoma. Observamos dos bandas de bajo peso molecular (4.2 y 1 Kpb) en la muestra T8 digerida con Eco RI, además presentó dos bandas de bajo peso, 3.5 Kpb y 2.2 Kpb cuando fué procesada con la endonucleasa Pst I, de tales bandas ninguna concuerda con el patron esperado para HPV-16 como episoma. La muestra T 17 digerida con Eco RI presentó, cuatro bandas (16, 8.2, 6 y 1 Kpb) lo cual sale totalmente del patron esperado para la forma libre del plásmido. Al ser digerida con Pst I, observamos un patron de seis bandas con al menos tres diferentes a la esperadas. Finalmente la muestra NT4, presenta una sola banda al ser digerida con Eco RI y cuatro bandas al digerirla con Pst I observando al menos una banda mayor al patron observado (tabla # 10).



**TABLA # 10. RESUMEN DE LOS PATRONES DE MIGRACION DE HPV EN LAS MUESTRAS DE DNA DIGERIDAS CON LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION Eco RI Y Pst I.**

Muestra	T1	T4	T5	T7	T8	T12	T15	T16	T17	T19	T20	N74	S6	...	M... 16
Eco RI Kpb	8.2	9.5	15.0	7.5	4.2	15.0	5.0	3.9	16	7.8	5.7	7.9		9.9	7.0
			10.0			5.0			3.5						
Pst I Kpb			3.5	3.0	3.5			4.6	5.6				3.9		
	1.0		1.0	2.0	2.2			3.3	3.8			3.3			2.8
	2.0		2.0	2.0	2.2				3.3			2.0			1.8
	2.5		2.0	2.0	2.2				2.3			2.0			1.5
	1.0		1.0	1.0	1.0				1.8			1.8			1.0
															0.2

## DISCUSION.

### A. MARCAJE DE LA SONDA.

La producción del plásmido que utilizamos en las detecciones génicas, fué realizada con una serie de metodos anteriormente adaptados a nuestro laboratorio, obteniendo una cantidad y una calidad del plásmido comparables a las rutinariamente obtenidas. Seleccionamos la estrategia que implica digestiones enzimáticas únicas de pHPV-16 con Eco R1 y con Hinc II, para verificar su configuración por ser la más sencilla ya que otras implicaban dobles digestiones.

### B. OBTENCION Y ANALISIS DEL DNA GENOMICO.

Encontramos una gran variedad de métodos para extraer leucocitos de sangre periférica, por lo que decidimos escoger entre tres de ellos. Para realizar esta comparación utilizamos la sangre proveniente de tres voluntarios. Puesto que la cantidad de leucocitos varía entre los individuos dependiendo del sexo, estado de salud, etc., realizamos unicamente comparaciones internas de los tres métodos en cada individuo, utilizando el análisis de varianza ANOVA y de la comparación múltiple de Newman-Kewls. Encontramos que los mejores métodos, en relación al rendimiento, fueron el de sedimentación y el de choque osmótico. El método de ficoll hypaque nos dio el menor rendimiento posiblemente debido a su selectividad por linfocitos. Con este método encontramos pérdidas significativas de tres a cuatro veces en comparación con los dos métodos restantes. En cambio, al analizar los rendimientos obtenidos por los otros dos métodos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ellos, a diferencia de lo informado por Gautreau (82) quien encontró pérdidas del 34% con la técnica de sedimentación y del 65% por la técnica de choque osmótico (aunque como solución de sedimentación él utilizó plasmagel en lugar de dextran). En nuestro análisis no realizamos cuenta de leucocitos antes de iniciar la purificación, sin embargo encontramos después de ella, valores de 4,000 a 6,000

leucocitos por  $\mu$ l de sangre, lo que cae dentro del rango normal que es de 4,500 a 11,000 leucocitos por  $\mu$ l de sangre. Optamos por utilizar el método de sedimentación ya que la pastilla obtenida por el método de choque osmótico presenta una cantidad alta de hemoglobina en comparación con el primero, la cual puede interferir en las extracciones. Durante las extracciones fenólicas de DNA decidimos utilizar un agente reductor como es el 2 mercaptoetanol cuando procesamos las muestras cervicales ya que la alta concentración de queratina le confiere una consistencia dura difícil de procesar. Este agente ha sido utilizado eficientemente para extraer DNA de espermatozoides (97) y se utiliza para impedir la oxidación del fenol (76). Su uso facilitó el procesamiento de las muestras sin afectarnos la calidad del DNA obtenido.

Debido a la dificultad intrínseca de tomar biopsias, el tamaño de las muestras varió mucho por lo que en ocasiones las muestras llegaron a ser tan pequeñas o encontrarse con coágulos de sangre, obligándonos a descartar algunas, así mismo en algunas ocasiones no pudimos obtener la cantidad de sangre adecuada, debido tanto a problemas en el estado del paciente como a problemas de coagulación de la sangre en las jeringas. El rendimiento de DNA obtenido a partir de tejido cervical fué de 1.6  $\mu$ g de DN por mg de tejido (observar tabla # 8), tal rendimiento lo consideramos aceptable ya que Davies obtuvo rendimientos de 1  $\mu$ g de DNA por mg de vello corionico (84), Iversen obtuvo rendimientos de 2.8  $\mu$ g de DNA por mg de hígado (98) y Seto E. informa haber obtenido de 0.1 a 8  $\mu$ g de DNA por mg de tejido infiltrado en parafina (99). Nuestros rendimientos obtenidos, durante la extracciones de DNA a partir de sangre periférica, fueron de 19.8  $\mu$ g de DNA por ml de sangre (ver tabla # 8). Estos valores son inferiores a los presentados por Gautreau que son de 20-50  $\mu$ g de DNA por ml de sangre (82) y son superiores a las informadas por Gatti que oscilan de cuatro a seis  $\mu$ g de DNA por ml de sangre (92).

