

1992-B

088822757

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"LOCALIZACION DEL SITIO DE INTEGRACION
DE PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 EN CELULAS
DERIVADAS DE CANCER CERVICAL"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

ADRIANA DEL CARMEN AGUILAR LEMARROY

GUADALAJARA. JAL.

FEBRERO 1994



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN
DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

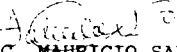
Diciembre 15, 1993.

Dr. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS.
DIRECTOR DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS,
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
P R E S E N T E

Por medio de este conducto me permito hacer de su conocimiento que la Pasante de Licenciatura de Biología, la Srta. ADRIANA DEL CARMEN AGUILAR LEMARROY, ha terminado su trabajo experimental de tesis titulado: "LOCALIZACION DEL SITIO DE INTEGRACION DE PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 EN CELULAS DERIVADAS DE CANCER CERVICAL". Dicho trabajo se llevó a cabo en las Instalaciones del Departamento de Genética y Biología Molecular de este Centro.

Sin otro particular, se extiende la presente para que las instancias correspondientes prosigan con los trámites necesarios y se programe la fecha para su examen de Tesis y Profesional.

ATENTAMENTE


M. en C. MAURICIO SALCEDO VARGAS
DIRECTOR DE TESIS

AV. INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL 2508 C. P. 07360 APARTADO POSTAL 14740 C. P. 07000 MEXICO. D. F.

TELS. 754-02-00 752-06-77 FAX: 586-62 90 752-05-90



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente
 Número
 Sección

AL SEÑOR ALBERTO ESPINOSA ARIAS
 C. P. S. T. I. E. -

manifestamos a usted que con esta fecha se le ha
 aprobado el tema de tesis "LOCALIZACIÓN DEL SITIO DE INDOCA--
 CION DE PILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 EN CELULAS DERIVADAS DE --
 CANCER CERVICAL" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido designa-
 do como Director de dicha tesis el M. en C. Mauricio Salcedo--
 Vargas.

ATENTAMENTE
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Guadalajara, Jal., 29 de Enero de 1993
 EL DIRECTOR



M. EN C. GUANAJUATOS CIFRETES DEMUS
 FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS
 EL SECRETARIO

BIOL. JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

C.C.O.- M. en C. Mauricio Salcedo Vargas, Director de Tesis.-Por
 C.C.O.- El expediente del alumno

JLCL/JAEA/cgr.

Al contestar este oficio ofrese fecha y número

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el Laboratorio del Dr. Patricio Gariglio, bajo la Tutoría del M. en C. Mauricio Salcedo Vargas.

DEDICATORIA

- A mis padres Luis Enrique y Mary Carmen, que con su amor y unión siempre me han motivado para seguir adelante y los cuales me han apoyado en toda mi trayectoria incondicionalmente.

- A mis hermanos Luis y Enrique al igual que a mis familiares y a Gerardo, que de una u otra manera han sido parte de mi vida y los cuales comparten mi alegría por la realización de este trabajo.

- Al M. en C. Mauricio Salcedo Vargas, por su valiosa amistad y asesoría.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Patricio Gariglio, quien me dió la oportunidad de realizar éste trabajo en su Laboratorio.

-Al Dr. Carlos Argüello, por todas las facilidades otorgadas en el uso del microscopio de fluorescencia.

- A los Drs. Roberto Guevara y Virginia Palma, por el asesoramiento en la realización de los cariotipos.

- A la Dra. Julia Urdiales, quien nos proporcionó las líneas celulares mexicanas.

- A la Q.F.I. Teresa Hernández, quien colaboró en el cultivo de células.

- Al Biól. Pedro Chávez, por su gran ayuda en el asesoramiento fotográfico y a la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV.

- A Juan Ramón, por su apoyo y asesoramiento en varios aspectos.

- A mis compañeros de Laboratorio: Pedro, Mauricio, Marco, Mario, Luis, Efraín, Araceli, Cristina, Enrique, Elba, Alfonso, Adriana, Rocío, Lolita y Lupita, por permitirme una estancia agradable con muy bonitos momentos.

- A Mao, por todo su tiempo, paciencia y apoyo.

I N D I C E

* RESUMEN	2
* INTRODUCCION	
Generalidades del cáncer cervical	4
El virus del papiloma humano (HPV)	7
Oncogenes.	10
* ANTECEDENTES	14
* HIPOTESIS	18
* OBJETIVOS	19
* MATERIALES Y METODOS	
Cultivo de células	20
Material cromosómico	22
Marcaje de secuencias de DNA	24
Hibridación in situ	27
Detección	30
Preparación de soluciones	35
* RESULTADOS	36
* DISCUSION	57
* CONCLUSIONES	63
* BIBLIOGRAFIA	64

RESUMEN

El cáncer es un proceso multifactorial. Entre los diversos factores involucrados en la etiología de ésta enfermedad se encuentran los oncogenes, los genes supresores o antioncogenes y los virus. En este último caso, el virus del papiloma humano (HPV, del inglés human papillomavirus), es de gran importancia en el cáncer cérvico-uterino. Hasta este momento se han identificado más de 60 tipos de HPVs, de los cuales 30 están involucrados en el cáncer ano-genital humano. Se ha observado que en lesiones benignas de estos tejidos, los HPV 6 y 11 se encuentran en un estado libre o episomal, en tanto en lesiones malignas los HPV 16, 18, 31, 33 y 35 principalmente, se encuentran en forma integrada al genoma. Diferentes grupos han encontrado que principalmente los tipos 16 y 18, se encuentran integrados cerca de locus de oncogenes (por ejemplo c-myc) o de antioncogenes (por ejemplo Rb). Dicha localización fue determinada utilizando la técnica de hibridación in situ (HIS) sobre cromosomas. Esta técnica permite localizar el sitio cromosómico donde se encuentran las secuencias de interés.

Con el advenimiento de las técnicas de marcaje de DNA con moléculas no radioactivas, es posible obtener resultados comparables a las radioactivas en un tiempo menor. En el presente trabajo se utilizó la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) y el método enzimático (Peroxidasa), para detectar

secuencias de DNA de HPV en cromosomas de líneas celulares derivadas de cáncer cervical. Sorpresivamente se localizaron nuevos sitios de integración para el HPV 16 en células CaSki, en tanto para SiHa se encontró un solo sitio. Para el caso de T8 se observaron más de diez sitios de integración. Este tipo de ensayos ayudan indudablemente, a localizar los sitios donde HPV puede integrarse. Estos datos apoyan indirectamente una función transactivadora mediada por HPV en la transformación celular.

INTRODUCCION

El cáncer y los tumores malignos en general constituyen en la actualidad uno de los principales problemas socioeconómicos y de salud debido a su elevada frecuencia. El cáncer en México, desde hace varios años se encuentra entre las principales causas de morbilidad y mortalidad. Esto es debido por una parte a un pobre diagnóstico e información, y por otra, al incremento de la población en riesgo de padecerlo. Por todo ello la importancia del estudio de su epidemiología es de primer orden; además es importante porque los recursos terapéuticos actuales permiten la curación de una proporción elevada de casos siempre y cuando el diagnóstico se establezca en forma oportuna (1).

El cáncer cérvico-uterino (CaCU), es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países en desarrollo. A nivel mundial el CaCU ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias, superado solo por el carcinoma mamario (Tabla I) (2,3). Los porcentajes que se presentan en la Tabla I, son los resultados obtenidos a partir de pacientes que llegan a consulta y las cuales son confirmadas por estudios de gabinete y clínicos. Los datos recabados por el Registro Nacional de Cáncer de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, demuestran que ésta neoplasia ocupa el primer lugar en frecuencia del total de tumores malignos en la mujer que fueron diagnosticados en Hospitales Públicos y Privados de la Ciudad de México (Tabla II) (4).

TABLA I
Porcentaje de casos de cáncer en la mujer
en 1980 comparando grupos de países
con la Ciudad de México

	Mundial	Países desarrollados	Países en desarrollo	Ciudad de México
MAMA	18.4	22.9	14.2	18.2
CERVIX	15.0	6.3	23.3	29.4
ESTOMAGO	12.6	9.0	7.8	2.5
COLON/ RECTO	8.8	13.2	5.4	2.8

Aguilar-Lemarroy A. 1993.

TABLA II

Porcentaje de neoplasias malignas en la mujer registradas por el Instituto Nacional de Cancerología

	1987 %	1988 %	1989 %	1990 %	1991 %
CERVIX	34	35	11	32	33
MAMA	23	23	10	22	22
PIEL	5	4	8	4	4
OVARIO	6	5	5	5	4

* Estos datos fueron recopilados solamente de Hospitales Públicos y Privados del Distrito Federal.

Aguilar-Lemarroy A. 1993.

En los países desarrollados se han aplicado campañas masivas de detección temprana del CaCU, lo cual aunado a los avances terapéuticos, ha permitido una notable disminución en la incidencia y mortalidad de este padecimiento.

La infección en el epitelio cervical por un grupo de virus, conocido como virus del papiloma humano (HPV), puede ser una de las principales causas del desarrollo del CaCU. La presencia de secuencias de DNA de los HPV en un número elevado de casos de CaCU, sugiere que este virus juega un papel importante en ésta enfermedad. La frecuencia y el número de relaciones sexuales (uno de varios factores asociados al CaCU), facilita la infección por este agente; ya que se ha observado que en aquellas personas célibes, la aparición de éste cáncer es extraordinariamente rara (Para revisión ver ref. 5).

EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV)

Los viriones del HPV contienen unicamente DNA y proteínas. Su genoma está constituido por una doble cadena de DNA circular de aproximadamente 8,000 pares de bases (pb) dentro de cápsides icosaédricas compuestas por 72 capsómeros y el DNA viral libre se encuentra compactado con histonas, formando nucleosomas en el interior del núcleo celular.

