



6 03081
2ej.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**ASOCIACION DE VARIANTES DE LOS VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
(VPH) Y LOS ONCOGENES RAS EN EL CANCER CERVICO UTERINO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

P R E S E N T A :

M. en I.B.B. MARCELA LIZANO SOBERON

ASESOR: DR. ALEJANDRO M. GARCIA CARRANCA

MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

25 7832



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y en el Departamento de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, bajo la dirección del Dr. Alejandro M. García Carrancá. La tesis fue aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Investigación Biomédica Básica por el siguiente jurado :

Presidente:	Dr. Patricio Gariglio Vidal
Secretario:	Dr. Adolfo García Sainz
Vocal:	Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Vocal:	Dr. Carlos Federico Arias Ortiz
Vocal:	Dr. Luis Covarrubias Robles
Suplente:	Dr. Vianny Ortiz Navarrete
Suplente:	Dra. Angelina Quintero Ruíz

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyectos 170- M9209 y F383

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (IN211394)

Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Postgrado-UNAM

A Carlos
Mi amigo, Mi compañero, Mi amor

A lo más valioso de mi vida, mis niños Daniel y Carlos

**Y siempre con mucho amor, admiración y
agradecimiento a mis padres, Edgar y Estela
y a mis hermanos, Edgar y Susana**

Agradecimientos:

Estoy particularmente agradecida con el Dr. Alejandro García Carrancá, mi director de tesis, por la invaluable formación y amistad siempre generosa.

Agradezco el apoyo brindado por el Instituto Nacional de Cancerología para poder realizar el doctorado contando con los recursos físicos y humanos del Instituto. En especial, a los Drs. Alvaro Osornio, Saúl Villa, Alejandro Mohar y Jaime de la Garza; y en particular hago un agradecimiento póstumo al Dr. José Luis Ramírez Gaitán, por la facilidad que me dio para la obtención del material biológico.

A todos mis compañeros y amigos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y del Instituto Nacional de Cancerología : Ana Laura, Carla, Miriam, Lupita, Laura, Hilda, Mayra, César, Enrique, Néstor, Víctor, Salomón, Imelda, Edith, Julia, José, Benito, Adela, Alejandro, Caty, Enrique, Claudia, Ana María, Chela, Alejandra y todos aquellos que involuntariamente omito, por tanta ayuda en tantos momentos. En especial a Roberto, por su muy valiosa amistad. Sinceramente agradezco a Miriam, Olga, Adela, Jorge, Vilma y Rocío, que con su trabajo me ayudaron a afinar esta tesis. A Eva y a Betty, por haberme ayudado incontables veces, siempre con buena disposición.

Me siento endeudada con el Instituto de Investigaciones Biomédicas y los amigos con los que he compartido mi vida durante tantos años en un ambiente estimulante. Ellos, Biomédicas y la Universidad conforman una importante parte de mi vida. A Gabriel mi entrañable amigo, por los buenos tiempos compartidos, por hacer el trabajo tan ameno y por brindarme ese importante apoyo en los momentos más oportunos.

Finalmente, a un nivel más personal, necesito darle una disculpa a mi familia, en particular a mis hijos Daniel y Carlos, por las horas que les he robado para escribir esta tesis. Solo quiero que sepan que ellos han sido mi inspiración.

Indice	pag.
Resumen	1
Abstract	2
Introducción :	
El problema	3
Anatomía del cuello uterino	4
Historia natural del cáncer de cérvix	6
Etapificación clínica	7
Tipos histológicos	8
Factores de riesgo	11
Patogénesis viral y epidemiología	11
Los virus de papiloma en el desarrollo del cáncer humano	13
El ciclo de los HPV en los epitelios en diferenciación	14
Propiedades de los virus de papiloma	15
Transformación por HPV	17
Los genes E6 y E7 en la transformación celular	18
La región de control viral y los sitios AP-1	21
Los oncogenes celulares <i>ras</i>	21
Cooperación de HPV con los oncogenes <i>ras</i> en la transformación	26
Los genes <i>ras</i> en el desarrollo del cáncer cérvico uterino	27
Caracterización molecular de HPV y distribución de tipos virales	27
Variantes de HPV	30
¿Diferencias en comportamiento biológico de variantes de HPV?	32
Objetivos	34
Material y Métodos	35
Resultados :	40
Artículo: Lizano M, Berúmen J, Guido MC, Casas L, García-Carrancá A:	33
Association between human papillomavirus type 18 variants and the histopathology of cervical cancer. J Natl Can Inst 89:1227-1231, 1997.	
Figuras	46
Discusión	55
Conclusiones	66
Referencias	68

Indice de figuras y tablas

	pag
Figura 1. Tres tipos de unión escamocolumnar	5
Figura 2. Diagrama de la cascada de señales de Ras a través de la vía de Raf	25
Figura 3. Arbol filogenético de los virus de papiloma humano	29
Figura 4. Análisis por SSCP-PCR de la presencia de mutaciones en los genes <i>ras</i>	46
Figura 5. Análisis por SSCP-PCR de la presencia de mutaciones en el exón 2 de <i>K-ras</i>	47
Figura 6. Secuencia directa de productos de PCR del exón 2 de <i>K-ras</i>	48
Figura 7. Activación transcripcional del promotor P105 de HPV-18 por <i>K-ras</i>	49
Figura 8. Efecto de <i>K-ras</i> sobre la expresión de la proteína E6 en tumores	50
Figura 9. Efecto de <i>K-ras</i> mutado en los niveles de E6 en los tumores de cérvix	51
Figura 10. Variaciones genómicas de los fragmentos L1 y LCR de aislados de HPV-16, HPV-18 y HPV-45	52
Figura 11. Arbol filogenético de variantes de HPV-16	53
 Tabla I. Sistema de etapificación de la FIGO	 7
Tabla II. Clasificación histológica de tumores epiteliales del cérvix	10
Tabla III. Función de distintas regiones del genoma de los HPV	17
Tabla IV. Frecuencia de mutaciones en <i>K-ras</i> en tumores del cuello uterino	54

Resumen

En México, el cáncer cérvico uterino constituye un problema de salud muy importante, ya que representa la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina. Cerca del 90% de los tumores cervicales son de la variedad de células escamosas. Los adenocarcinomas, los carcinomas adenoescamosos y de células pequeñas son poco frecuentes, pero representan entidades clínicamente importantes. Estos tipos histológicos tienen un peor pronóstico relativo y presentan un comportamiento biológico más agresivo que los tumores de origen escamoso.

A pesar de que son varios los eventos implicados en el desarrollo del cáncer de cérvix, actualmente los virus de papiloma humano (HPV) son los factores de mayor importancia etiológica. En estudios con poblaciones de todo el mundo se han encontrado variaciones genómicas de diferentes aislados de HPV-16 y HPV-18. Hasta ahora, no se ha demostrado que estas variaciones se correlacionen con características patológicas de los tumores.

Aparentemente la infección por HPV, aun de alto riesgo, no es suficiente por si sola para inducir el desarrollo del carcinoma cervical, por lo que otros factores deben de estar involucrados. Se ha demostrado que los oncogenes virales E6 y E7 son capaces de immortalizar cultivos de células primarias, pero la transformación celular posterior requiere de la cooperación de los genes *ras*. Varios estudios señalan la importancia de las mutaciones en los genes *ras* en tumores ginecológicos; sin embargo, su papel en tumores del cérvix todavía es controversial.

El interés de este trabajo fue buscar algunos factores que pudieran intervenir en el desarrollo y/o pronóstico de distintas presentaciones histológicas del cáncer cérvico uterino. Se analizó tanto la presencia de mutaciones activadoras en los codones relevantes de los 3 genes *ras* como la presencia y tipo de variantes de HPV en una muestra de tumores de cérvix de pacientes mexicanas. El exón 2 de *K-ras* se encontró mutado con alta frecuencia en los tumores con un componente glandular (adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos). Esto sugiere que el oncogen *K-ras* podría contribuir a los mecanismos de transformación neoplásica en estos tipos celulares.