## C. DETECCION DE GENES.

### 1. Evaluación de métodos para detectar secuencias génicas.

Nos propusimos evaluar la sensibilidad de la detección autoradiográfica y compararla con dos detecciones cromogénicas.

Al realizar la detección con  $^{32}\text{P}$  usando una membrana de nitrocelulosa en la que se transfirieron concentraciones decrecientes de plásmido, pudimos detectar hasta 130 pg en solamente 12 h de exposición, y hasta 26 pg en 24 h de exposición. Exposiciones prolongadas nos permitieron observar niveles inferiores, pero en este caso el carril con 500 copias nos dio señales tan fuerte que causaban el opacamiento de las más débiles (resultados no mostrados). Al realizar el mismo experimento con una sonda marcada con biotina y detectada con estreptavidina acoplada a peroxidasa, observamos niveles de 390 pg (figura # 14). En cambio, al utilizar estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina detectamos niveles de 65 pg (figura # 15), esto sería equivalente a más de 12 h de exposición con una sonda radiactiva. Estos niveles de sensibilidad son bajos si consideramos la información proporcionada por la casa comercial. El proveedor indica la posibilidad de detectar de 10 a 20 pg de DNA usando estreptavidina marcada con peroxidasa (88) y 0.25 pg usando fosfatasa alcalina (80). Leary en 1983, realizó varias pruebas para determinar la sensibilidad de un sistema de detección usando sondas marcadas con biotina y revelando ya sea con estreptavidina acoplada con peroxidasa o con fosfatasa alcalina. Detectó menos de 100 pg con peroxidasa y de 20 a 30 pg con fosfatasa alcalina, sin embargo al utilizar un polímero de estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina pudo detectar niveles de hasta 1 a 2 pg (100). Puesto que nosotros utilizamos un conjugado comercial (Blue gene) esperaríamos detectar niveles iguales, sin embargo nunca alcanzamos tales niveles de detección. Por otra parte varios autores han utilizado el DNA del bacteriofago M13 como vector de clonación, de las secuencias que van a ser usadas como sonda, esto les permite marcar la totalidad del bacteriofago con biotina mientras que la secuencia buscada permanece de cadena sencilla, de esta forma se ha podido

aumentar la sensibilidad de la prueba, permitiendo detectar genes de copia sencilla en DNA genómico (101-102).

Debido a los riesgos que implica trabajar con material radiactivo, su vida media corta (2 semanas), los altos costos, la dificultad para conseguirla y el equipo costoso necesario para las mediciones, la utilización de métodos colorimétricos es una muy buena alternativa. Mediante estos métodos cromogénicos podríamos evitar los peligros arriba mencionados, además de poder utilizar las sondas marcadas con biotina por períodos de un año (80).

## 2. Presencia del genoma de HPV-16 en CaCU.

Técnica directa. Una vez purificadas las muestras decidimos evaluar un método directo como lo es el de "Dot Blot". Realizamos esta técnica con membranas de Nylon, probamos diferentes condiciones de lavado hasta seleccionar el lavado de SSC 0.1 X y SDS al 0.5 % a 65°C lo que nos permitió obtener señales en esta membrana de nylon claramente distinguibles del atrapamiento inespecífico de radiactividad. Mediante esta técnica fuimos capaces de detectar secuencias de HPV-16 en siete muestras. Además detectamos secuencias de HPV-16 en tres muestras que presentaban degradación parcial (T0, T13 y C5) lo que nos abre la posibilidad de detectar secuencias génicas aún en aquellas muestras que no pueden ser examinadas por una técnica como la de "Southern". Observamos una señal tenue en la muestra T10 únicamente cuando utilizamos la técnica de "Dot blot". Esto puede deberse a niveles de detección mayores que los obtenidos por la técnica de "Southern" como ha sido informado por Amorese (103), aunque no podemos descartar la posibilidad de una señal falso-positivo. No fuimos capaces de detectar secuencias de HPV diferentes a las del tipo 16 debido a que esta membrana de nylon requiere condiciones de lavado muy severas (SSC 0.1 X a 65°C) para poder eliminar la inespecificidad y en estas condiciones no ocurren hibridizaciones ilegítimas que permiten detectar secuencias relacionadas con HPV-16. Sin embargo existe la posibilidad de detectar secuencias que comparten similitud utilizando membranas de nitrocelulosa por la técnica de "Dot blot" (89).