Los genomas de los HPV secuenciados hasta la fecha presentan una estructura básica muy similar, con homología de secuencia entre ellos que va de moderada (45%) a alta (85%) (2,6). Se han identificado tres marcos de lectura abierta (ORF) que organizan a las regiones de expresión temprana (E) y tardía (L). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2), y la transformación celular (E6 y E7); los segundos codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2). El genoma contiene una Región Larga de Control (LCR) de aproximadamente 1,000 pb en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de replicación (Figura 1).

El blanco natural de los HPV lo constituyen las células basales indiferenciadas del epitelio (virus epiteliotrópicos); en éstas, el virus permanece en estado latente o episomal. A medida que las células epiteliales se diferencian, el DNA viral se replica en forma autónoma y ya en las células maduras forma viriones completos (infección lítica). Esto sugiere que algunos cofactores celulares participan en la regulación del ciclo viral durante los diferentes estadios de la diferenciación de las células epiteliales. Estas células se vuelven más y más permisivas para la replicación viral a medida que la diferenciación progresa. Hay replicación viral en las capas suprabasales, mientras que las proteínas estructurales y las partículas virales aparecen solo en las capas superiores.

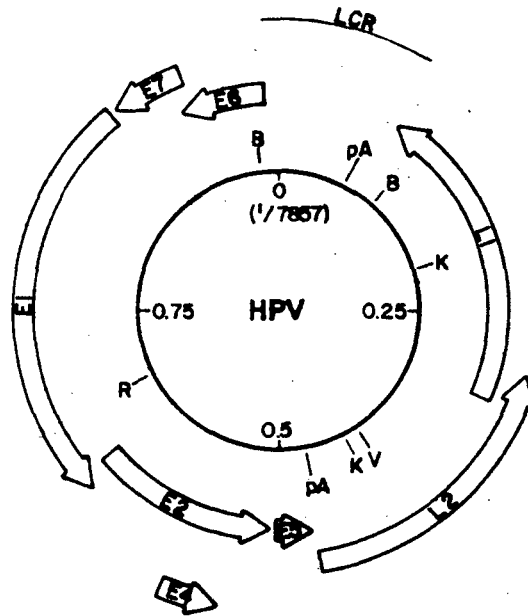


FIGURA 1

MAPA DE LA ORGANIZACION DEL GENOMA DE LOS VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV). LAS LETRAS MAYUSCULAS INDICAN SITIOS DE CORTE PARA LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN: B = Bam HI, K = Kpn I, R = Eco RI, V = Eco R2 Y pA = SITIOS DE POLIADENILACION. E1 - E7 REPRESENTAN LOS GENES TEMPRANOS, L1 , L2 LOS GENES TARDIOS Y EL LCR LA REGION LARGA DE CONTROL.

Hasta este momento se conoce parcialmente el mecanismo de la transformación. Gran cantidad de estudios muestran que en las lesiones benignas y precancerosas, los HPV-6, 11, 16 y 18 se encuentran en estado episomal (no se encuentran integrados al genoma celular) y el tipo de infección es productiva, en tanto los genomas de HPV-16 y 18 o virus de alto riesgo se encuentran integrados al genoma humano en las células cancerosas y generalmente cada célula infectada contiene de 5 a 200 copias del DNA viral (7-10).

ONCOGENES

La presencia del genoma de HPV en tejido genital no implica necesariamente que exista transformación maligna; nuevos criterios, con base en experimentos de Biología Molecular, proponen que el elemento crucial para que exista malignidad es que el genoma del HPV se encuentre expresando los **oncogenes** virales (E6 y E7). Estas proteínas oncogénicas virales pueden cooperar con oncogenes celulares o formar complejos con proteínas antioncogénicas inactivándolas (por ejemplo p105-Rb) o destruyéndolas (por ejemplo p53).

Por otro lado se sabe que las células de mamífero contienen unos 50,000 genes, entre los que podemos incluir a la familia de los oncogenes y los proto-oncogenes. Los oncogenes son versiones alteradas de genes normales (proto-oncogenes), los cuales codifican

para proteínas que desempeñan funciones de gran importancia para las células. Actualmente se conocen más de 20 oncogenes, los cuales están involucrados en procesos cancerosos. En la Figura 2 se esquematizan los cromosomas humanos y algunos sitios de interés involucrados en cáncer; los cromosomas presentan las 400 bandas obtenidas de la tinción tripsina-giemsá. Se indican también los lugares en donde se encuentran los oncogenes (.), otros genes relacionados con cáncer (▲) y los sitios donde comunmente hay rearreglos en diversos tipos de cáncer (+) (11).

Los proto-oncogenes han sido altamente conservados en el curso de la evolución; así por ejemplo, el proto-oncogén *ras* está presente tanto en la levadura como en el hombre y el proto-oncogén *src* lo encontramos tanto en *Drosophila* como en todos los animales vertebrados, esto sugiere que los proto-oncogenes realizan funciones cruciales en la célula (12).

Los productos de algunos proto-oncogenes actúan en el núcleo celular. Algunos miembros de esta familia que se expresen en forma desregulada, podrían alterar tal vez la transcripción de muchos genes necesarios tanto para el crecimiento, como para la proliferación desregulada de las células cancerosas. Lo mencionado anteriormente podría explicar el elevado número de alteraciones génicas que presentan las células tumorales, entre estos proto-oncogenes podemos citar *myc*, *myb*, *ml* y *ski*. Se piensa que una producción desregulada de *myc*, hace de la replicación del DNA

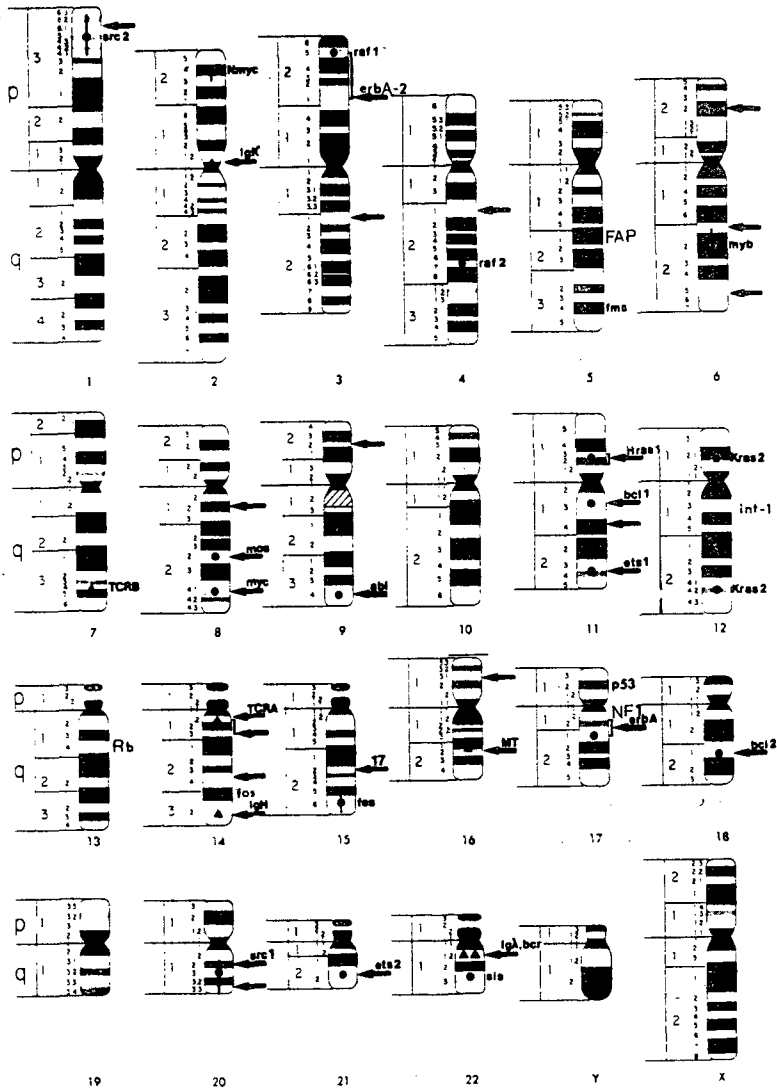


FIGURA 2. ESQUEMA DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS Y SITIOS DE INTERES INVOLUCRADOS EN CANCER.

celular un proceso continuo en las células transformadas; la presencia en una célula de grandes cantidades de proteína myc, podría traer como consecuencia la inmortalidad de las células y su replicación indefinida, contrariamente a lo que sucede en células normales, las cuales tienen una capacidad de división finita. La inmortalización por sí sola no convierte necesariamente una célula normal en tumoral; la activación de un segundo oncogén sería un paso necesario para provocar las otras respuestas que caracterizan el estado canceroso (13). Se ha descrito que ciertos pares de oncogenes, por ejemplo: myc y ras pueden cooperar para transformar cultivos primarios de células.

En general lo antes descrito muestra que en la génesis del Cáncer están involucrados genes celulares y virales, y para el caso en particular del CaCU, pueden estar involucrados oncogenes celulares, antioncogenes o genes supresores del crecimiento, así como el HPV. El conocimiento de los aspectos moleculares involucrados en estos genes, dará mayor claridad de lo que sucede dentro de cada célula transformada.

ANTECEDENTES

En algunas líneas celulares derivadas de carcinomas genitales, el DNA de HPV se ha encontrado integrado cerca de oncogenes celulares como myc y ras (14).