El 73% de los tumores analizados fueron positivos a HPV, fluctuando entre 85% y 54%, según el grupo histológico. Encontramos la presencia de variantes de HPV de los tipos 16, 18 y 45. La variante de HPV-16 tiende a asociarse con tumores de pacientes de menor edad, en comparación con la clona de referencia. Esto sugiere un comportamiento biológico más agresivo para esta variante. El hallazgo más importante sobre HPV en este estudio es la asociación aparentemente exclusiva, entre una de las variantes de HPV-18 y los tumores de células escamosas, lo que podría reflejar un comportamiento menos agresivo para esta variante. En contraste, la clona HPV-18 de referencia podría relacionarse con un comportamiento muy agresivo al presentarse en un porcentaje elevado de los tumores de células pequeñas y de los adenocarcinomas del cérvix. La asociación de ciertas variantes de HPV con tipos histológicos específicos de cáncer cérvico uterino, sugiere que diferentes factores celulares influyen en la capacidad de transformación viral, o que variantes específicas de HPV presentan alguna ventaja en crecimiento en ciertos tipos celulares.

Abstract

In Mexico, cervical cancer constitutes a serious health problem and represents the first cause of death from cancer in Mexican women. Close to 90% of cervical tumors have a squamous origin. Although adenocarcinoma, adenosquamous carcinoma, and small-cell carcinoma of the uterine cervix are reported to be low in incidence, these types of tumors are clinically important, since they usually exhibit a more aggressive biologic behavior and a poorer prognosis than squamous cell carcinomas.

There are many factors implicated in cervical cancer development, but human papillomavirus (HPV) is the most important. DNA sequence variations among different isolates of HPV-16 and HPV-18 have been found worldwide. To date, these variations have not been shown to correlate with pathologic features.

It seems that an HPV infection alone, even of high risk type, is not enough to develop a cervical cancer and that another factors should be involved. It had been shown that viral oncogenes E6 and E7 can immortalize primary cell cultures, but later cellular transformation requires *ras* oncogene cooperation. A number of studies have addressed the incidence of *ras* mutations in gynecologic cancers, but its role in cervical cancer is still controversial.

The aim of this work was to find some factors possibly involved in the prognosis or development of particular histologic forms of cervical carcinoma. We analyzed the presence of activating *ras* mutations and HPV variant status in a sample of tumors of the uterine cervix from Mexican patients. We found that mutations in exon 2 of *K-ras* are relatively frequent in adenocarcinomas and adenosquamous cervical carcinomas. This suggests that this oncogene may contribute to malignant transformation in these cellular types.

73% of the analyzed tumors were positive to HPV sequences, ranging between 85% and 54% depending on the histologic type. We found variants of HPV types 16, 18, and 45. The HPV-16 variant seems to be associated with tumors from younger patients, compared to the reference clone. This suggests a more aggressive biological behavior for this variant. The most important finding concerning HPV in this study, was the apparently exclusive association of an HPV-18 variant and squamous cell carcinoma. Possibly meaning a less aggressive behavior for this variant. In contrast, the reference clone may have a more aggressive behavior since it was found to associated with all other histologic types except squamous carcinoma. The association of certain HPV isolates and the histopathologic characteristics of tumors suggests either that different cellular factors can influence viral transformation ability, or that certain HPV variants present a growth advantage over particular cellular types.

Introducción

El problema

El carcinoma cérvico uterino (CaCU) es una enfermedad de distribución universal, que ocupa el quinto lugar en frecuencia entre las neoplasias de todo el mundo. Cada año ocurren cerca de 465,000 nuevos casos de cáncer de cérvix, y 200,000 muertes por esta enfermedad. Se calcula que debido al cáncer cérvico uterino, en promedio se pierden 17 años de vida por cada muerte, antes de los 70 años de edad; esto da un estimado de más de 3.4 millones de años de vida, perdidos cada año por esta causa en todo el mundo (Parkin, et al., 1988).

Este padecimiento representa un problema de salud muy importante principalmente en los países no industrializados, donde ocupa el primer lugar en frecuencia de cáncer en la población femenina. La información más reciente muestra que en México, el cáncer cérvico uterino se colocó en tercer lugar como causa de mortalidad por tumores malignos, además de ser responsable de 21,554 defunciones registradas en México entre 1990 y 1994 (Tapia et al., 1996). La edad promedio de las mujeres mexicanas que presentan esta patología es de 48 años, pero el grupo de mujeres cuyas edades fluctúan entre 35 y 44 años son las más afectadas. La mitad de las mujeres con carcinoma *in situ* tiene menos de 35 años.

Desafortunadamente, el cáncer de cérvix en etapas tempranas produce muy pocos síntomas, de modo que las pacientes que nunca se han realizado un Papanicolaou a menudo se les diagnostica la enfermedad en fases avanzadas. De este modo resulta claro que el factor más importante para disminuir la mortalidad por cáncer de cérvix es la participación en programas de detección oportuna. Mediante estos programas muchas pacientes con neoplasia cervical serán diagnosticadas cuando la enfermedad todavía se encuentre confinada al epitelio. Las nuevas y sofisticadas tecnologías que permiten evaluar la función celular en mayor detalle, muestran que el carcinoma cervical varía enormemente de acuerdo a su comportamiento biológico. Por esta razón, para que la

terapia pueda ser propiamente individualizada, resulta muy importante evaluar todas las variables histológicas y clínicas que puedan repercutir en el pronóstico.

Anatomía del cuello uterino

El útero y el endocérnix se originan de los conductos mülerianos, que distalmente se unen al epitelio vaginal para formar el ectocérnix (Krantz, 1973). El ectocérnix se fusiona con el canal endocervical cerca de la abertura externa; el sitio en el que el canal endocervical se une al istmo se le llama abertura interna. Originalmente, el epitelio escamoso se une con el epitelio columnar secretor de moco del endocérnix en la región de la abertura externa (unión escamocolumnar). La posición anatómica de esta región varía entre diferentes mujeres, así como en las diferentes fases de la vida de una misma mujer. Este proceso ocurre como consecuencia de factores hormonales que influyen en la conformación del cérnix durante la vida fetal, la pubertad y particularmente el embarazo. Por ejemplo, durante la infancia, la unión escamocolumnar se mueve hacia el ectocérnix, debido a la eversión de los labios cervicales (ectopia).

El endocérnix se compone de papilas estromales delineadas con epitelio mucinoso. El espacio o los nichos entre las papilas (criptas) se denominan “glándulas”, aunque no son glándulas verdaderas. Durante los años reproductivos, el epitelio columnar endocervical se “transforma” y es reemplazado por epitelio escamoso. Este proceso ocurre en la región de la unión escamocolumnar “original”, delineando una zona circular irregular alrededor de la abertura, que varía en su ancho y se llama *zona de transformación* o *zona T* (ver figura 1). Esta zona se encuentra principalmente en los labios anterior y posterior del cérnix. La transformación se puede dar por la porción en crecimiento del epitelio escamoso hacia la región del epitelio columnar, o por el reemplazo de las células columnares desde abajo, por células de reserva que presentan metaplasia escamosa; este evento caracteriza el potencial de las células de reserva de diferenciarse hacia componentes escamosos o glandulares. El epitelio escamoso gradualmente reemplaza a las células columnares endocervicales, uniéndose a las papilas endocervicales y cambiando la superficie irregular de las papilas, a una superficie lisa. La

zona T es donde se origina la gran mayoría de las lesiones precancerosas y los carcinomas invasores del cérvix.