Técnica de Southern. Al realizar las detecciones por la técnica de Southern con membranas de Nylon obtuvimos altos niveles de fondo. Esta inespecificidad permaneció aun con bloqueo exhaustivo (con albúmina sérica bovina y DNA de esperma de salmón a muy altas concentraciones) y condiciones de lavado muy fuertes (65°C y condiciones de baja concentración de sales, SSC 0.1X). En algunos trabajos publicados se muestran niveles de fondo muy altos al utilizar estas membranas (37, 92), sin embargo las casas comerciales las consideran de una calidad superior ya que permiten su reutilización, debido a que son prácticamente indestructibles (104, 105). Esta cantidad de fondo posiblemente se deba a las cargas positivas que presentan en comparación a otras membranas neutras (nitrocelulosa). Recientemente se publicó la utilización de leche descremada en polvo en lugar de BSA para bloquear más eficientemente la membrana de nylon (105), además se pueden utilizar concentraciones de sonda muy bajas (menores de 10<sup>4</sup> cpm por ml de solución), todo esto con el propósito de disminuir la señal de fondo. Por otro lado al utilizar membranas de nitrocelulosa obtuvimos señales muy nítidas y la señal de fondo se redujo drásticamente (fig 21 a, b, c y 22).

Detectamos secuencias de HPV en 11 muestras de CaCU, de las cuales seis corresponden al tipo 16, el 30% de los 20 casos de CaCU. Estos resultados concuerdan con los presentados en los trabajos realizados en EU (33, 34, 39, 42) los de la ciudad de México (46) y los de algunas otras partes como Japon (43-44), Kenya y Brasil (35) e Inglaterra (37). Así mismo la incidencia de HPV en CaCU en los pacientes que estudiamos es relativamente más baja que los porcentajes encontrados en estudios realizados en Italia (49), Inglaterra (36, 40), Panama (47) y Brasil (45). Debido a que encontramos secuencias diferentes al tipo 16 en 5 de las 20 (25 %) muestras de CaCU, no descartamos la posibilidad de la existencia de otros tipos de papiloma virus, como serían los HPV de los tipos 18, 31 y 35.

El número de copias del genoma viral detectado varió de menos de 1 hasta 10 copias por genoma haploide. Estos rangos se encuentran dentro de lo informado, aunque el número de copias encontrado fué menor que el detectado por algunos autores (49, 36, 43) y mayor que el informado por Fukushima (39).

Durante la detección rápida por el método de "Dot Blot", detectamos una señal débil en la muestra correspondiente a los leucocitos de la paciente número seis, por lo que decidimos cortar el DNA proveniente de esta muestra con la endonucleasa Pst I, detectando una banda de aproximadamente 3.9 Kpb. Al revisar el estadio de la paciente encontramos que correspondía a un estadio III B, lo que indica un estadio muy avanzado con expansión de la enfermedad.

En la literatura no encontramos trabajos en donde hayan buscado secuencias de HPV en muestras de sangre de pacientes con CaCU, en nuestro caso el número de copias por célula fué relativamente bajo, lo que significa que solo algunas células poseen el DNA de HPV-16 y que solo un pequeño fragmento de menos de 4 Kpb está involucrado. Hasta la fecha no podemos explicarnos este fenómeno, aunque consideramos que pueda ser importante.

En el resumen presentado en la tabla # 10 encontramos un patron de bandas diferentes al esperado para HPV-16, lo que se puede explicar mediante polimorfismos, integración en el DNA genómico y presencia de un tipo diferente de HPV.

La principal demostración de que este virus es del tipo 16 fué aportada al lavar la membrana en SSC 0.1 X a 60°C por una hora, ya que estas condiciones son lo suficientemente estrictas para permitir que solo aquellas secuencias que están completamente apareadas permanezcan mientras que aquellas que presenten sólo complementaridad parcial sean eliminadas. En nuestro caso, al

lavar las membranas en tales condiciones obtuvimos señales claras con las muestras T1, T5, T7, T8, T17, NT4 y A3. Descartamos la posibilidad de digestiones parciales en las muestras positivas para HPV-16 ya que de ser así se presentarían bandas correspondientes a las formas relajadas y superenrolladas. La muestra T7 es la que concuerda más con el patrón esperado para HPV-16 como episoma. El resto de las muestras presentan bandas de tamaños diferentes a los esperados para HPV-16 en forma libre lo que nos hace pensar en la posibilidad de una integración de HPV-16 en el genoma de las muestras T5, T8, T17, NT4 de acuerdo con lo informado por algunos autores (36, 38, 41, 45, 49) y la no integración en las muestras T1, T7, como es el caso de otros estudios realizados (26, 29, 43, 53) sin embargo, no podemos descartar la existencia de polimorfismos.



## CONCLUSIONES.

Con la culminación de este trabajo logramos cumplir satisfactoriamente con los objetivos propuestos al inicio del trabajo.