En 1987, nuestro grupo (Dr. P. Gariglio y cols; CINVESTAV-IPN), obtuvo evidencia experimental indicando que en algunos tumores de CaCU de pacientes mexicanas, las secuencias de HPV-16 se encuentran integradas muy cerca, o dentro del oncogén c-myc (15); en estos tumores el oncogén c-myc está alterado estructuralmente presentando tanto rearrreglo como amplificación génica (16). Es posible que la inserción de secuencias virales cerca de algún proto-oncogén celular, pueda activar a éstos últimos en forma cis (15-17).

Recientes investigaciones han determinado una gran asociación de ciertos tipos de HPV con el carcinoma cervical, en particular los tipos 16 y 18. Se ha sugerido que la integración de secuencias de DNA de HPV juegan un papel muy importante en la etiología del CaCU (18). Sin embargo, aún no está claro el mecanismo por el cual la integración del genoma del HPV facilita la transformación maligna de las células.

Secuencias de DNA de algunos tipos específicos de HPV, han sido encontradas integradas en el genoma celular en la mayoría de los carcinomas invasores (19). Los sitios de integración del DNA viral es controversial. Algunos investigadores reportan sitios de integración específicos (20) y otros más reportan que la integración es al azar (21, 22). Lo que sí está claro es que dicha integración ocurre cerca de sitios frágiles, oncogenes y puntos de ruptura cromosómicos (21, 23 y 24). Además la integración de los HPV promueve cambios cromosómicos en células cancerosas (25-27).

Se ha determinado la localización cromosómica de la integración del HPV-16 y 18 en células de cáncer genital por medio de experimentos de hibridación in situ. Por ejemplo, se ha observado que secuencias integradas de HPV en el DNA de células de tumores de CaCU, se encuentran en el cromosoma 8 en la banda q24.1, lugar en donde se encuentra el locus del gen c-myc (28). También se han encontrado en otros tumores de CaCU secuencias de HPV en el cromosoma 2p24, donde se encuentra el gen N-myc. En el 75% de los casos, el proto-oncogén localizado cerca de las secuencias virales integradas estaba alterado estructuralmente y/o sobreexpresado. Estos datos indican que el genoma de los HPV se integra preferencialmente cerca de genes de la familia myc en cáncer cervical invasivo y apoya la hipótesis de que la integración puede ser necesaria para la progresión tumoral y activación de oncogenes celulares (28).

TABLA III

TUMOR O LINEA CELULAR	TIPO DE VPH	SITIO DE INTEGRACION VIRAL	PROTO-ONCOGEN	REFERENCIA
HeLa	18	5p12-13 8q24 9q31-34 22q12-13	mlv12 c-myc c-abl c-sis	Popescu 1987a Durst 1987 Minceva 1987 Popescu 1987a
SW756	18	12q13	int-1 gli	Popescu 1987b
C4-1	18	3p21 8q21-22	erbA-2	Cannizzaro 1988
IC1	18	8q24	c-myc	Couturier 1991
IC3	18	8q24.1	c-myc	"
IC4	18	2p24	N-myc	"
SiHa	16	13q14-32	Anti-oncogén Rb	Durst 1987
		13		Callahan 1992
CaSki	16	13		"
TC-YIK	16	8q24.1	c-myc	Hori 1991

Aguilar-Lemarroy A. 1993.

Otros grupos reportan la integración del HPV-18 en el cromosoma 9 en células HeLa o en el cromosoma 12 en la línea celular SW756 derivada de CaCU (29) y otros más reportan que en las líneas celulares SiHa y CaSki (células derivadas de cáncer cervical que tienen integrado al HPV-16), hay un dominio común de integración en el cromosoma 13, cerca del locus del antioncogén Rb (Tabla III) (30).

Mediante la técnica de hibridación *in situ* (HIS) (31-35), varios grupos muestran la presencia del HPV, incluyendo los tipos de alto potencial oncogénico, en el 45% aproximadamente de las citologías normales del cérvix (2, 36). Esta observación nos permite ver que el HPV es un virus bastante ubicuo y que es importante analizar a nivel molecular diferentes poblaciones, ya que la presencia del genoma viral de un tipo de HPV oncogénico puede ser un factor que predisponga a la paciente a desarrollar un CaCU.

Como se ha visto, resulta interesante el estudio de la integración de los HPVs en el genoma humano. De ésta manera, implementamos la técnica de HIS sobre los cromosomas, ya que la localización cromosómica de los sitios de integración viral, puede proveer claves para la identificación de alteraciones moleculares que se disparan debido a la interacción de secuencias virales con genes celulares.

Por lo anterior descrito, en el presente trabajo manejamos la hipótesis y objetivos siguientes:

HIPOTESIS

En células obtenidas de cáncer cervical, el sitio de integración del HPV-16 no necesariamente ocurre en cromosomas específicos.

OBJETIVO GENERAL

Localizar el(los) sitio(s) de integración de secuencias del HPV en células epiteliales de cáncer cervical.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener las preparaciones cromosómicas de células epiteliales obtenidas de cáncer cervical.
- 2.- Localizar mediante la técnica de hibridación in situ, el sitio de integración de los HPV tipos 16 y 18 en los cromosomas de las células CaSki, SiHa y T8.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO DE CELULAS

En el presente trabajo se emplearon tres líneas celulares de origen epitelial derivadas de cancer cérvico-uterino:

- a) SiHa
- b) CaSki
- c) T8

Las células SiHa contienen de 1 a 2 copias de HPV-16 integrado en su genoma y CaSki tiene aproximadamente 500 copias de éste mismo virus integrado. T8 es una línea celular mexicana obtenida por la Dra. Julia Urdiales del grupo del Dr. Benny Weiss de la FES Zaragoza, UNAM, esta línea posee aproximadamente 150 copias del HPV-18 en forma integrada.

Todas éstas células fueron cultivadas en DMEM (Medio Eagle Modificado por Dulbeco) suplementado con 10% de suero fetal de bovino, en cajas de petri p100 a 37°C en una atmósfera de CO₂ hasta obtener una confluencia del 80%.

También se hicieron cultivos de linfocitos como control. Brevemente, se usó 1 ml de sangre periférica total en 10 ml de Medio McCoy suplementado con 10% de suero fetal de bovino y se estimuló el crecimiento de los linfocitos con fitohemaglutinina (Concentración final: 8 $\mu\text{g/ml}$). Los cultivos se dejaron incubando a 37°C durante 72 hrs en una cámara de CO₂. Posteriormente se trataron para obtener las preparaciones cromosómicas.

MATERIAL CROMOSOMICO

Las preparaciones cromosómicas se hicieron de acuerdo a los procedimientos citogenéticos estándar. Los cultivos celulares se incubaron entre 2 y 24 horas en colchicina (Concentración final= 0.001%) a 37°C. La colchicina interfiere con el proceso de polimerización microtubular. Como consecuencia de la disolución de la organización del huso mitótico; la segregación, el desplazamiento de los cromosomas y la duplicación celular se detienen en metafase. Esto permite la observación adecuada de la morfología de los cromosomas.

Al término de la incubación, se sometieron a un tratamiento hipotónico (KCl 0.075M) durante 15 minutos y se fijaron con metanol -Ac. Acético (3:1). El botón de núcleos fue resuspendido en 3 ml del mismo fijador y fueron depositadas 2 gotas por laminilla. Algunas de éstas laminillas se incubaron de 7 - 15 días a temperatura ambiente y se sometieron a un tratamiento con tripsinogienasa para la demostración de bandas, otras más sirvieron para la hibridación (Figura 3).

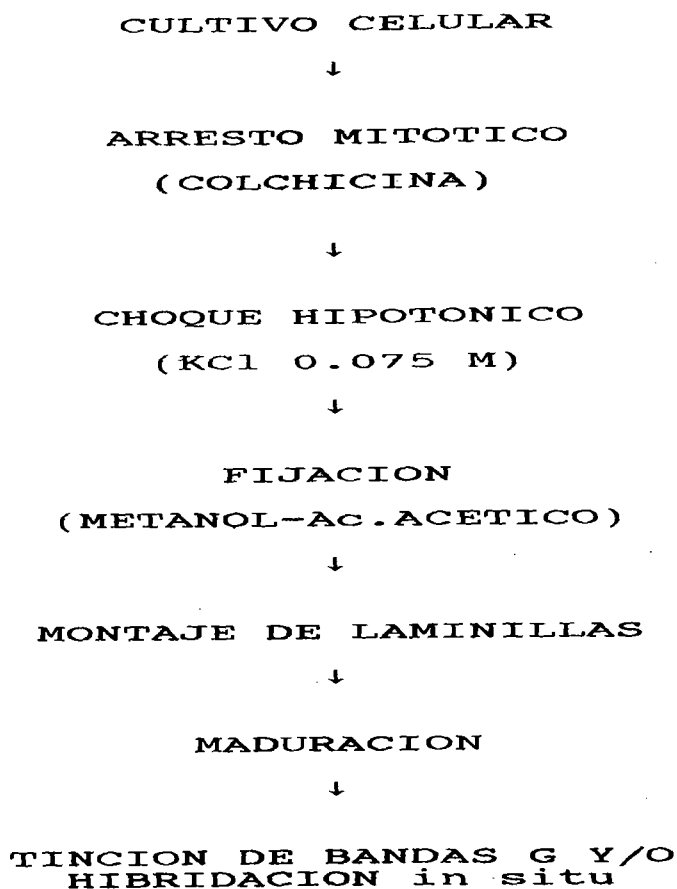


FIGURA 3

PROCEDIMIENTO ESTANDAR PARA LA OBTENCION
DE PREPARACIONES CROMOSOMICAS

MARCAJE DE SECUENCIAS DE DNA

Las secuencias de DNA que se utilizaron fueron el HPV-16 y HPV-18 completos (Figura 1), DNA genómico total, el centrómero del cromosoma humano X (Imagenetics Co. U.S.A.) y el vector pGEM. El marcaje de las secuencias utilizadas se realizó por el método de =Nick Translation=. Este método es el más frecuentemente utilizado para el marcaje de secuencias de DNA que son usadas en los procesos de HIS. El DNA que se marca puede ser solamente un fragmento, un fago, cósmido o plásmido. En ésta reacción intervienen dos enzimas, una es la desoxirribonucleasa I del páncreas bovino (DNAsa I) y la otra es la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* (DNapol I). Para llevar a cabo ésta reacción, se mezclan los nucleótidos dATP, dCTP y dGTP, se agrega el nucleótido marcado con biotina (dUTP-Biotina), el DNA deseado y finalmente se agregan la DNAsa I y la DNapol I.