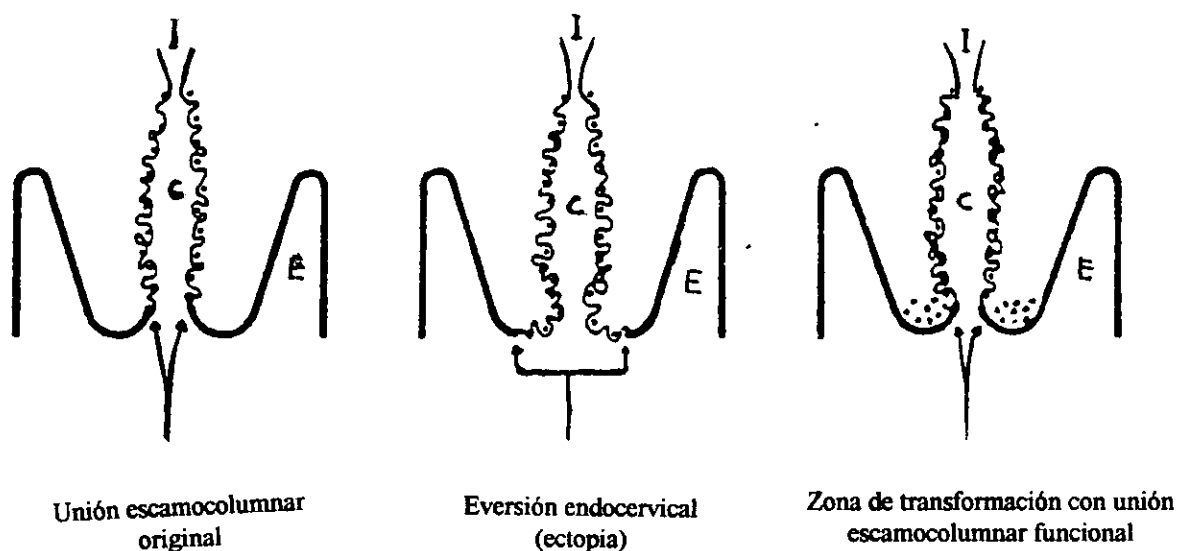


Figura 1. Tres tipos de unión escamocolumnar. El ectocérnix se encuentra totalmente cubierto con epitelio escamoso nativo y la unión escamocolumnar ocurre en la abertura externa (izquierda). Un ectopismo del endocérnix mantiene a la unión escamocolumnar “original” abajo de la abertura externa, en el exocérnix (centro). Una ectopia substituida por epitelio escamoso forma la zona de transformación; la nueva unión escamocolumnar de la zona de transformación se localiza en la abertura externa (derecha). C = epitelio columnar endocervical; I = istmo uterino; E = epitelio escamoso.

Historia natural del cáncer de cérvix

Las neoplasias intraepiteliales del cérvix (NIC) se definen como lesiones escamosas intraepiteliales en proliferación, que presentan maduración anormal, alargamiento nuclear y atipia (aglutinación gruesa de la cromatina y contornos nucleares irregulares). A estas lesiones se les llama displasia (leve, moderada o severa) o NIC (I-III). Tradicionalmente, las diferentes lesiones intraepiteliales del cérvix se han considerado como una serie de cambios moleculares que se acumulan, más que tratarse de eventos morfológica o biológicamente distintos que inevitablemente progresan de uno al siguiente (Richart, 1993). Esta visión se ha modificado en parte por el descubrimiento de que ciertos tipos de virus de papiloma humano generalmente se asocian sólo con displasias leves (HPV-6, HPV-11). Además, se ha visto que las lesiones leves presentan un contenido de DNA diploide o poliploide, lo que correlaciona con su tendencia a revertir (Bibbo et al., 1989; Fu et al., 1988). En contraste, las displasias moderadas o severas frecuentemente son aneuploides, presentan un mayor grado de atipia celular y tienen mayor tendencia a persistir o progresar (Bibbo et al., 1989; Fu et al., 1983; Fu et al., 1988). A pesar de esta nueva visión, el panorama no es tan claro ya que no se pueden distinguir, consistentemente, las lesiones precancerosas verdaderas de lesiones benignas que sean citológica o histológicamente similares. Del mismo modo, la variabilidad en la historia natural de lesiones biológicamente similares puede estar influenciada por una gran diversidad de factores.

No se conoce el tiempo que se requiere para que una lesión evolucione desde displasia leve a displasia severa, o para que eventualmente progrese a un cáncer invasor y es imposible determinarlo mediante observación directa. No sería ético ni pragmáticamente posible que un grupo de mujeres que presentan lesiones epiteliales, aparentemente peligrosas y potencialmente progresivas, se dejen sin tratamiento para solamente observar su evolución. Sin embargo, se han desarrollado modelos matemáticos para tratar de entender lo que podría suceder. Estos modelos se basan en los datos de varios estudios que involucran mujeres de diferentes edades, con diferentes factores epidemiológicos de riesgo. Se ha calculado que el tiempo promedio que le toma a una lesión epitelial progresar de un grado al siguiente, es aproximadamente de 5 años (Barron

y Richart, 1968); y de 1 a 30 años (con un promedio de 10 a 13 años) lo que le toma a una displasia severa o NIC III, para progresar a cáncer invasor (Gustafsson et al., 1989).

Etapificación clínica

La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) ha definido los criterios más aceptados, hoy en día, para la etapificación clínica del CaCU (FIGO, 1995) (ver Tabla I). La enfermedad preinvasora (NIC) se coloca en una categoría aparte. El sistema FIGO se basa en un cuidadoso examen clínico y en los resultados de estudios radiológicos y procedimientos específicos. La etapa clínica debe de asignarse antes de que se administre una terapia definitiva y nunca debe cambiarse en base a los hallazgos posteriores. Las reglas y observaciones del sistema FIGO son parte integral del sistema de etapificación clínica que deben observarse estrictamente para evitar incongruencias entre instituciones.

Tabla I. Sistema de etapificación de la FIGO

Etapa 0	Carcinoma in situ, intraepitelial
Etapa IA	Carcinoma invasor, confinado estrictamente al cérvix, diagnóstico sólo microscópico. IA1: invasión al estroma menor de 3 mm de profundidad; IA2: invasión al estroma de 3 a 5 mm de profundidad
IB	Carcinoma invasor confinado al cérvix, diagnóstico macroscópico. IB1: lesión clínica menor de 4 cm; IB2 lesión clínica mayor de 4 cm
Etapa IIA	El cáncer se extiende más allá del cérvix, sin alcanzar la pared pélvica; involucra a la vagina sin comprender al tercio inferior, no hay invasión al parametrio;
IIB	Invade al parametrio
Etapa IIIA	El cáncer invade el tercio inferior de la vagina
IIIB	Se extiende a la pared pélvica
Etapa IVA	El cáncer se extiende más allá de la pelvis o abarca clínicamente la mucosa de la vejiga o el recto, se disemina a órganos adyacentes
IVB	El cáncer se disemina a órganos distantes

Tipos histológicos

El conocimiento del origen y comportamiento del carcinoma invasor del cérvix se ha incrementado en los últimos años. Muchos estudios al respecto se basan en la morfología del carcinoma cervical. Ahora sabemos que el CaCU se manifiesta en distintas presentaciones histológicas, cuya nomenclatura se basa en su comportamiento y no en algunas características morfológicas universales que definen al cáncer (Tabla II). La información obtenida del registro histopatológico de neoplasias malignas en México (Tapia et al., 1996), señala que la variante histológica más frecuente en México es el carcinoma de células escamosas (91.5%), al que le siguen en orden de importancia el adenocarcinoma (3.7%), el carcinoma adenoescamoso (1.7%) y otras variedades menos frecuentes, entre las que se encuentra el carcinoma de células pequeñas.