- 1.- Implementamos y adaptamos en nuestro laboratorio las metodologías que permiten detectar la presencia de genes individuales dentro de los cientos de miles que constituyen el genoma humano.
- 2.- Encontramos que la técnica radiactiva, para detectar secuencias génicas, es más sensible que las coloriméticas. Sin embargo obtuvimos suficiente sensibilidad por medio de sondas biotiniladas, como para detectar secuencias únicas en el genoma humano a costos menores y tiempos más cortos. El uso de este tipo de sondas no radiactivas evitará además los riesgos asociados al manejo de radioisótopos, lo que permitirá que cualquier persona sin mucho adiestramiento realice estos métodos fácilmente.
- 3.- Detectamos secuencias de HPV en 11 de los 20 casos de CaCU, en una lesión preneoplásica (NIC III), en un tejido cervical sano y en una muestra de sangre de una paciente con CaCU. Logramos distinguir las señales específicas para HPV-16 por medio de lavados selectivos en seis de los casos de CaCU.
- 4.- Caracterizamos las muestras positivas a HPV-16 mediante corte con las endonucleasas de restricción Eco RI y Pst I encontrando una alta heterogeneidad en las bandas observadas. Estas observaciones nos sugieren la posible integración de HPV-16 en el DNA genómico de al menos algunas muestras de CaCU.

## CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS.

Los logros más importantes del presente trabajo son los siguientes:

1. Demostramos nuestra hipótesis de trabajo al detectar la presencia del genoma del virus del papiloma humano en un buen número (54 %) de las muestras de cáncer cervicouterino de los pacientes analizados.
2. Aplicamos por primera vez en el Norte del País las metodologías para la detección de genes individuales, presentes ya sea como componentes naturales o como agentes invasores dentro de los cientos de miles que constituyen el genoma humano.

El primero de estos logros repondió a nuestro deseo de conocer mejor el papel real y la importancia que tiene el virus del papiloma humano como factor predisponente en el desarrollo del cáncer cervicouterino en mujeres de nuestra comunidad.

El segundo está relacionado con la constante búsqueda de nuevos y más poderosos métodos de laboratorio que permitan diagnosticar oportunamente y prevenir enfermedades genéticas e infecciosas.

Para asegurar el éxito de los anteriores logros fué necesario alcanzar una serie de metas, que en conjunto representan sin lugar a dudas un esfuerzo pionero en el área del diagnóstico y prevención del cáncer en el Noreste del País.

El poder aislar DNA de células humanas de alto peso molecular y detectar en este material secuencias génicas correspondientes a genes individuales o a agentes infecciosos, abre a su vez una enorme variedad de posibilidades.

Nuestro trabajo con el virus del papiloma humano sirve de pauta para iniciar otros estudios similares, tendientes al diagnóstico oportuno y prevención de padecimientos asociados a genes defectuosos (errores innatos del metabolismo y otras enfermedades hereditarias monogénicas ya sea autosómicas, como es el caso de la fibrosis quística (107), o ligadas al sexo como ocurre con la

distrofía muscular (108)). Así mismo y de manera análoga a nuestro estudio ahora estamos en posibilidad de diagnosticar la presencia de agentes infecciosos tales como el virus de la hepatitis (109), el virus del Herpes simple, el virus del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, micoplasmas, entre otros (110-111).

Estos métodos puede utilizarse además como herramienta forense ya que nos permite detectar patrones genéticos ("finger print") que son característicos para cada individuo de la población lo que tiene grandes aplicaciones para aclarar paternidad, confirmar la identidad de asesinos, verificar parentesco en caso de inmigración, etc (112).

Las técnicas que adaptamos a nuestro laboratorio tiene también aplicaciones en la sistemática, ya que considerando a las especies como poblaciones definidas, es posible encontrar polimorfismos que nos diferencien entre cada una de ellas.

Con este trabajo iniciamos una línea de investigación encaminada a estudiar la relación entre el CaCU y el papiloma virus humano, abriendonos la posibilidad de detectar portadores de este virus aún antes de que se presente la enfermedad, lo que tiene aplicación preventiva. Además nos permite formular una serie de preguntas que en un momento dado se tomarían como directrices de investigaciones futuras ¿Qué otros tipos de papiloma virus se encuentran en las muestras analizadas?, ¿Existen tipos de papilomavirus que sean endémicos de nuestra raza y población? ¿Qué porcentaje de pacientes con displasias presentan este tipo de virus y como progresan? ¿Podría este tipo de análisis utilizarse como examen diagnóstico?, ¿Qué sectores de la población son los más afectados por este virus?.

## LITERATURA CITADA.

- 1.- Slater T. F. 1984. Chairman's Introduction. En Mc Brien D. C. H. y T. F. Slater. (Eds.) Cancer of the Uterine Cervix. Academic Press. pp. 1-4.
- 2.- Peto R.. 1986. Introduction: Geographic Patterns and Trends. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) Viral Ethiology of Cervical Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21:3-15.
- 3.- A. Singer y P. French. Natural History and Epidemiology of Cervical Carcinoma. En Mc Brien D. C. H. y T. F. Slater.(Eds.) Cancer of the Uterine Cervix. Academic Press. pp. 5-30.
- 4.- Jones H. W. y G. S. Jones. 1985. Tratado de Ginecología de Novak. 10 ed. Ed. Interamericana.
- 5.- Peters R. K., D. Thomas, D. G. Hagan, T. M. Mack y B. E. Henderson. 1986. Risk Factor for Invasive Cervical Cancer Among Latinas in Los Angeles Country. Journal of the National Cancer Institute. 77:1063-1077.
- 6.- Hernández-Avila M. 1987. Etiología y factores predisponentes de cancer cervicouterino en la ciudad de México. En Preparación.
- 7.- Rodríguez-Peral Jorge. 1983. Carcinoma cervicouterino en el Noroeste de México. Aspectos clinicos. Rev. Med. I. M. S. S. 21: 183-189.
- 8.- Vessey M. P.. 1986. Epidemiology of Cervical Cancer: Role of Hormonal Factors, Cigarette Smoking and Occupation. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) Viral Ethiology of Cervical Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 29-43.
- 9.- Brinton L. A.. 1986. Current Epidemiological Studies Emerging Hypotesis. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) Viral Ethiology of Cervical Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 17-28.
- 10.- Doll R.. 1986. Implication of Epidemiological Evidence for Future Progress. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) Viral Ethiology of Cervical Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 321-326.