La DNAsa I en presencia del ión magnesio ataca a cada una de las cadenas del DNA realizando cortes (Nicks) al azar a lo largo de todo el DNA y la enzima DNapol I tiene actividad tanto de exonucleasa 5'- 3', como de polimerasa 5'- 3'. De esta manera, inmediatamente después de que la DNAsa realiza un corte, la DNapol I empieza su actividad de exonucleasa. Al mismo tiempo su actividad de polimerasa va incorporando nucleótidos en la misma dirección.

El producto de esta reacción son moléculas de DNA marcadas, resultado del reemplazamiento de los nucleótidos originales por nucleótidos biotinilados (Figura 4).

El marcaje de las sondas se llevó a cabo mediante el =Nick Translation Kit= No.5500 proveído por la Compañía Amersham y el protocolo fue el siguiente:

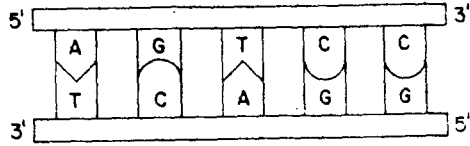
	Concentración final
5 μ l DNA	1 μ g
8 μ l dATP	20 μ M
8 μ l dCTP	20 μ M
8 μ l dGTP	20 μ M
3 μ l dUTP-Biotina	30 μ M
10 μ l Enzima (DNAsa I - DNapol I)	100 pg - 5 U

Se llevó a un volumen final de 100 μ l con agua bidestilada.

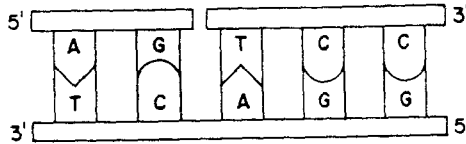
Se mezclaron e incubaron durante 1:30 hrs. a 15°C. Al término de este periodo se precipitó el DNA con medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y dos volúmenes y medio de etanol absoluto a -20°C. Se centrifugó a 12,000 rpm/ 4°C por 30 minutos, después se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 30 μ l de TE 1X.

Se checó la incorporación de la biotina por el método de detección estreptoavidina-peroxidasa sobre una membrana de nylon como se mencionará posteriormente.

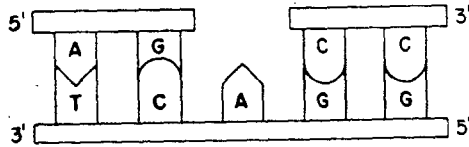
Secuencia de DNA



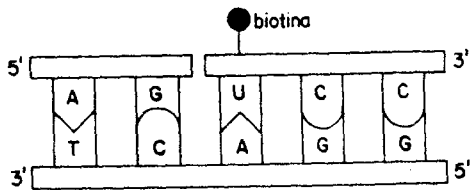
Corte por DNAsa I



Actividad de exonucleasa por DNA pol



Incorporación del nucleótido marcado por DNA pol



MARCAJE DEL DNA POR LA TECNICA DE "NICK TRANSLATION"

FIGURA 4

HIBRIDACION in situ (HIS)

1) El DNA de las preparaciones cromosómicas (portaobjetos), fue desnaturalizado incubando éstos en formamida al 70% en SSC 2X durante tres minutos a 70°C. Después se trataron con series de etanol absoluto frío al 70%, 90% y 100% por un minuto en cada uno de ellos.

2) En forma paralela se hirvió la Solución de Hibridación por 10 minutos y se pasó inmediatamente al hielo.

La Solución de Hibridación estuvo constituida de la siguiente manera:

- DNA marcado 40 ng
- Formamida 50%
- Dextran Sulfato 10%
- DNA de esperma
 de salmón 150 µg
- SSCP 10X 10 µl
- Se llevó con agua estéril a un volumen final de 100 µl.

La formamida es un agente que reduce la estabilidad térmica del DNA permitiendo la preservación de la morfología de los cromosomas con una buena eficiencia para la hibridación. Se ha demostrado que el dextran sulfato incrementa el rango de reasociación con DNA, y el DNA de esperma de salmón reduce las uniones no específicas de la sonda marcada.

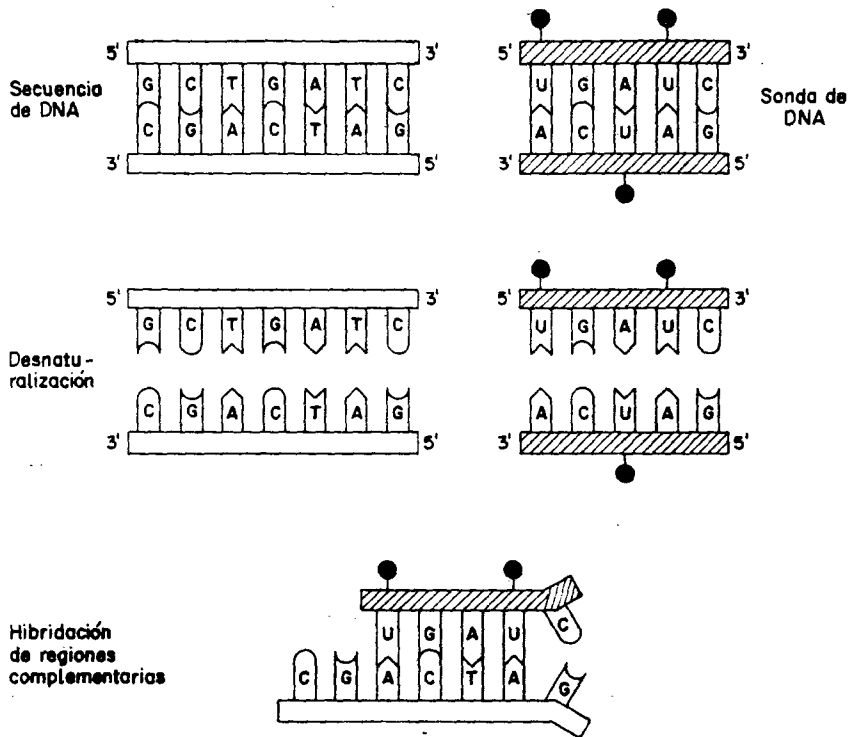
3) Se aplicaron 100 μ l de la Solución de Hibridación a cada laminilla, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con cemento plástico.

4) Se dejaron incubando toda la noche a 37°C en una cámara húmeda con formamida al 50% en SSC 2X. En la Figura 5 se esquematizan los eventos moleculares de la hibridación.

LAVADOS

1) Después del tiempo de hibridación se removieron los cubreobjetos y se lavaron las laminillas en tres cambios de formamida al 50% en SSC 2X, a 45°C por 5 minutos cada cambio.

2) Posteriormente se incubaron las laminillas durante 30 minutos en una solución bloqueadora compuesta de PBS 1X y leche descremada al 5% (leche sveltes).



EVENTOS MOLECULARES DE LA HIBRIDACION

FIGURA 5

DETECCION

La biotina es una vitamina del complejo B, también llamada vitamina H. Esta puede ser detectada por anticuerpos anti-biotina o por proteínas como la avidina o la estreptoavidina.

La avidina y la estreptoavidina son proteínas que se unen a la biotina. La afinidad de unión de éstas es extremadamente alta, casi el equivalente a un enlace covalente. La avidina es una glucoproteína presente en la yema del huevo, tiene un peso molecular de 66,000 daltons y un punto isoeléctrico de 10.5. Bajo éstas condiciones fisiológicas, sus carbohidratos se pueden unir a ciertas lectinas y debido a sus propias cargas positivas se pueden también unir a biomoléculas cargadas negativamente. Estas propiedades intrínsecas reducen significativamente la especificidad de la avidina, así como su utilidad en la detección de sondas biotiniladas. Contrariamente, la estreptoavidina (60,000 daltons) que es una proteína secretada por *Streptomyces avidinii*, no tiene carbohidratos y tiene un punto isoeléctrico neutro; así, su especificidad es mucho mayor que la avidina y ésta ha sido sustituida casi completamente por la estreptoavidina.

Para la detección de las sondas biotiniladas se utilizaron dos diferentes tipos de moléculas reporteras que van unidas a la estreptoavidina:

- Estreptoavidina-peroxidasa (enzima)
- Estreptoavidina-Rojo Texas (fluorocromo) (FISH)

* Ejemplos de éstas moléculas reporteras y de los pasos de la hibridación y detección los podemos observar en las Figuras 6 y 7.

Cuando la detección se llevó a cabo por medio de la Estreptoavidina-Peroxidasa, se utilizó el Kit para la detección de la biotina (Detek-Hrp Kit. Cat. 43820. ENZO.Co.) :

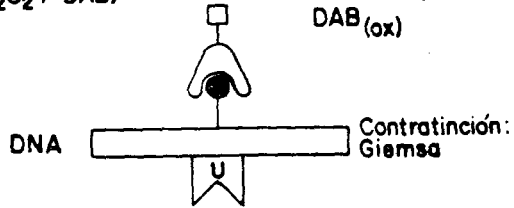
1) Después de los lavados se le agregaron 100 μ l de la Solución Stock del complejo Detek-Hrp a cada laminilla. Se protegieron con cubreobjetos y se incubaron por 30 min. a 37°C en cámara húmeda. (Sol. Stock: 998 μ l de PBS 1X / 2 μ l del Detek-Hrp).