Cerca del 80% al 90% de los carcinomas cervicales son del tipo escamoso. Las variedades más comunes del carcinoma de células escamosas son el de células grandes queratinizantes y no queratinizantes. Estas tienen en común una diferenciación celular escamosa, tanto en la formación intracelular de puentes como en la queratinización. Sin embargo, las variedades no queratinizantes presentan queratinización de células únicas, mientras que el tipo queratinizante presentan la formación de perlas de queratina (revisado por Benda JA, 1994).

Anteriormente, el diagnóstico de adenocarcinoma estuvo limitado a aquellos tumores en los que había una arquitectura glandular identificable. En la nueva clasificación, muchos subtipos de adenocarcinoma todavía presentan características glandulares; sin embargo, ahora dentro del tipo mucinoso existen algunos subtipos que no presentan esas características (Kurman et al., 1992). De igual forma, carcinomas con una diferenciación glandular mínima con presencia de mucina intracelular, se aceptan como adenocarcinomas pobremente diferenciados. El carcinoma endometrioide se asemeja a tumores de origen endometrial, sin mucina intracelular. Debido a su parecido con carcinomas del cuerpo uterino, el carcinoma endometrioide suele presentar problemas en la determinación del sitio primario. El adenoma maligno es un tipo de adenocarcinoma muy difícil de diagnosticar, dado que aunque las células glandulares pueden presentar

formas anómalas, la atipia celular es mínima. El diagnóstico usualmente se hace posterior a la histerectomía, donde la profundidad de la proliferación glandular es su principal distintivo. Entre otros subtipos de adenocarcinoma de cérvix están los viloglandulares, que son tumores bien diferenciados en los que la fina vasculatura se cubre con epitelio de tipo cervical, endometrial o intestinal (revisado por Benda, 1994).

La clasificación del carcinoma adenoescamoso en un principio incluyó tumores con arquitectura glandular y diferenciación escamosa en el mismo tumor. La categoría expandida incluye carcinomas pobremente diferenciados que, con diferenciación celular y producción intracelular de mucina, en ocasiones se les llama carcinomas mucoepidermoides.

El grupo de carcinomas de células pequeñas, aunque numéricamente pequeño, es muy particular. Contiene células tumorales pequeñas, con escaso citoplasma, núcleo redondo a ovalado, nucleolo pequeño o ausente y alta actividad mitótica. Este tipo celular representa menos del 1% de las neoplasias cervicales (Miller et al., 1991). Los tumores de células pequeñas más agresivos son los que presentan diferenciación neuroendócrina (Sheets et al., 1988; Silva et al., 1984).

Algunos estudios indican que existen diferentes factores de riesgo asociados a CaCU según el tipo histológico. El carcinoma de células escamosas es el de mejor pronóstico (Platz et al., 1995). Para el adenocarcinoma se reporta peor pronóstico que para el carcinoma escamoso (Hopkins et al., 199; Drescher et al., 1989). Se ha demostrado una supervivencia similar para los dos tipos histológicos en enfermedad localizada, pero una menor supervivencia para el adenocarcinoma en etapas más avanzadas. Para el carcinoma adenoescamoso también se reporta un comportamiento agresivo y en los estudios poblacionales presenta la menor supervivencia tanto en enfermedad localizada como diseminada (Platz et al., 1995).

El carcinoma de células pequeñas también se ha identificado como uno de los grupos de peor pronóstico (Gersell et al., 1988; Van Nagell et al., 1988), aunque los estudios más recientes indican que los tumores neuroendócrinos de células pequeñas en

realidad tienen el peor de los pronósticos, con los que sugieren un tratamiento mucho más agresivo (O'Hanlan et al., 1991).

Aunque anteriormente el tipo histológico parecía no tener un gran valor predictivo como extensión del cáncer cérvico uterino, actualmente se observa que la clasificación resulta importante. En la actual clasificación histológica, las pequeñas categorías que antes eran abarcadas por categorías más grandes, ahora resulta que se han definido porque presentan verdaderas implicaciones en el pronóstico.

Tabla II. Clasificación histológica de tumores epiteliales del cérvix

A. Carcinoma de células escamosas

1. No-queratinizante
2. Queratinizante
3. Verrugoso
4. Papilar transicional
5. Tipo-linfoepitelioma

B. Adenocarcinoma

1. Mucinoso (endocervical, intestinal)
2. Endometriode
3. Viloglandular bien diferenciado
4. Adenoma maligno
5. Células claras
6. Seroso
7. Mesonéfrico

C. Otros tumores epiteliales

1. Carcinoma adenoescamoso
2. Carcinoma de células vidriosas
3. Carcinoma adenoide quístico
4. Carcinoma adenoide basal
5. Tumor carcinoide
6. Carcinoma de células pequeñas

Factores de riesgo

Numerosos estudios epidemiológicos han tratado de implicar a través de los años una gran variedad de agentes como factores de riesgo para desarrollar cáncer cérvico uterino. En primer lugar, se ha postulado que es una enfermedad de tipo venéreo, causado predominantemente por un agente infeccioso transmitido por vía sexual (Beral, 1974). Las evidencias sugieren que tanto para la neoplasia intraepitelial como para el carcinoma invasor, el número de parejas sexuales y la edad del primer contacto sexual son factores de riesgo independientes, a pesar de que los dos estén inevitablemente ligados. Se ha sugerido que el cérvix adolescente es más susceptible a influencias carcinogénicas, dados los cambios hormonales propios y la metaplasia que ocurre, se piensa que una temprana edad para el primer contacto sexual puede incrementar la sensibilidad a los efectos de un agente transmitido sexualmente (Reeves et al., 1985). Si un agente de transmisión sexual es en gran parte responsable de la aparición del cáncer de cérvix, se esperaría encontrar una asociación entre el comportamiento sexual de la pareja masculina y la presentación de cáncer cérvico uterino en su mujer. Algunas observaciones son consistentes con esta asociación, e incluso la más convincente sugiere que el riesgo para desarrollar CaCU en mujeres monógamas se relaciona con el número de parejas sexuales que han tenido sus maridos (Buckley et al., 1981).

Son varios los agentes de transmisión venérea que han sido implicados, en diferentes momentos, en la etiología del cáncer de cérvix. Sin embargo, actualmente se considera al virus de papiloma humano o HPV (del inglés Human Papillomavirus) como el agente más importante en la etiología del CaCU.

Patogénesis viral y epidemiología

Los agentes infecciosos que actualmente se asocian directamente con la etiología del cáncer cérvico-uterino, son los HPV (zur Hausen et al., 1976). Desde que Dürst y sus colegas en 1983, aislaron por vez primera el DNA de HPV de células de cáncer cervical, un gran número de investigadores han confirmado el papel que tienen estos virus en la carcinogénesis del cuello uterino (Crum et al., 1984; Lorincz et al., 1987;

Reeves et al., 1989). El HPV se asocia claramente tanto con las lesiones intraepiteliales del cérvix (lesiones precursoras), como con el carcinoma invasor (Broker and Botchan, 1986). Con base en la prevalencia de HPV encontrada en lesiones precursoras y en cáncer invasor, los tipos de HPV pueden dividirse en categorías de riesgo oncogénico (Lorincz et al., 1992). Se ha observado que el genoma de los HPV, denominados de “alto riesgo” (como son los HPV-16, 18, 45 y 31), se encuentra en el 90% de las lesiones precursoras y de cáncer invasor (Boshart et al., 1984; Dürst et al., 1983; Crum et al., 1984). En contraste, los HPV de “bajo riesgo” (como son HPV-6 y 11) se encuentran predominantemente en los condilomas vulvovaginales frecuentes y los condilomas exofíticos del cérvix poco comunes (Gissman et al 1983; Willett et al., 1989). Evidencias recientes, obtenidas de estudios prospectivos de pacientes con lesiones preneoplásicas, apoyan la conclusión de que la progresión de la enfermedad se asocia con infecciones de HPV de alto riesgo (Remmik et al., 1995).