- 11.- L. Aurelian and P.O.P. TS'0. 1984. HSV-2 Genetic Information Expressed in Transformed Cells Reflects the Growth of Cervical Cancer. En Mc Brien D. C. H. y T. F. Slater. (Eds.) Cancer of the Uterine Cervix. Academic Press. pp. 313-334.
- 12.- Prakash S. S., W. C. deBritton y W. E. Rawls. 1985. Herpes simplex virus types 2 and human papilloma virus type 16 in cervicitis, dysplasia and invasive cervical carcinoma. Int. J. Cancer 35: 51-57.(107)
- 13.- Rawls W. E., L. D. Marrett y W. C. Reeves. 1986. An Analysis of the Association Between Herpes Simplex Virus Type 2 Antibodies an Cervical Cancer. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) Viral Ethiology of Cervical Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 187-197.
- 14.- Macnab J.C.M., S. A. Walkinshaw, J. W. Cordiner y J. B. Clements. 1986. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. The New England Journal of Medicine. 315:1052-1058.
- 15.- Mc Dougall J. K., A. M. Beckmann y D. A. Galloway. 1986. The Enigma of Viral Nucleic Acids in Genital Neoplasia. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) Viral Ethiology of Cervical Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 199-209.
- 16.- Schlehofer J. R.. 1986. Interactions of Herpes Simplex Virus Infections with Host Cell DNA. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) Viral Ethiology of Cervical Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 211-215.
- 17.- Meignier B., B. Norrild, C. Thuning, J. Warren, N. Freinkei, A. J. Nahmies, F. Rapp y B. Roizman. 1986. Failure to induce cervical cancer in mice by long term frequent vaginal exposure to live or inactivated herpes simplex viruses. Int. J. Cancer 38:387-394.
- 18.- Howley P. M., Y. Yang, B. A. Spalhols y M. S. Rabson. 1986. Molecular Aspects of Papillomavirus-host Cell Interactions. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) Viral Ethiology of Cervical Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 261-272.
- 19.- Hiatt H. H., J. D. Watson y J. A. Winsten. 1977. Papillomavirus: possible role in human cancer. en Origins of Human Cancer. Book B. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Vol. 4 pp. 1043-1068.

- 20.- Priester Herbert. 1984. Biology and Biochemistry of Papillomaviruses. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.. 99:112-181.
- 21.- Tooze John. 1981. DNA Tumor Viruses. segunda ed. Cold Spring Harbor Laboratory pp. 1-382d.
- 22.- Lina-Villa Luisa y Ademar López. 1986. Human papilloma virus sequences in penile carcinomas in Brazil. Int. J. Cancer 37: 853-855.
- 23.- De Villiers E., L. Gissmann y H. zur Hausen. 1981. Molecular Cloning of Viral DNA from Human Genital Warts. J. of Virology 40:932-935.
- 24.- Gissmann L., L. Wolnik, H. Ikenberg, U. Koldobsky, H. G. Schnuckh y H. zur Hausen. 1983. Human papiloma virus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 560-563.
- 25.- Perez de Lantigua E., C. Carrillo-González y M. Narcio Reyes. 1986. Papilomatosis genital: enfoque actual. Infectología. 6:427-439.
- 26.- Green M., K. H. Brackmann, P. R. Sanders, P. M. Lowenstein, J. H. Freel, M. Eisinger y S. A. Swittlyk. 1982. Isolation of a human papilloma virus from a patient with epidermodysplasia verruciformis: presence of related viral DNA genomes in human urogenital tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 4437-4441.
- 27.- Zachow K. R., R. S. Ostrow, M. Berder, S. Watts, Takashi Okagake, F. Pass y A. J. Faras. 1982. Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. Nature 300:771-773.
- 28.- Gissmann L., L. Wolnik, H. Ikenberg, U. Koldobsky, H. G. Schnuckh y H. zur Hausen. 1983. Human papiloma virus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 560-563.
- 29.- Dürst M., L. Gissmann, H. Ikenberg y H. zur Hausen. 1983. A papilloma virus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 3812-3815.