2) Luego las laminillas se enjuagaron por 2 minutos en PBS 1X.

Estreptoavidina - Peroxidasa

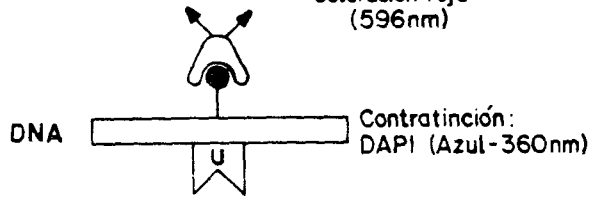
Substrato
($H_2O_2 + DAB$)

$H_2O +$
Precipitado
cafe oscuro
DAB (ox)



Estreptoavidina - Rojo Texas

Coloración roja
(596nm)



- Enzima (Peroxidasa)
- ▲ Flurocromo
- U Uracilo
- Biotina
- ∩ Estreptoavidina

FIGURA 6

HIBRIDACION Y DETECCION

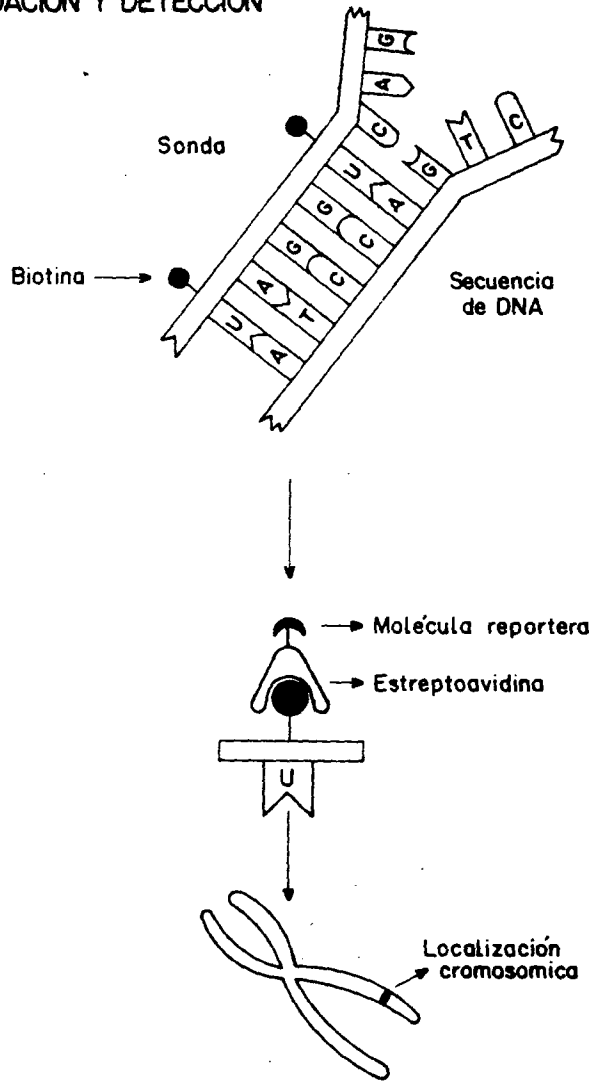


FIGURA 7

3) A 10 ml de PBS 1X se le agregaron 100 μ l de Peróxido de hidrógeno al 3% y 6 mg del cromógeno diaminobenzidina (DAB). De ésta solución se le agregaron 100 μ l a cada laminilla, se cubrieron con cubreobjetos y se dejaron incubando 30 minutos a temperatura ambiente. El peróxido de hidrógeno es necesario para llevar a cabo la reacción enzimática y de ésta manera en la reacción REDOX se forma un precipitado café oscuro.

4) Después del tiempo de la reacción enzimática, se enjuagaron rápidamente en PBS 1X y se contratificaron con Giemsa por 5 minutos.

5) Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico en campo claro.

* Para el caso de detección en membrana (chequeo de la sonda), 2 μ l de la sonda fueron depositados en la membrana de nylon y los pasos anteriores se siguieron, hasta obtener una mancha colorida.

Cuando la detección se realizó con Estreptoavidina-Rojo Texas (SA-5006 VECTOR), se le agregaron 100 μ l de ésta a una concentración final de 20 μ g/ml en PBS 1X. Se incubaron por 30 min. y se contratificaron con DAPI (cloruro del 4'6'-diamino-2-fenil-indol) a una Concentración final = 5 μ g/ml.

Las observaciones fueron en un microscopio de epifluorescencia utilizando los filtros específicos.

SOLUCIONES**Amortiguador TE 1X:**

10 mM Tris (2-amino-2(-hidroximetil)-1,3-propanodiol)
1 mM EDTA (Acido Etilendiamino tetracético) pH 7.9

Amortiguador SSC 20X:

0.15 M Cloruro de Sodio
0.015 M Citrato trisódico pH 7.0

Amortiguador SSCP 10X:

3 M Cloruro de Sodio
0.3 M Citrato trisódico
0.2 M Fosfato diácido de Sodio pH 7.0

Amortiguador PBS 10X:

8 g/l Cloruro de Sodio
0.2 g/l Cloruro de Potasio
1.15 g/l Fosfato ácido de Sodio
0.2 g/l Fosfato diácido de Potasio pH 7.0

* Todas las soluciones contenidas en frascos de color ámbar, fueron esterilizadas y almacenadas a temperatura ambiente.

RESULTADOS

En el presente trabajo se usó la técnica de hibridación in situ para la detección de secuencias de HPV sobre cromosomas. Como se mencionó en Materiales y Métodos, se utilizaron las líneas celulares CaSki, SiHa y T8, las cuales contienen secuencias de HPV de alto riesgo integradas, las características de las células CaSki y SiHa ya han sido descritas previamente (37). En general, todas las células cultivadas fueron crecidas hasta un 80 % de confluencia y su tratamiento con colchicina varió de línea a línea. Así, como se observa en la Tabla IV, el tiempo óptimo de tratamiento de la colchicina varió desde una hora en linfocitos hasta 24 hrs. en células CaSki.

Posteriormente, se procedió a realizar el bandeo G en los cromosomas de las diferentes líneas celulares, utilizando la técnica de tripsina-giema. Primeramente, lo que se observó fue que el número modal de cromosomas varió significativamente de una línea a otra, desde 46 a 90 cromosomas con tendencia a la triploidía (Tabla IV) y además se observaron una gran cantidad de rearrreglos cromosómicos, como son duplicaciones en tandem, pérdida de cromosomas y una gran cantidad de cromosomas marcadores. En los tres casos fueron leídas aproximadamente 30 metafases. Como ejemplo, la Figura 8 muestra el cariotipo de las células SiHa de pasajes avanzados, el cual presenta ganancia y pérdida de cromosomas. Una de las principales ganancias se observan

TABLA IV
OBTENCION DE CROMOSOMAS EN DIVERSOS
TIPOS DE CELULAS

CELULAS	TRATAMIENTO * C/COLCHICINA	No. MODAL DE ** CROMOSOMAS
CaSki	24 hrs.	80
SiHa	16 hrs.	64
T 8	12 hrs.	90
Linfocitos	1 hr.	46

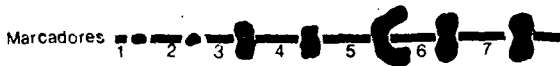
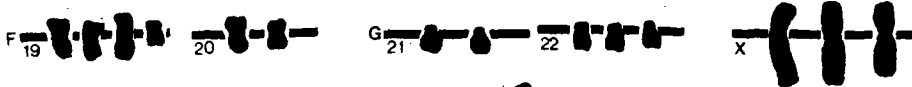
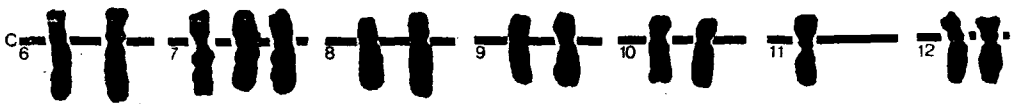
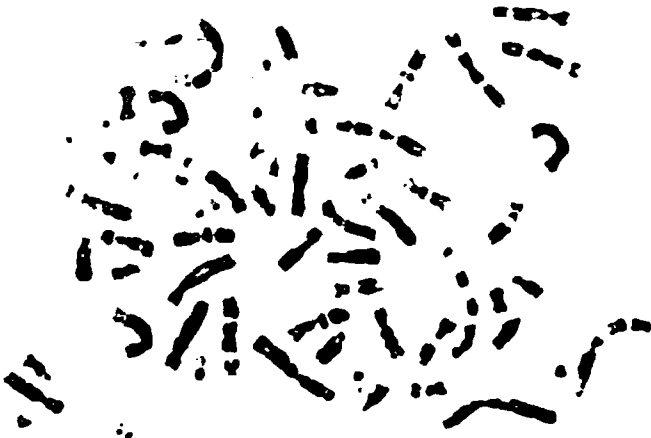
* El tratamiento con colchicina fue a una concentración final del 0.001%

** El No. de cromosomas se obtuvo del análisis de 50 metafases.

FIGURA 8

Cariotipo representativo con bandas G de células SiHa, mostrando las diferentes alteraciones cromosómicas.

CARIOTIPO DE CELULAS SiHa



en el cromosoma 3, uno de los cuales contiene duplicaciones en tandem en 3p25, se observaron trisomías en el 1, 5, 7, 14, 16, 17, 22 y X, monosomía del 11, así como 7 cromosomas marcadores, en los cuales no se pudo conocer su origen.