Los estudios epidemiológicos realizados en varios países muestran que la asociación de HPV con las neoplasias del cérvix es muy importante, independientemente a otros factores de riesgo (Muñoz et al., 1992; Bosch et al., 1993; Schiffman et al., 1993). Recientemente, en un estudio a nivel mundial llevado a cabo por “The International Biological Study of Cervical Cancer” (IBSCC), se detectó la presencia de algún tipo de HPV en más del 93% de los tumores invasores de cérvix (Bosch et al., 1995). Algunos estudios muestran que hasta en el 28% de las mujeres pueden ocurrir infecciones ocultas por HPV (Koutsky et al., 1988; Schneider et al., 1987). Sin embargo, la relación entre infección y transformación neoplásica no es directa, y aun no son claros los mecanismos por los cuales la infección oculta evoluciona hasta la lesión intraepitelial, que posteriormente progresa, en algunos pacientes, a cáncer invasor (Koutsky et al., 1988).

Se han propuesto algunos factores que influyen en el desarrollo y en la historia natural de lesiones intraepiteliales asociadas a estos virus e incluyen: el tipo de HPV (Reid et al., 1987), el estado inmunológico de la mujer (Koutsky et al., 1988), el tabaquismo (Layde, 1989), el estado hormonal (Verreault et al., 1989), el estado particular de la zona de transformación (zona T) y la edad (Coppelson and Brown, 1975). El desarrollo de una lesión precancerosa del cérvix aparentemente involucra varios

eventos. La exposición a algún tipo de HPV de “alto riesgo” probablemente produce una infección inicial del epitelio escamoso en la zona T, seguido por alteraciones morfológicas y biológicas de las células infectadas por el HPV. Aunque en este proceso no es clara la interacción entre HPV y genes celulares, algunos estudios apoyan la participación de alteraciones en oncogenes celulares, para que se produzca un cáncer invasor (DiPaolo et al., 1989).

Los virus de papiloma en el desarrollo del cáncer humano

Resulta interesante ver que las descripciones más antiguas que mencionan posibles infecciones asociadas con HPV en condilomas clásicos (verrugas exofíticas) en los genitales externos, tanto de hombres como de mujeres, datan de la era de los romanos. En el siglo pasado se observó que en ocasiones, las verrugas genitales se convertían en carcinomas de células escamosas de manera extraña, en vulva y pene (revisado por zur Hausen, 1977). Comúnmente se interpretaba que este evento no estaba relacionado con algún agente infeccioso, a pesar de que la naturaleza infecciosa de las verrugas fue reconocida por Ciuffo (1907), cuando él mismo se indujo la formación de verrugas después de auto-inocularse extractos de verrugas libres de células. En 1922 Lewandowsky y Lutz (1922) describieron una condición hereditaria muy extraña, la epidermodisplasia verruciforme, caracterizada por verrugas atípicas que cubrían largas áreas de la piel. La naturaleza infecciosa de estas verrugas fue demostrada por Jablonska y sus colegas (1972), también por la auto-inoculación de extractos libres de células. En 1936 dos patólogos húngaros, Baló y Korpássy, trataron de establecer una posible relación entre ciertos tipos de cáncer y cierto tipo de verrugas, en material de autopsias (Baló & Korpássy, 1936). No fue sino hasta la década de los 70s cuando se reconoció que los HPV podrían tener un papel en el desarrollo de las neoplasias cervicales. El DNA del primer HPV genital que se describió fue el de HPV-6 (Gissman et al., 1980), el cual se detectó en una verruga genital (condiloma acuminado), posteriormente se clonó y caracterizó. Esto permitió primero, el aislamiento del DNA de un HPV muy relacionado (HPV-11) en papilomas de laringe y de verrugas genitales; y después, el DNA de dos tipos virales lejanamente relacionados, el HPV-16 y el HPV-18, directamente de biopsias

de cáncer de cérvix (Dürst et al., 1983; Boshart et al., 1984). A pesar de que en 1976 el propio zur Hausen ya había postulado que los HPV podrían tener algún papel importante en el desarrollo del cáncer ano-genital, fue el aislamiento del DNA de los HPV tipos 16 y 18 lo que dio la base para los estudios experimentales que lo confirmaron.

El ciclo de los HPV en los epitelios en diferenciación

Los virus de papiloma son especie-específicos e inducen proliferaciones epiteliales o fibroepiteliales benignas de la piel y mucosa en humanos y en varias especies animales. Estos virus tienen un tropismo específico y absoluto por las células epiteliales escamosas, y su ciclo productivo completo sólo ocurre en ellas. Se cree que la infección por HPV empieza en las células basales, que son mitóticamente activas. Después de la infección, el virus puede permanecer latente, replicarse y producir partículas infecciosas o integrarse al genoma celular. La infección productiva se divide en varias etapas que dependen del estado de diferenciación de las células epiteliales en cuestión. El ciclo completo, que incluye la síntesis de DNA viral, la producción de las proteínas de la cápside viral y el ensamblaje de los viriones, ocurre selectivamente en queratinocitos terminalmente diferenciados (Pfister, 1987). Las células de la capa basal que proliferan, a pesar de que contienen DNA de HPV, parecen ser poco activas en la expresión de algunas proteínas virales. Aparentemente existen factores celulares que regulan negativamente la transcripción viral en estas células. Esta regulación se libera, cuando las células infectadas migran hacia arriba del epitelio en la capa granulosa, donde sufren un programa de diferenciación hasta que ya no pueden dividirse. En estas células empieza la transcripción activa de secuencias virales tempranas y tardías, se sintetizan proteínas virales y las partículas virales se ensamblan en algunas de las células superficiales (Baker et al., 1987.). Dado que estos virus no se pueden propagar con facilidad en el laboratorio, no han sido estudiados con las técnicas de virología tradicionales. Solo recientemente se han logrado avances en la propagación de estos virus, mediante cultivos organotípicos de células epiteliales (Meyers et al., 1994). Por este motivo, la mayoría del conocimiento acerca de los virus de papiloma en los últimos 15 años, ha provenido de la investigación

básica y del análisis y empleo de las secuencias nucleotídicas de los DNA virales clonados.

Propiedades de los virus de papiloma

Los virus de papiloma se encuentran en muchas especies de vertebrados, desde las aves hasta el hombre. Tienen forma icosaédrica y contienen un genoma circular de doble cadena de DNA; sin embargo, ahora se reconoce que están separados de otros miembros de la familia de los papovavirus (como polioma y SV40), en base a sus diferentes características biológicas y genéticas. El DNA circular de los virus de papiloma consta de 8,000 pares de bases (contra 5,000 de los poliomavirus), y el virión mide 55 nm (contra 40 nm del poliomavirus).

Los virus de papiloma constituyen mucho más de 100 tipos de virus humanos y animales, clasificados por la relación de sus genomas; es decir, la secuencia de nucleótidos en el DNA. Todos los HPV caracterizados se vinculan con lesiones confinadas a las capas epiteliales de la piel o las mucosas oral, faríngea, respiratoria y, de mayor importancia, anogenital. A pesar de su variedad, todos los virus de papiloma animal y humano parecen compartir una organización genética similar, aunque con diferencias tanto en las funciones de los genes virales individuales, como en su regulación.

En las células epiteliales infectadas con papiloma (verruga), los genomas de HPV típicamente se replican como plásmidos circulares, no integrados. A su vez, muchos carcinomas cérvico-uterinos contienen fragmentos de DNA de HPV integrados (Cullen et al., 1991). Aunque la integración parece ocurrir al azar en muchos sitios cromosómicos de la célula, los fragmentos virales invariablemente conservan una parte específica del genoma viral (Schneider et al., 1989; Wilczynski et al., 1988).