- 30.- Beardor K., G. Krammer, M. Durst, S. Suhai y W. G. Rowekamp. 1985. Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequence. *Virology* 145:181-185.
- 31.- Boshart M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Klenheinz, W. Scheurlen y H. zur Hausen. 1984. A new type of papilloma virus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO. J.* 3: 1151-1157.
- 32.- Lorincz A. T., A. P. Quinn, W. D. Lancaster y G. F. Temple. 1987. A New Type of Papillomavirus Associated with Cancer of the Uterine Cervix. *Virology* 159:187-190.
- 33.- Lorincz A. T., W. D. Lancaster, R. J. Kurman, A. B. Jenson y G. F. Temple. 1986. Characterization of Human Papillomaviruses in Cervical Neoplasias and Their Detection in Routine Clinical Screening. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) *Viral Etiology of Cervical Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 225-237.
- 34.- Dekmesian R., X. Chen, T. Kuo, N. Ordoñez, R. L. Katz. 1987. DNA Hybridization for Human Papillomavirus (HPV) in Cervical Lesions. *Arch Pathol. Lab. Med.* 111:22-27.
- 35.- Durst M., L. Gissmann, H. Ikenberg y H. zur Hausen. 1983. A papilloma virus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 3812-3815.
- 36.- Scholl J. M., E. M. Kingsley-Pillers, R. E. Robinson y P. J. Farrell. 1985. Prevalence of human papilloma virus type 16 DNA in cervical carcinoma samples in East Anglia. *Int. J. Cancer* 35: 215-218.
- 37.- Millan D. W. M., J.A. Davis, T.E. Torbet y M. S. Campo. 1986. DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16, and 18 in lesions of uterine cervix in the west Scotland. *British Medical Journal* 293:93-96.
- 38.- Shirasawa H., Y. Tomita, K. Kubota, T. Kasai, S. Sekiya, H. Takamisawa y B. Simuzu. 1986. Detection of human papilloma virus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J.gen. Virol.* 67: 2011-2015.

- 39.- Fukushima M., T. Okagaki, L. B. Twiggs, B. A. Chark, K. R. Zachow, R. S. Ostrow y A. J. Faras. 1985. Histological types of carcinoma of the uterine cervix and the detection of human papilloma virus DNA. *Cancer Research*. 45: 3252-3255.
- 40.- Macnab J.C.M., S. A. Walkinshaw, J. W. Cordiner y J. B. Clements. 1986. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *The New England Journal of Medicine*. 315:1052-1058.
- 41.- Lehn H., P. Kriegy, G. Saver. 1985. Papilloma virus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 82: 5540-5544.
- 42.- Ostrow R. S., D. A. Manias, B. A. Clark, T. Okagake, L. B. Twiggs y A. J. Faras. 1987. Detection of Human Papillomavirus DNA in Invasive Carcinomas of the Cervix by In Situ Hybridization. *Cancer Research* 47:649-653.
- 43.- Yoshikawa H., T. Matsukura, E. Yamamoto, T. Kawana, M. Mizuno y K. Yoshike. 1985. Occurrence of human papilloma virus types 16 and 18 DNA in cervical carcinomas from Japan: age of patients and histological type of carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 76: 667-671.
- 44.- Tsunokawa Y., N. Takebe, S. Nozawa, T. Kasamatsu, L. Gissmann, H. zur Hausen, M. Tereda y T. Sugimura. 1986. Presence of human papilloma virus type 16 and type 18 DNA sequences and their expression in cervical cancer and cell lines from Japanese patients. *Int. J. Cancer* 37: 499-503.
- 45.- Mc Cance D. J., A. Kalache, K. Ashdown, L. Andrade, F. Menezes, P. Smith y R. Doll. 1986. Human Papilloma virus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int. J. Cancer* 37: 55-59.
- 46.- Gariglio P., R. Doadiz y R. Saucedo. 1987. Human papilloma virus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells en prensa*.
- 47.- Prakash S. S., W. C. deBritton y W. E. Rawls. 1985. Herpes simplex virus types 2 and human papilloma virus type 16 in cervicitis, dysplasia and invasive cervical carcinoma. *Int. J. Cancer* 35: 51-57.



- 48.- Tomita Y., Kikubota, T. Kasai, S. Sekiya, H. Takamizawa y B. Simuzu. 1986. Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Warts, Cervical Dysplasias and Neoplasias. *Intervirol* 25:151-157.
- 49.- DiLuca Dario, S. Pilotti, B. Stetanon. A. Rotola, P. Momimi, M. Tognon, G. de Palo, F. Rilke y E. Cassai. 1986. Human papilloma virus type 16 DNA in genital tumors: A pathological and molecular analysis. *J. gen. Virol.* 67: 583-589.
- 50.- Schneider A., H. Kraus, R. Schuhmann y L. Gissmann. 1985. Papilloma virus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Int. J. Cancer* 35: 443-448.
- 51.- Fife H. Kenneth, R. E. Rogers y B. W. Zwickl. 1987. Symptomatic and Asymptomatic Cervical Infections with Human Papillomavirus During Pregnancy. *Journal of Infectious Diseases.* 156:904-911.
- 52.- Webb D. H., R. E. Rogers y K. H. Fife. 1987. A One-Step Method for Detecting and Typing Human Papillomavirus DNA in Cervical Scrapr Specimens from Women with Cervical Dysplasia. 1987. *Journal of Infectious Diseases.* 156:912-919.
- 53.- Crum C. P., M. Mitao, R. U. Levine y S. Silvestein. 1985. Cervical papilloma viruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J. of Virology.* 54: 675-681.
- 54.- Toon P. G., J. R. Arrand, L. P. Wilson y D. S. Sharp. 1986. Human papillomavirus infection of the uterine cervix of woman without cytological signs of neoplasia. *British Medical Journal* 293:1261-1264.
- 55.- Cox M. F., C. A. Meanwell, N. J. Maitland, C. Blackledge, C. Scully y J. A. Jordan. 1986. Human papillomavirus Type 16 homologous DNA in Normal Human Ectocervix. *The Lancet.* 8499:157-158.
- 56.- Roman A. y K. Fife. 1986. Human Papillomavirus DNA Associated with Foreskins of Normal Newborns. *The Journal of Infectious Diseases.* 153:855-861.
- 57.- Mc Cane D. J. y A. Singer. 1986. The Importance of HPV Infections in the Male and Female Genital Tract and Their Relationship to Cervical Neoplasia. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) *Viral Ethiology of Cervical Cancer.* Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 311-319.