Las sondas utilizadas en las hibridaciones fueron marcadas con la molécula dUTP-Biotina mediante la Técnica de Nick Translation y posteriormente se checó la calidad del marcaje. Esta determinación fue realizada con el método de estreptoavidina-peroxidasa sobre una membrana de nylon. En la Figura 9 se muestra este resultado indicando que las sondas tuvieron una incorporación similar y aceptable de biotina.

Se utilizaron varios controles de especificidad del sistema. Uno de ellos fue realizado en preparaciones cromosómicas de linfocitos provenientes de un varón (46,XY), las cuales se hibridaron con una sonda específica para detectar el centrómero del cromosoma X humano. De esta manera, el varón por presentar un solo cromosoma X, se obtuvo una sola señal por metafase o interfase. En la Figura 10 A se muestra éste control, el cual fue realizado utilizando el fluorocromo Rojo-Texas y contrateñido con DAPI. En forma paralela, como control negativo, se utilizó al vector pGEM-Biotina hibridado contra linfocitos, en los cuales ninguna señal fue detectada (Figura 10 B), demostrando que no existe en el DNA genómico secuencias complementarias al vector.

FIGURA 9

Incorporación y detección de la biotina en las sondas de HPV y controles. Una vez marcada la sonda con biotina se procedió a depositar una alícuota en una membrana de nylon y posteriormente se desarrolló el sistema estreptoavidina-peroxidasa, usando como cromógeno la diaminobencidina. A: HPV-16-biotina; B: HPV-18-biotina; C: DNA genómico-biotina; D: pGEM-biotina; E: Centrómero del cromosoma X-biotina y F: pGEM.

**DETECCION DE LA INCORPORACION DE
BIOTINA EN LAS
SONDAS UTILIZADAS**

A



B



C



D



E

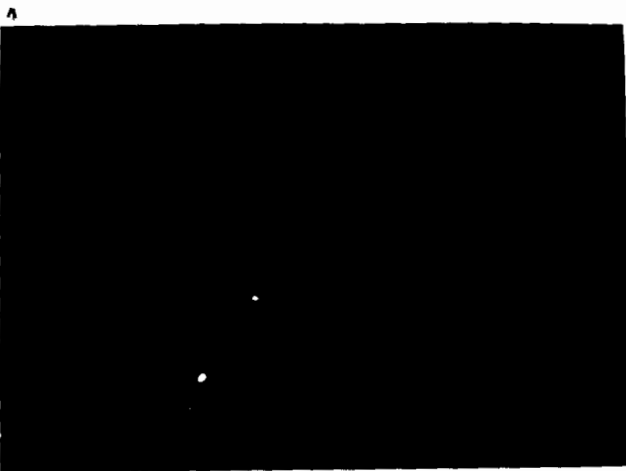


F

FIGURA 10

Controles de hibridación in situ en interfases y metafases de linfocitos. Se realizó la técnica de FISH utilizando estreptoavidina-Rojo Texas. A: Las preparaciones obtenidas de linfocitos de varón, fueron hibridadas con la sonda del centrómero del cromosoma X y contrateñidas con DAPI. B: Hibridación con la sonda de pGEM y C: con DNA genómico. En todos los casos las fotografías fueron tomadas por doble exposición, cambiando de filtros para Rojo Texas o DAPI.

THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
(COMMERCIAL)



Otro de nuestros controles fue hibridar con DNA genómico marcado, preparaciones cromosómicas de las distintas líneas celulares. Un ejemplo se observa en la Figura 10 C en la cual se obtuvo señal generalizada en todos los cromosomas.

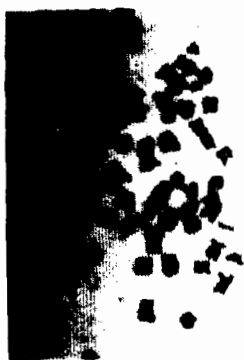
Cuando las preparaciones cromosómicas de las células CaSki y SiHa fueron hibridadas con la sonda de HPV-16-Biotina y reveladas por el sistema enzimático de peroxidasa, señales específicas fueron detectadas. En células CaSki existen por lo menos tres sitios diferentes de integración obtenidas en metafases e interfases (Figura 11 A y B), en tanto que en las células SiHa se detectó solo uno (Figura 12 A y B). Estos mismos resultados fueron reproducibles, cuando en la detección se usó el sistema Fluorescente tanto para CaSki (Figura 11 C), como para las células SiHa (Figuras 12 C y D).

Estudios más detallados se realizaron en la línea celular CaSki debido a su gran número de copias de HPV-16. En este caso se identificaron los cromosomas por grupo y se observó que habían dos diferentes patrones en cuanto a la señal obtenida (sitios de integración). En uno de ellos los sitios de integración se presentaron en tres diferentes cromosomas: en el cromosoma 3p25, en un cromosoma del grupo "C" en el brazo pmed y otro del grupo "E" en qter que al parecer podrían ser los cromosomas X y 18, respectivamente (Figura 13). Al igual que en células SiHa se observa alta segregación del cromosoma 3, pérdidas (grupo B) y ganancias (grupos C, E y F) de cromosomas.

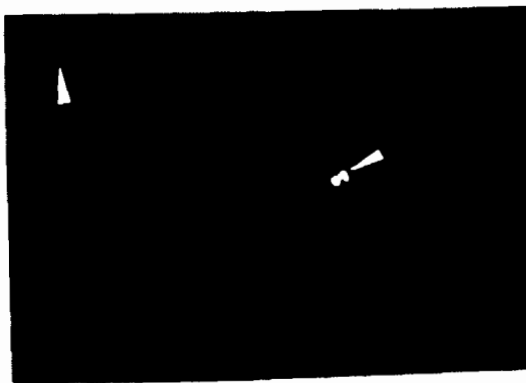
FIGURA 11

Detección de secuencias de HPV-16 en preparaciones cromosómicas de células CaSki. HIS con el sistema enzimático en metafase (A) e interfase (B), contrateñidas con Giemsa. Las flechas negras muestran los sitios de integración del virus. En C se observan dos de los cromosomas que se muestran en A, utilizando la técnica de FISH, las flechas blancas indican los sitios de integración.

**HIBRIDACION in situ CON HPV-16
EN CELULAS COSKI**



B

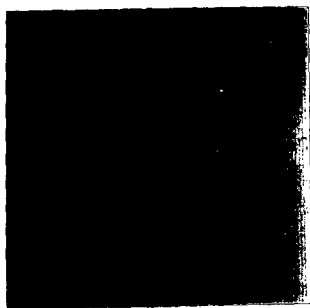


C

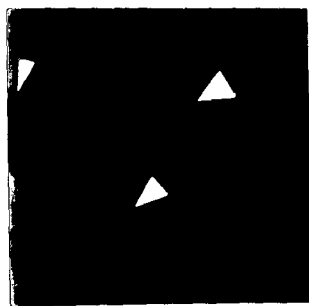
FIGURA 12

Detección de secuencias de HPV-16 en preparaciones cromosómicas de células SiHa. La hibridación in situ usando el método enzimático, revela un solo sitio de integración tanto en metafase (A), como en interfase (B). Lo mismo se observa con la técnica de FISH utilizando diferentes filtros para la observación del fluorocromo Rojo-Texas (C) y DAPI (D). Las flechas blancas y negras muestran las señales obtenidas.

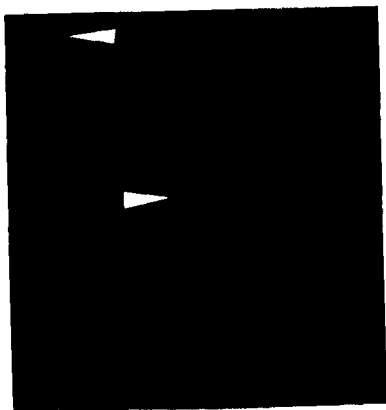
HIBRIDACION IN SITU CON HPV 16
EN CELULAS 3T3



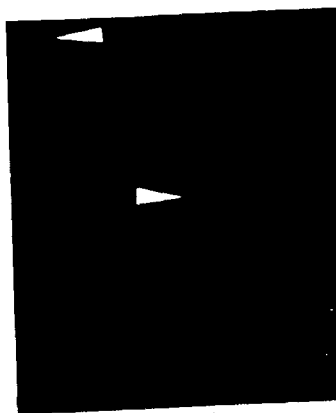
A



B



C

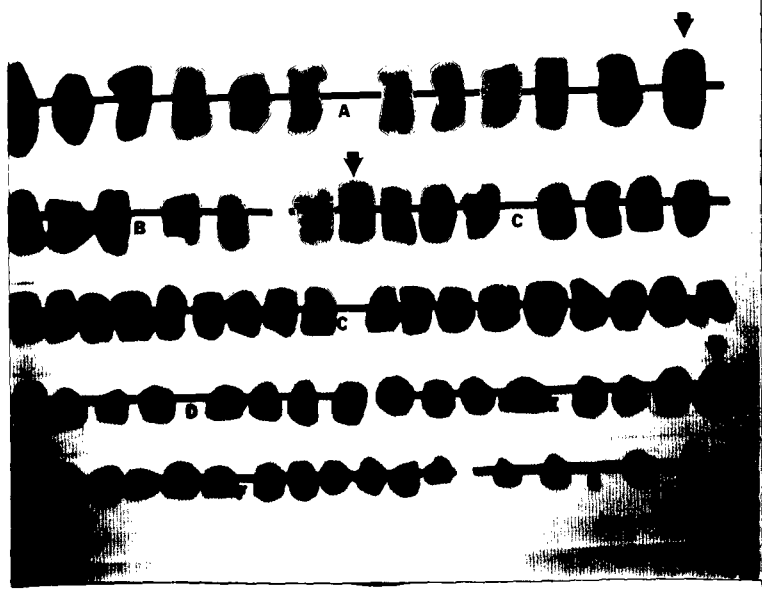
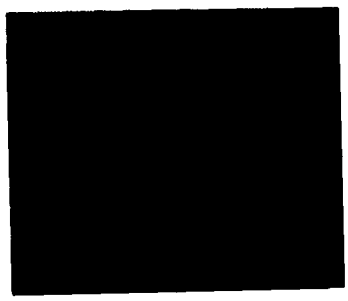


D

FIGURA 13

Cariograma de las células CaSki e HIS con HPV-16. Los cromosomas después de hibridados, fueron arreglados de acuerdo a su tamaño en los diferentes grupos. Las flechas indican los tres sitios de integración del virus en uno de los dos patrones de hibridación, el cual se observó en el 80% de las células; revelando que las señales se obtuvieron en un cromosoma del grupo "A", uno del grupo "C" y otro del "E".