En la tabla III se muestra una lista de algunas funciones asignadas a las distintas regiones de los HPV. A diferencia de los virus del polioma, los marcos abiertos de lectura (ORFs) que pudieran servir para codificar proteínas del HPV, solamente se localizan en una de las dos cadenas de DNA viral. El genoma de HPV puede dividirse en tres

regiones: 1) una región reguladora denominada región larga de control (LCR), que tiene secuencias de control para la replicación y expresión genética de HPV; 2) una región temprana (E) que codifica para proteínas virales involucradas en la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación; y 3) una región tardía (L) que codifica para las proteínas de la cápside viral L1 y L2. La transcripción genética tardía está vinculada íntimamente al programa de diferenciación de las células del huésped, células epiteliales planas o queratinocitos. La síntesis y expresión elevadas del DNA viral de los genes L1 y L2 sólo ocurre en las capas superiores de la piel o el epitelio plano. Esta división funcional se basa en los estudios genéticos llevados a cabo en el virus de papiloma bovino (BPV1) (Lowy et al., 1980). En tejidos con infecciones que producen partículas virales de HPV (como es el caso de las verrugas), el RNA mensajero se transcribe tanto de la región temprana como de la tardía del genoma (Baker, 1987). En infecciones que no producen partículas virales (como se observa en las células de la capa inferior del epitelio en una verruga), el RNA mensajero solo se transcribe de la región temprana del genoma.

Los transcritos virales más abundantes en células de carcinoma, se inician en la región no-codificante y terminan en secuencias celulares. Tienen el potencial de codificar cada uno de los ORFs de E6 y E7, así como de productos alternos de E6, llamados E6* (Baker et al., 1987A; Schneider-Gädicke et al., 1986; Smotkin et al., 1987). En líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix no se han detectado productos E6 *, sólo se han identificado las proteínas E6 y E7 (Seedork et al., 1987; Androphy et al., 1987; Banks et al., 1987), lo que sugiere que alguna o ambas de estas proteínas están involucradas en el desarrollo del cáncer.

Tabla III. Función de distintas regiones del genoma de los HPV

<i>Gen</i>	<i>Producto</i>	<i>Función y propiedades</i>
L1	Proteína L1	constituyente principal de la cápside
L2	Proteína L2	minoritaria de la cápside; ensamblaje de los viriones
E1	Proteína E1	inicio de la replicación del DNA viral, helicasa ATPasa
E2	Proteína E2	regula la transcripción, auxiliar en la replicación viral, forma complejos con E1
E4	Proteína E4	proteína tardía; rompe la red de citoqueratinas citoplásmicas
E5	Proteína E5	transformante, asociada a membrana; interacciona con receptores de factores de crecimiento
E6	Proteína E6	transformante; promueve la degradación de p53; activa a la telomerasa
E7	Proteína E7	transformante; se une a la proteína de retinoblastoma, p130 y c-jun; activa la transcripción
LCR		secuencia reguladora de la transcripción temprana; contiene el origen de replicación viral y elementos de respuesta a diversos factores, entre ellos hormonas

Transformación por HPV

Si bien los primeros estudios acerca de la transformación por papilomavirus se realizaron con el virus de papiloma bovino (BPV-1), la mayoría de los estudios posteriores han sido efectuados con los HPV tipo 16 y 18, dado que estos se asocian con cáncer de cérvix humano. Los principales genes inmortalizantes (transformantes) de los HPV son E6 y E7. Se ha encontrado que E7 es suficiente para transformar cultivos de

células inmortalizadas de ratón (Bedell et al., 1987; Phelps et al., 1988). La capacidad de extender la vida de las células de estos cultivos es característica de los HPV de “alto” y no de “bajo riesgo” (Barbosa et al., 1991). Además E7 es capaz de cooperar con oncogenes ras en la transformación de cultivos primarios de células de rata (Matlashewski et al., 1987).

En los tumores de cérvix que contienen secuencias activas de HPV, parece ocurrir una selección por la integridad de la región codificadora de E6-E7 y por la región larga de control (LCR). Regularmente se observa que los genes E6-E7 se expresan en tumores de cuello uterino y las células derivadas de ellos (Schwarz et al., 1985; Yee et al., 1985). Por otra parte, la integración del genoma viral al cromosoma hospedero se asocia con el rompimiento de los genes E1 o E2 (Dürst et al., 1987; Schwarz et al., 1985; Berumen et al., 1994). La proteína E2 es un factor regulador muy importante; modula negativamente la transcripción de los genes E6 y E7 (Thierry & Yaniv, 1987; Desaintes et al., 1997; Hwang et al., 1993; Dowhanick et al., 1995). Cuando el virus se integra al genoma hospedero, suele interrumpirse el gene E2, por lo que ya no se sintetiza una proteína E2 funcional. El resultado es el aumento en la expresión de los genes E6 y E7 ya que su promotor es liberado de la acción inhibitoria de E2. La pérdida de E2 durante la integración se considera el mecanismo mediante el cual la integración promueve la oncogénesis (Romanczuk & Howley, 1992; Hwang et al., 1993), aunque se reporta que este requisito no es indispensable en todos los casos (Hecht et al., 1995; Berumen et al., 1994). Se especula que al aumentar el número de las copias del genoma viral, aumenta la expresión de los genes E6 y E7, aun en la ausencia de integración viral (Berumen et al., 1994).

Los oncogenes E6 y E7 en la transformación celular

Las proteínas E6 y E7 de los HPV de alto riesgo son oncoproteínas que contribuyen de manera decisiva a la transformación celular mediante su efecto sobre proteínas que son críticas en la regulación del ciclo celular. Las proteínas E6 y E7 se conservan y expresan invariablemente en carcinomas cérvico-uterinos, así como en líneas celulares derivadas de éstos. La proteína E7 comparte con las proteínas E1A de

adenovirus y el antígeno T grande del virus SV40, una similitud en la secuencia de algunas regiones que son críticas para las propiedades transformantes de estas tres proteínas. Las proteínas celulares que se encuentran asociadas con E7 incluyen al producto del gen de susceptibilidad a retinoblastoma (pRB) y las proteínas relacionadas p107 y p130 (DeCarpio et al., 1988; Münger et al., 1989). También se ha detectado una actividad de cinasa, dependiente de ciclina, que puede ser el resultado de la interacción directa entre E7 y ciclina A (Tommasino et al., 1993). Las proteínas E7 de los virus de “alto riesgo” contribuyen a la progresión carcinogénica, al menos en parte, mediante su interacción con pRB. Como consecuencia de esta interacción ocurre la disociación del complejo formado por pRB y el factor de transcripción E2F-1 (Chellappan et al., 1992). Posteriormente, la liberación de E2F-1 de estos complejos activa la expresión de ciertos genes lo que permite la progresión del ciclo celular hacia la fase S (inicio de la síntesis de DNA). No se ha establecido cual es la contribución de interacciones entre E7 y otras proteínas celulares, al proceso de transformación. Los estudios llevados a cabo por Jewers et al. (1992) muestran que en el contexto del genoma viral completo, ciertas mutaciones en E7 que impiden su unión con pRB, no anulan la capacidad viral de immortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos; sin embargo, la mutación en un sitio crítico de E7 elimina completamente la capacidad de immortalización viral. Con esto los autores proponen que existen otros blancos celulares de E7 involucrados en su función de immortalización. Por otra parte, la proteína E7 parece poseer al menos algunas funciones independientes de E2F-1 de las descritas para E1A; por ejemplo, E7 es capaz de unirse a c-jun y con esto activar la transcripción de genes con elementos de respuesta a AP1 (Antinore et al., 1996).