- 58.- Ikenberg H., L. Gissmann, G. Gross, E. Grussendorf-Conen y H. zur Hausen. 1983. Human papilloma virus type 16 related DNA in Genital Bowen's Disease and in Bowenoid Papulosis. *Int. J. Cancer* 32: 563-565.
- 59.- Skegg D.C. G. y C. Paul. 1986. Virus, Specula, and Cervical Cancer. *The Lancet*. 8484:797.
- 60.- Ayliffe G. A. J.. 1986. Viruses, specula, and Vaginal Cancer. *The Lancet*. 8499:158.
- 61.- Frazer I. H., R. M. Crapper, G. Medley, T. C. Brown, I. R. Mackray. 1986. Association between anorectal dysplasia, human papilloma virus and human immunodeficiency virus infection in homosexual men. *The Lancet*. 8508:657-660.
- 62.- Gross G., H. Ikenberg, E. de Villiers, A. Schneider, D. Wagner, L. Gissmann. 1986. Bowenoid Papulosis: A Venereally Transmissible Disease as Reservoir for HPV-16. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) *Viral Etiology of Cervical Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21:149-165.
- 63.- Mc Cance D. J., A. Kalache, K. Ashdown, L. Andrade, F. Menezes, P. Smith y R. Doll. 1986. Human Papilloma virus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int. J. Cancer* 37: 55-59.
- 64.- Lina-Villa Luisa y Ademar López. 1986. Human papilloma virus sequences in penile carcinomas in Brazil. *Int. J. Cancer* 37: 853-855.
- 65.- Gussendorf-Conen E., E. de Villiers y L. Gissmann. 1986. Human papillomavirus genomes in penile smears of healthy men. *The Lancet*. 8515:1092.
- 66.- Crum C. P., H. Ikenberg, R. M. Richart y L. Gissman. 1984. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *The New England Journal of Medicine* 310: 880-883.
- 67.- Syrjanen K., R. Mantyjarvi, S. Parkkinen, M. Vayrysen, S. Saarikoski, S. Syrjanen y O. Castren. 1986. Prospective Follow-up in Assessment of the Biological Behavior of Cervical HPV-Associated Dysplastic Lesions. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) *Viral Etiology of Cervical Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 167-177.
- 68.- Pater Mary M. y Alan Pater. 1985. Human papilloma virus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145: 313-318.

- 69.- Tsunokawa Y., N. Takebe, S. Nozawa, T. Kasamatsu, L. Gissmann, H. zur Hausen, M. Tereda y T. Sugimura. 1986. Presence of human papilloma virus type 16 and type 18 DNA sequences and their expression in cervical cancer and cell lines from Japanese patients. *Int. J. Cancer* 37: 499-503.
- 70.- Dürst M., E. Schwarz y L. Gissmann. 1986. Integration and Persistence of Human Papillomavirus DNA in Genital Tumors. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) *Viral Ethiology of Cervical Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 273-280.
- 71.- Dürst M., A. KleinHenz, M. Hotz y L. Gissmann. 1985. The physical state of human papilloma virus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. gen. Virol.* 66:1515-1522.
- 72.- Lehn H., P. Kriegy, G. Saver. 1985. Papilloma virus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 82: 5540-5544.
- 73.- Schwarz E., A. Schneider-Gadicke, B. Roggenbuck, W. Mayer, L. Gissmann y H. Zur Hausen. 1986. Expression of Human Papillomavirus DNA in Cervical Carcinoma Cell Lines. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) *Viral Ethiology of Cervical Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 281-290.
- 74.- Howley P. M., Y. Yang, B. A. Spalhols y M. S. Rabson. 1986. Molecular Aspects of Papillomavirus-host Cell Interactions. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) *Viral Ethiology of Cervical Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 261-272.
- 75.- Koss L.G. 1986. Chairman's Concluding Remarks: Sequence of Events in Carcinogenesis of the Uterine Cervix. En Peto Richard y Zur Hausen Harald (Eds.) *Viral Ethiology of Cervical Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Banbury Report. 21: 179-184.
- 76.- Maniatis T., E. F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. primera ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 77.- Barrera-Saldaña H. A. 1982. Expression of the Human Placental Lactogen Genes. Tesis Doctoral. Presentada en la Universidad de Texas "Health Science Center en Houston".