LOCALIZACION DE HPV-16 POR HIB
EN CELULAS CASKI
(CARTOGRAMA)



En el otro patrón las señales de hibridación también fueron en los cromosomas mencionados anteriormente del grupo "C" y "E", pero además en el cromosoma 2p24, y en dos cromosomas del grupo "D", uno en Dqter y otro en Dpcent (Figura 14).

La hibridación en las células CaSki y T8 también fue realizada utilizando como sonda al HPV-18 y haciendo la detección con el sistema enzimático. Como se observa en la Figura 15 A y B, las señales de hibridación sólo se detectaron en el T8, donde existen varios lugares de integración de éste tipo viral. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro laboratorio por el Biól. Pedro Chávez, en donde por ensayos de Southern blot se detectan varias bandas de hibridación, aproximadamente unas 150 copias (Trabajo en preparación). El hecho de no detectar ninguna señal en las células CaSki (Figura 15 C) nos indica que nuestra técnica es tan sensible, que a pesar de la gran similitud entre los distintos tipos de HPV, se pueden detectar secuencias específicas de un solo tipo.

FIGURA 14

Cariograma e HIS en células CaSki que muestra el otro patrón de integración del HPV-16 que se observa en el 20% de las células estudiadas. Las flechas indican los cinco sitios de integración de las secuencias virales, las cuales fueron detectadas en un cromosoma del grupo "A", uno del grupo "C", dos del "D" y uno del "E". Los cromosomas del grupo "C" y "E" corresponden a los mismos de la Figura 13.

INIBICION DE HPV-
EN
CELULAS G4
(CARIOGRAMA)

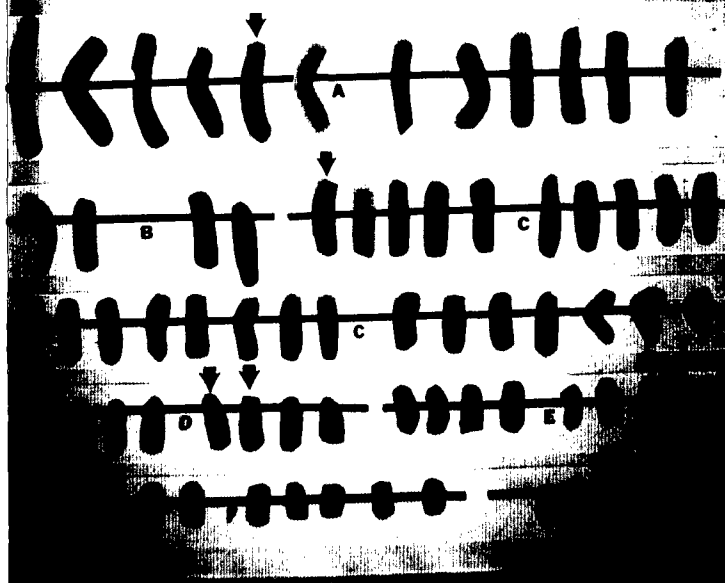
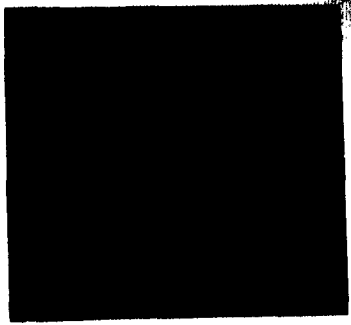


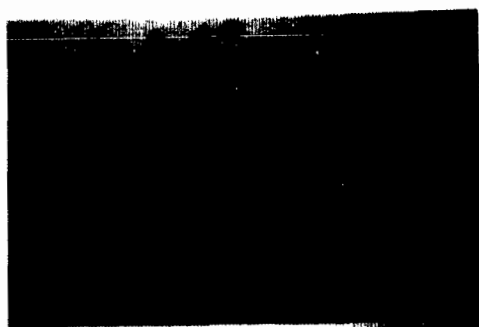
FIGURA 15

Múltiples sitios de integración viral en células T8. Las preparaciones cromosómicas de las células T8 fueron hibridadas con la sonda del HPV-18, y reveladas con el sistema enzimático, esto se muestra tanto en metafases (A), como en interfases (B). En este ensayo se utilizó como control de especificidad a las células CaSki hibridadas con HPV-18, en la cual no se observó ninguna señal de hibridación.

**HIBRIDACION in situ CON HEVLA
EN CELULAS T6 Y CASKI**



B



DISCUSION

Diversos estudios muestran que el CaCU es el resultado de la combinación de diversos factores etiológicos, entre los cuales el más importante puede ser el virus del papiloma humano. Gran cantidad de evidencias celulares y moleculares indican que las alteraciones genéticas, son las responsables para el desarrollo de la neoplasia (38). Por coincidencia, dichas alteraciones corresponden a sitios donde se localizan los proto-oncogenes celulares. El DNA del HPV se ha encontrado en cáncer genital humano y comunmente difiere en su estado físico (episomal o integrado). Esta integración se ha observado que ocurre en sitios frágiles, así como en secuencias cercanas a los proto-oncogenes, sugiriendo que estos genes celulares pueden ser activados en forma cis por las secuencias virales y así contribuir a la transformación celular.

Existe gran cantidad de líneas celulares derivadas de cáncer cervical, incluyendo la mayoría de los tumores primarios de origen cervical, los cuales contienen copias múltiples de secuencias de DNA del HPV integradas. Es interesante notar que el patrón de integración revela una marcada especificidad en la modificación del DNA viral, dicha integración lleva regularmente a la inserción del marco de lectura E1 - E2, rompiendo la organización de los genes tempranos (39).

Por otro lado, se ha visto que el virus de la Hepatitis B, se integra en el cromosoma 11 en los tumores de hígado (40). En el caso del virus del poliovirus en ratón, se ha demostrado que se integra en el cromosoma 14 o en el 15, lugar donde se encuentra el proto-oncogén myc (41).

En forma interesante, en el CaCU se ha encontrado que el HPV se integra cerca de proto-oncogenes, por ejemplo en el extremo 5' del gen myc en el cromosoma 8 (Ver Tabla III), lo cual provoca una expresión elevada de dicho gen (28). Se ha demostrado que en el 10% de los CaCU estudiados, el HPV-16 se integra junto al proto-oncogén myc (15). Todos estos resultados sugieren una preferencia en los sitios de integración por los virus de DNA, apoyando la idea de que genes celulares pueden ser activados por un efecto cis por estas secuencias virales.

Hasta este momento existe gran controversia en cuanto a la integración del HPV, es decir, algunos han encontrado que esta integración es específica y otros que es al azar (20 - 22). Con la aplicación de la técnica de HIS sobre cromosomas, es posible localizar con gran precisión los sitios de integración viral. Deseando conocer si la integración del HPV en cromosomas es específica, utilizamos dicha técnica, aplicándola en líneas celulares ya establecidas, las cuales contienen secuencias de éste virus integradas, para ello se utilizaron métodos no radioactivos (enzimáticos y fluorescentes), teniendo ventaja de los radioactivos

en tiempo y economía. En general, los resultados obtenidos muestran variaciones en los sitios de integración de las líneas estudiadas.

Para la obtención de las preparaciones cromosómicas de las diversas líneas celulares, se encontró que cada una de ellas debió ser tratada de manera diferente, es decir, variaciones en el tratamiento con colchicina. También el número modal varió entre dichas células. Esto sugiere que las condiciones para la obtención de los cromosomas en diversas líneas celulares epiteliales, debe de ser diferente.

Al realizar los cariotipos correspondientes para dichas células, se encontró un gran número de alteraciones que van desde deleciones, inversiones, duplicaciones entre otras, hasta ganancia o pérdida de cromosomas. Dichas variaciones en el material genético confirman que, en una célula transformada debe ocurrir una desestabilidad cromosómica representada esta por todas las alteraciones observadas. Otra posibilidad es que dichas alteraciones vayan ganándose en los pasajes de los cultivos celulares. Nuestros datos así, concuerdan con lo reportado en la literatura (37).