Las propiedades transformantes de la proteína E6 se observaron en estudios sobre cultivos primarios de queratinocitos humanos (Münger et al., 1989; Hawley-Nelson et al., 1989). Así como se observa para el antígeno T grande de SV40 y la proteína E1B de adenovirus, las proteínas E6 de los HPV de alto riesgo logran formar un complejo con la proteína de supresión tumoral p53, lo que *in vitro* promueve la degradación de p53 (Werness et al., 1990; Scheffner et al., 1990). La interacción de E6 con p53 está mediada

por la proteína celular E6AP, lo que promueve la ubiquitinación de p53, dando lugar a su proteólisis (Scheffner et al., 1993; Huibregtse et al., 1991).

De manera indirecta E6, al igual que E7, pudiera promover el avance del ciclo celular al permitir la activación de genes dependientes de E2F-1. Las proteínas pRB y similares se fosforilan por la acción de cinasas compuestas, dependientes de ciclinas (CDK). Las proteínas hiperfosforiladas pRB y similares ya no se unen a E2F-1, por lo que permiten la activación de genes dependientes de E2F-1. Las ciclinas se destruyen durante la mitosis y gradualmente se resintetizan en momentos específicos, por lo que cada CDK es activa en una etapa específica del ciclo celular (Sheer, 1993). La tarea de entrar a la fase S se realiza cuando cantidades crecientes de ciclinas específicas que forman CDKs activas superan un umbral determinado de concentración de un inhibidor específico de cinasa dependiente de ciclina (CKI) (Sheer, 1995). Un inhibidor crítico (CKI) de fase S es WAF/CIP1, que se sintetiza a velocidades relativamente bajas en células normales durante la división. No obstante, su concentración se eleva en respuesta a síntesis de DNA no programada, como la de reparación de DNA inducida por radiación, la mutagénesis inducida por UV o la replicación viral de DNA. Estas vías implican la inducción de cifras altas de p53, principal activador de WAF/CIP1 (El-Deiry, 1993). La degradación de p53, promovida por su interacción con E6, impide que la proteína p53 se estabilice y active la transcripción de WAF/CIP1, ante los daños producidos al DNA celular. La proteína p21/WAF/CIP1 inactiva ciertas cinasas y así permite que el ciclo celular se detenga mientras los daños del DNA se reparan. Aparentemente, las células que tienen E6 no tienen una p53 funcional (Mietz et al., 1992). La capacidad de immortalización y transformación de E6, a pesar de que no puede ser completamente explicada por su interacción con p53, parece ser responsable de la inestabilidad cromosómica que se observa en las células infectadas con los HPV de alto riesgo (White et al., 1994; Havre et al., 1995). E6 también pudiera tener otras actividades: bajo ciertas condiciones experimentales esta proteína logra activar la transcripción de determinados promotores (Sedman et al., 1991).

La región de control viral y los sitios AP-1

El promotor más importante del genoma viral se encuentra localizado en la llamada región larga de control, o LCR ("long control region"), que se extiende entre el final de la región tardía (L2) y el inicio de la temprana (E6) y generalmente comprende una décima parte del genoma viral (aproximadamente 800 pb). Una gran variedad de factores celulares, entre los que se encuentran AP-1, NF1, Oct1, GRE y Sp1, participan en el control de la actividad transcripcional de esta región y regulan la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 (García-Carrancá. et al., 1988; Gloss et al., 1989; Mack et al., 1991).

Los factores de transcripción AP-1 juegan un papel muy importante tanto en la célula como en el virus, ya que intervienen en procesos de proliferación, maduración y transformación. El complejo AP-1 consiste de dos proteínas nucleares codificadas por las familias de proto-oncogenes *c-jun* y *c-fos* (Rauscher et al., 1988). Los cambios que ocurren en la actividad AP-1 en respuesta a múltiples señales extracelulares son regulados tanto a nivel de la transcripción, como a nivel de los cambios en las proteínas ya existentes. En particular, HPV-18 tiene en su LCR, 2 sitios de unión a AP-1 que juegan un papel muy importante en el control de su actividad transcripcional (Thierry et al., 1992). Se ha demostrado que el gen *H-ras* mutado es capaz de incrementar la expresión de los oncogenes virales a través de los sitios AP-1 (Binétruy et al., 1991; Medina-Martínez et al., 1997). Esta activación se explica con la observación de que *c-jun* es capaz de cooperar con *H-ras* activado para promover la transformación de fibroblastos embrionarios de rata (Schütte et al., 1989), y esta cooperación involucra la fosforilación de *c-jun* por cinasas que son moduladas por *H-ras*.

Los oncogenes celulares *ras*

Aparentemente, la infección por algún tipo de HPV, aun de alto riesgo, no es suficiente por sí sola para inducir el desarrollo del carcinoma cervical. Esto se deduce del hecho de que sólo una pequeña fracción de aquellos individuos que están infectados por algún HPV eventualmente desarrolla cáncer. Además, normalmente el intervalo entre la

infección viral y la aparición de cáncer invasor puede ser de hasta varias décadas (Binétruy et al., 1991). Por lo tanto, es claro que la información genética del virus no es suficiente para la progresión maligna y que otros factores deben de estar involucrados. Es decir, en una célula infectada se requiere de mutaciones genéticas adicionales para que se desarrolle un cáncer. Esto sugiere que la infección por virus de papiloma debe de actuar sinérgicamente con otros factores. Como se ha mencionado, diversos estudios *in vitro* han demostrado que los genes E6 y E7 de los HPV tienen la capacidad de inmortalizar cultivos de células primarias (Pirisi et al., 1987; Bedell et al., 1989); sin embargo, la transformación celular posterior requiere la cooperación de algunos oncogenes, como los de la familia *ras* (Matlashewski et al., 1987; Crook et al., 1988). A su vez, algunos estudios muestran que las mutaciones activadoras de los genes de la familia *ras*, no son suficientes para transformar cultivos de células primarias y que se requiere de la cooperación de otros oncogenes para ello (Finney & Bishop, 1993). Con esto se propone que algunos eventos relacionados con la activación de la vía de *ras*, podrían ser necesarios para el desarrollo de un carcinoma de cérvix.

Los genes de la familia *ras* pertenecen a una superfamilia de genes que codifican proteínas que unen e hidrolizan nucleótidos de guanina. Estas proteínas transmiten señales desde la membrana al interior de la célula y funcionan entre un estado activo, unido a GTP, y uno inactivo, unido a GDP (Barbacid, 1987). En las células en reposo, la mayoría de las moléculas Ras se encuentran en una conformación inactiva (unida a GDP), mientras que la estimulación de las células con mitógenos o agentes inductores de la diferenciación, incrementan la forma activa (unida a GTP).

Los humanos (al igual que los roedores) presentan tres genes *ras* funcionales: H-*ras*, K-*ras* y N-*ras*, que se encuentran en los brazos cortos de los cromosomas 11, 12 y 1, respectivamente (Barbacid, 1987). Aunque el tamaño de estos genes es diferente, dada la diferencias de longitud en sus intrones, codifican para proteínas de 189 aminoácidos (Lowy, 1993). Las proteínas Ras se pueden encontrar en todos los tejidos (Furth et al., 1987). Cada uno de los genes *ras* presenta diferentes patrones de expresión (Leon et al., 1987), lo que sugiere que al menos uno de los tres genes *ras* se expresa en todos los tipos celulares. La región carboxilo terminal de las proteínas Ras es

característica de cada miembro de la familia y probablemente juega un papel importante en determinar sus especificidades funcionales. En esta región heterogénea se llevan a cabo modificaciones post-traduccionales, que incluyen la adición de productos de la vía de biosíntesis del colesterol. Estos eventos dan lugar a una proteína más hidrofóbica, que presenta mayor afinidad por las membranas. Los cambios post-traduccionales se requieren para que *ras* sea transformante, dado que los genes *ras* activados pierden su actividad transformante cuando se introducen mutaciones adicionales que convierten a la proteína en citosólica (Willumsen et al., 1984; Ulsh et al., 1984).