- 78.- Editorial. 1984. Nick Translation Kit. Amersham 19p.
- 79.- Rigby P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes y P. Berg. 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polimerase I. J. Mol. Biol. 113: 237-251.
- 80.- Editorial. 1986. Nonradioactive Nucleic Acid Detection System. Bethesda Research Laboratories. Manual Cat. No. 8279SA. 36p.
- 81.- Boyum A. 1968. Separation of Leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 sup. 97:72.
- 82.- Gautreau C., C. Rahuel, J. Carton y G. Lucotte. 1983. Comparison of Two Methods of High-Molecular-Weight DNA Isolation from Human Leucocytes. Analytical Biochemistry. 134:320-324.
- 83.- Arce-Mendoza Alma Yolanda 1983. Efecto de las tetraciclinas sobre la quimiotaxis leucocitaria. Estudio doble ciego en pacientes con Acne Vulgaris." Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica. Tesis Inédita pp. 10-13.
- 84.- Davies K. E. 1986. Human Genetic diseases. a practical approach. Editorial IRL PRESS.
- 85.- Davidson I. y J. B. Henry. 1983. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio de Tood-Sanford. 6a. edición. Ed. Salvat.
- 86.- Zar J. H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice Hall U.S.A.
- 87.- Harper, M. E., H. A. Barrera-Saldaña y G. F. Saunders. 1982. Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. Am. J. Hum. Genet. 34:227-234.
- 88.- Editorial. 1983. Instructions for hybridization and detection of biotinilated DNA probes. ENZO Biochem.
- 89.- Kafatos F.C., C. W. Jones y A. Efstatiadis. 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucleic Acids Research. 7:1541-1552.
- 90.- Reed K. C. y D. A. Mann. 1985. Rapid transfer of DNA from Agarosa geles to nylon membranes. Nucleic Acids Research. 13:7207-7221.

- 91.- Hicks D. A. y C. Vecoli. 1987. The Use of a PVDF Membrane in the Alkaline Transfer of DNA. *Biotechniques*. 5:206-210.
- 92.- Gatti R. A., P. Concannon, W. Saiser. 1984. Multiple Use of Southern Blots. *Biotechniques*. :148-155.
- 93.- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- 94.- Khandjian E. W.. 1987. Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. *Bio/Technology* 5:165-167.
- 95.- Dürat M., A. KleinHenz, M. Hotz y L. Gissmann. 1985. The physical state of human papilloma virus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. gen. Virol.* 66:1515-1522.
- 96.- Lancaster W. D., R. J. Kurman, L. E. Sanz, S. Perry, A. B. Jenson. 1983. Human papilloma virus: detection of viral DNA sequences and evidence for molecular heterogeneity in metaplasias and dysplasias of the uterine cervix. *Intervirology* 20: 202-212.
- 97.- Editorial 1984. Preparation of DNA from Bovine Sperm. *FOCUS* 6:2:9.
- 98.- Iversen P. L., J. E. Mata y R. N. Hines. 1987. Rapid isolation of both RNA and DNA from cultured cells or whole tissues with a benchtop ultracentrifuge. *Biotechnique* 5:521-524.
- 99.- Sato, E. y T. S. Benedict-Yen. 1987. Detection of Cytomegalovirus infections by means of DNA isolated from paraffin-embedded tissues and dot hybridization. *American Journal of Pathology*. 127:409-413.
100. Leary J. J., D. J. Brigati y D. C. Ward. 1983. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 80:4045-4049.
101. Bertsch J. A.. 1987. HLA typing using non isotopic M13 probes for genetic analysis. *Biotechnology Laboratory*. 5:52-57.

102. Sheldon E. L., D. E. Kellogg, R. Watson, C. H. Levenson y H. A. Erlich. 1986. Use of nonisotopic M13 probes for genetic analysis: Application to HLA class II Loci. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.. 83:9085-9089.
103. Amorese Doug. 1986. Nonradiative Detection of RNA Using the bluGENE™ System. FOCUS 8:4:6-8.
104. Editorial. 1984. Capillary Transfer of DNA, DNA Hybridization, and DNA Rehybridization Using Zetabind. AMF. Cuno Technical DATA 20.7.
105. Editorial. 1985. Zeta -Probe Blotting Membranes. Bio-Rad Laboratories. Bulletin 1110:1-6.
106. Siegel L. I. y E. Bronick. 1986. Northern Hybridization Analysis of RNA Using Diethylpyrocarbonate-Treated Nonfat Milk. Analytical Biochemistry. 159:82-87.
107. Cooper D. N. y J. Schmidtke. 1986. Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA. Human Genetics 73:1-11.
108. Hejtmancik, J. F., S. G. Harris, C. C. Tsao, P. A. Ward y C. T. Caskey. 1986. Carrier diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using restriction fragment length polymorphisms. Neurology 36:1553-1562.
109. Scotto J., M. Hadchouel, C. Hery, J. Yvart, P. Tiollais y C. Brechot. 1983. Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum by a Simple Spot Hybridization Technique: Comparison with Results for Other Viral Markers. Hepatology. 3:279-284.
110. Einstein B. I. y N. Cary Engleberg. 1986. Applied Molecular Genetics: New Tools for Microbiologists and Clinicians. The Journal of Infectious Diseases. 153:416-430.
111. Kingsbury D. T. 1987. DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious diseases. Trends in Biotechnology 5:107-111.
112. Lewin Roger. 1986. DNA Fingerprints in health and disease. Science. 233:521-522.