Cuando se realizó la HIS con HPV-16 en células CaSki, se observaron dos patrones de señal, uno en una proporción del 80% (Figura 13) y el otro en un 20% (Figura 14). Estos resultados sugieren que aunque se trata de una línea celular, existe una

heterogeneidad en el genotipo, esto mismo sucede en los tumores primarios, en donde se sabe que dichas neoplasias son clonales, pero que se puede encontrar diversidad en los genotipos de dichas células. Así, las células CaSki mostraron 6 sitios de integración. La intensidad de la señal obtenida en esos sitios, indica la presencia de múltiples copias de DNA viral. Los sitios de integración viral se encontraron en un cromosoma del grupo "C" y otro del "E", los cuales pueden ser los cromosomas X y el 18, respectivamente; en dos cromosomas del grupo "D", en 3p25 y 2p24. Estos dos últimos son de gran importancia, debido a que en ellos se localizan secuencias de los proto-oncogenes raf 1 y N-myc, respectivamente. Este último resultado concuerda con lo reportado por Couturier (28). En cuanto al cromosoma del grupo "D", en el cual la señal se observó en qmed-qter, en estos sitios se encuentran los genes Rb, fos y fes (cromosomas 13, 14 y 15, respectivamente). Con los presentes estudios no podemos precisar el cromosoma involucrado, pero Menchieva y col. reportan la existencia de un cromosoma marcador acrocéntrico (perteneciente al grupo "D"), en células CaSki, que presenta señal en qmed - qter (37).

Uno de los hallazgos interesantes es el hecho de que cuando la integración se localiza en el cromosoma 3, hay un mayor número de éste cromosoma llegando a segregarse hasta 9 veces (Figura 13), de igual manera esto también sucede en el cromosoma 2 (Figura 14), para tal evento cromosómico no tenemos explicación.

En el caso de las células T8, la señal de hibridación ocurrió en más de 10 sitios, sugiriendo que el HPV-18 se encuentra integrado en diferentes cromosomas y en diferente número de copias. Estos resultados fueron comprobables por nuestro grupo, donde por ensayos de Southern blot se obtuvo un patrón heterogéneo de señales, indicando lo anterior descrito.

Así, esto parece indicar que la integración del genoma del HPV dentro del DNA de la célula hospedera es un evento no estrictamente al azar, debido a que en un 49% se han encontrado integraciones en más de 19 cromosomas, pero con cierta especificidad en un 51% de los casos donde las integraciones se han encontrado en sitios preferenciales (22). De ésta manera, el papel del HPV en la transformación maligna de células epiteliales humanas, ocurre por un factor viral transactivador más que por la influencia de elementos regulatorios virales sobre genes celulares en cis. Además, en diversas líneas celulares derivadas de cáncer genital positivas para HPV, existe la expresión al menos de las oncoproteínas virales E6 y E7, las cuales son reguladas en forma negativa por la acción de la proteína del gen E2, que al no estar presente en estos casos, permite la función transactivadora de estos genes virales.

Nuestros datos coinciden en forma parcial con los encontrados en la literatura y las diferencias obtenidas pueden deberse al número de pasaje de las células estudiadas debido a los cambios

genotípicos aparecidos de pasaje a pasaje. El presente trabajo representa el primer reporte en nuestro país en su tipo, en la detección de secuencias de HPV en una línea celular mexicana derivada de cáncer cérvico-uterino, mediante la técnica de hibridación *in situ*.

CONCLUSIONES

1) Los cariotipos de cada línea celular son diferentes, presentando además gran cantidad de alteraciones cromosómicas.

2) En nuestras manos, la técnica de HIS sobre cromosomas, tuvo una sensibilidad comparativa con la técnica en que se usan radioisótopos, ya que se lograron detectar aproximadamente 16 kilobases específicas (2 copias de HPV).

3) Los resultados concuerdan parcialmente con lo reportado en la literatura, ya que en las células CaSki se localizaron seis sitios de integración; en tanto para las células SiHa, se encontró un sitio de integración viral.

4) En la línea celular mexicana T8, se encuentran más de diez sitios de integración del HPV-18.

5) Dado que los sitios de integración de los HPVs no siempre ocurren en los sitios donde se localizan los proto-oncogenes, se apoya la idea de que uno de los principales efectos de los HPV en las células de cáncer cervical, sea mediada por una transactivación por las oncoproteínas virales.

BIBLIOGRAFIA

- 1) **Rendón, M.J.** 1988. Cáncer Cérvico-Uterino. Información Epidemiológica. 3: 25-26.
- 2) **Broker, T.R. y Botchan, M.** 1986. Papillomavirus: Retrospectives and prospectives. Cancer Cells. 4: 17-35 .
- 3) **Benitez, B.L. y Quiñones, S.G.** 1991. El Cáncer ¿Un problema de Salud en México?. Rev. Méd. IMSS (Méx), 29: 195-214.
- 4) **Mohar, B.A.** 1993. Epidemiología del cáncer en México. Información Científica y Tecnológica. 15: 15-16.
- 5) **Figueroa-Arredondo P., y col.** 1990. Infección por el virus del papiloma humano y cáncer cérvico-uterino. Infectología. 10: 231-240.
- 6) **Gariglio, P. y García, A.** 1989/90. Papilomavirus humano y cáncer cérvico-uterino. Adel Microbiol Enf Infecc. 8: 45-58.
- 7) **Durst, M., Kleinheinz, A. y col.** 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. J Gen Virol. 66: 1514-1521.

8) Schneider-Maunoury, S., Croissant, O. y Orth, G. 1987. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumours. *J Virol.* 61: 3295-3298.

9) Cooper K. y col. 1992. Integration of human papillomaviruses types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 45: 382-384.

10) Fukushima M y col. 1990. The physical state of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 66: 2155-2161.

11) Yunis J.J. 1983. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221: 227-235.

12) Bishop, J. M. 1983. Celullar Oncogenes y Retroviruses. *Ann Rev Biochem.* 52: 301-354.

13) Land, H., Parada, L.F. y Weinberg, R.A. 1983. Cellular Oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science.* 222: 771.

14) Durst M, Gissmann L., y col. 1987. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 1070-1074.

15) Gariglio, P. y col. 1987. Human papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinomas. *Cancer Cells*. 5: 343-348.

16) Ocadiz, R., Saucedo, R. y col. 1987. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res*. 47:4173-4177.

17) Crook T. y col. 1990. Alterations in growth properties of human papillomavirus type 16 immortalized human cervical keratinocyte cell line correlate with amplification and overexpression of c-myc oncogene. *Oncogene* 5: 619-622.

18) Hori T. y col. 1991. Chromosomal Insertion and Amplification of Human Papillomavirus 16 DNA Sequences in a Cell Line of Argyrophil Small Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Jpn J Cancer Res*. 82: 371-375.

19) Popescu, N.C. y col. 1988. Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*. 44: 58-62.

20) Sastre-Garau X. y col. 1990. Human papillomavirus type 16 DNA is integrated into chromosome region 12q14-q15 in a cell line derived from a vulvar intraepithelial neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet*. 44: 243-251.

21) Smith P.P. 1992. Viral integration and fragile sites in human papillomavirus-immortalized human keratinocyte cell lines. *Genes Chromosome & Cancer*. 5: 150-157.

22) Popescu N.C. y DiPaolo J.A. 1989. Preferential sites for viral integration on mammalian genome. *Cancer Genet Cytogenet*. 42: 157-171.

23) Cannizzaro, L.A. y col. 1988. Human Papillomavirus Integration Sites Near Fragile Sites, Oncogenes, and Cancer Chromosome Breakpoints. *Cancer Genet Cytogenet*. 33: 93-98.

24) Popescu, N.C. 1990. Viral integration, fragile sites, and proto-oncogenes in human neoplasia. *Hum Genet*. 84: 383-386.

25) Chung, G.T. 1992. Genetic lesions in the carcinomagenesis of cervical cancer. *Anticancer Res*. 12: 1485-1490.

26) Swisshelm, K. 1992. Preferential chromosome loss in human papillomavirus DNA-immortalized mammary epithelial cells. *Genes Chromosome & Cancer*. 5: 219-226.

27) Popescu N.C y DiPaolo J.A. 1990. Integration of human papillomavirus 16 DNA and genomic rearrangements in immortalized human keratinocyte lines. *Cancer Res*. 50: 1316-1323.

28) Couturier, J. y col. 1991. Integration of Papillomavirus DNA near *myc* Genes in Genital Carcinomas and Its Consequences for Proto-Oncogene Expression. *J Virol.* 65: 4534-4538.

29) Popescu, N.C. y col. 1987. Human Papillomavirus Type 18 DNA is Integrated at a Single Chromosome site in Cervical Carcinoma Cell Line SW756. *J Virol.* 51: 1682-1685.

30) Callahan, D.E. 1992. Quantitation and mapping of integrated human papillomavirus on human metaphase chromosomes using a fluorescence microscope imaging system. *Cytometry.* 13: 453-461.

31) Bartsch O. and Schwinger E. 1991. A simplified protocol for fluorescence in situ hybridization with repetitive DNA probes and its use in clinical cytogenetics. *Clin. Genet.* 40: 47-56.

32) Wiegant, J. 1991. In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res.* 19: 3237-3241.

33) Pinkel D. y col. 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 9138-9142.

34) Babu V.R. y Wiktor A. 1991. A fluorescence in situ hybridization technique for retrospective cytogenetic analysis. *Cytogenet Cell Genet.* 57: 16-17.

35) Trask J.B. 1991. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genet.* 7: 149-154.

36) Kochel H.G. y col. 1990. Occurrence of human papillomavirus DNA types 16 and 18 in cervical smears as compared to cytological findings. *Int J Gynaecol Obstet.* 31: 145-152.

37) Mincheva A. y col. 1987. Chromosomal integration sites of human papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by in situ hybridization. *Med. Microbiol. Immunol.* 176:245-256.

38) Bishop J. M. 1987. The molecular genetics of cancer. *Science.* 235: 305-311.

39) Schwarz E. y col. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature.* 314: 111-114.

40) Nagaya T. y col. 1987. The mode of Hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes Dev.* 1: 773-782.

41) Sandros J. y Stenman G. 1990. Karyotypic instability and viral integration in polyoma virus-induced mouse salivary gland tumors. *Genes Chromosome & Cancer*. 2: 109-115.