Las proteínas Ras tienen actividad intrínseca de GTPasa, lo que limita la vida media de las especies activas (revisado por Kaziro et al., 1991). Solamente cuando las proteínas *ras* están unidas a GTP son capaces de mandar estímulos mitogénicos al núcleo celular, a través de una cascada de señales intracelulares. En su estado fisiológico normal, las proteínas Ras rápidamente hidrolizan el GTP, a través de su actividad intrínseca de GTPasa. Esta reacción es fuertemente estimulada por las proteínas GAP, las cuales aumentan la capacidad de hidrólisis de *ras* hasta en 10,000 veces. Las mutantes transformantes de *ras* generalmente se encuentran bloqueadas en su actividad de GTPasa, por lo que la forma activa (Ras-GTP) se acumula y de esta manera se piensa que las señales se transducen por periodos más prolongados (Barbacid, 1987).

Son varios los estímulos extracelulares que promueven la activación de las proteínas Ras, lo que generalmente se encuentra mediado por receptores de membrana que son tirosín-cinasas. La activación de Ras, involucra a su vez la interacción con moléculas efectoras específicas, que son proteínas intracelulares que median los siguientes pasos en el proceso de transducción de señales (ver figura 2). Se han propuesto varios efectores de Ras, que incluyen las cascadas de cinasas de Raf, MEK y MAPK (Kyriakis et al., 1994). Estas cinasas están involucradas en la vía que afecta *ras* y que repercute en la fosforilación de ciertos residuos de los factores de transcripción AP-1. Se ha observado que la expresión de los oncogenes *ras* aumenta la actividad transcripcional de promotores que contienen elementos de respuesta a AP-1, probablemente mediante la fosforilación del dominio activo de c-jun (Binétruy et al., 1991; Medina-Martínez et al., 1997).

La transformación celular inducida por Ras da lugar tanto a síntesis de DNA como a alteraciones en la morfología celular. Se cree que la estimulación de la síntesis de DNA está mediada por la vía de Raf, mientras que las alteraciones en la morfología celular probablemente están mediadas por otros miembros de la superfamilia de proteínas Ras, como son las proteínas Rho y Rac (Khosravi-Far et al., 1995; Qiu et al., 1995). La activación de uno de los tres genes *ras* (H, K o N-*ras*) es la mutación dominante que más comúnmente ocurre en cáncer humano.

En los tumores humanos, virtualmente todas las mutaciones que se encuentran en las proteínas Ras impiden la actividad de GTPasa. Asimismo, se ha observado que las proteínas *ras* transformantes son resistentes a la función de GAP (Trahey & McCormick 1987). Las mutaciones puntuales que activan a los genes *ras* se agrupan en las regiones que codifican los aminoácidos 12, 13, 59, 61 (Bos et al., 1989). Los aminoácidos en estas posiciones se encuentran localizados en la región de interacción con los nucleótidos de guanina. Casi cualquier aminoácido, excepto prolina, que sustituya tanto a la glicina 12 como a la 13, transforma en oncogénica a la proteína. Varias sustituciones de la glutamina 61 activan a la proteína, donde las más prevalentes son los cambios a arginina, histidina o leucina.

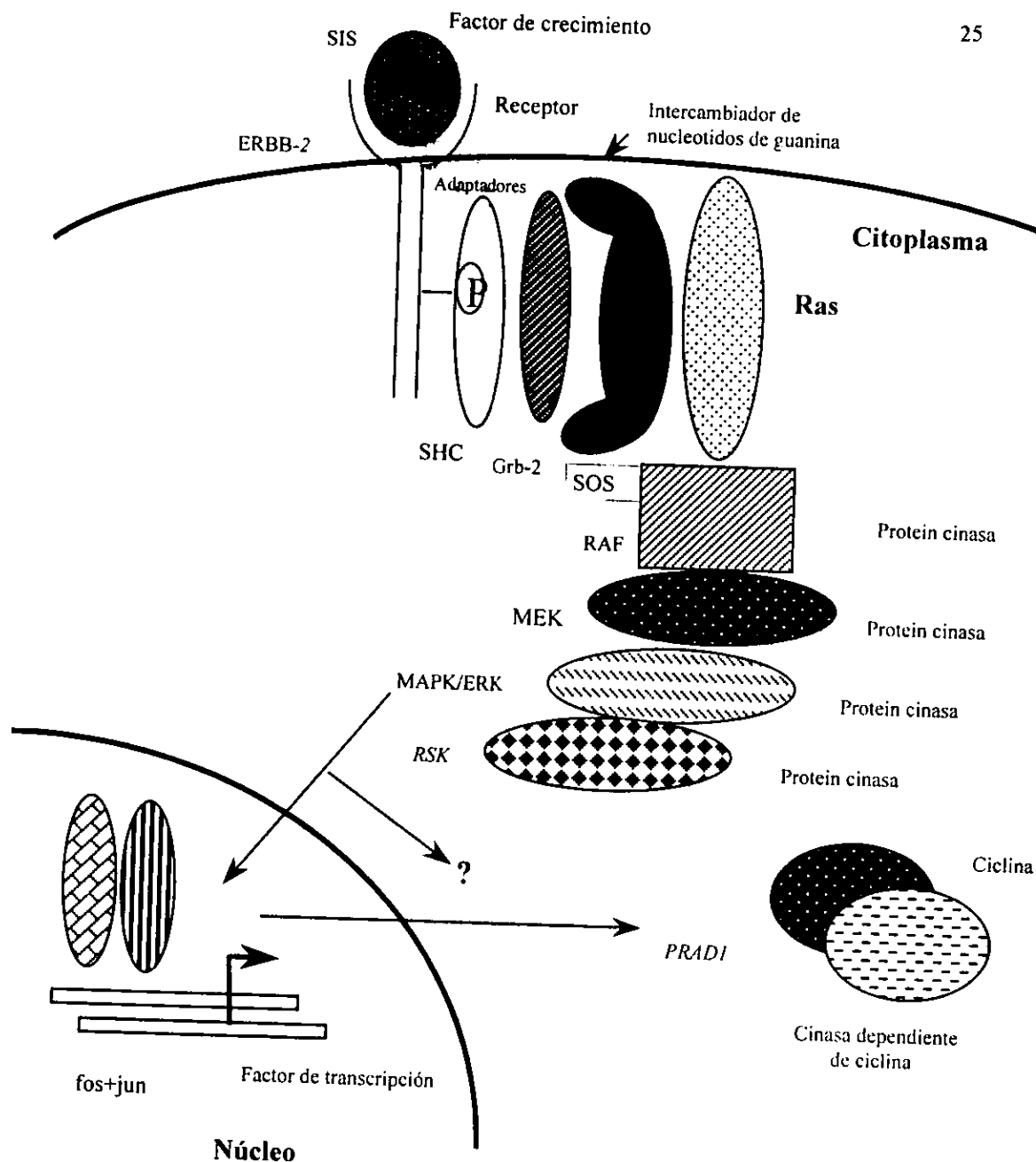


Figura 2. Diagrama de la cascada de señales de ras a través de la vía de raf. Ras puede activarse cuando un factor de crecimiento (ej. SIS) se une a su receptor que tiene actividad de tirosina-cinasa (ej. ERBB-2). Ras recibe la señal a través de proteínas adaptadoras (SHC, Grb-2) y de un factor que estimula la disociación de GDP (SOS). Una vez activo, Ras se une a diversos efectores. La vía más conocida es la mediada por Raf. Los componentes de la vía se indican a la derecha y los ejemplos de proteínas específicas, a la izquierda.

Cooperación de HPV con los oncogenes *ras* en la transformación

Se sabe que los genes E6 y E7 de los HPV de alto riesgo son capaces de inmortalizar cultivos de células primarias, pero que requieren de genes *ras* mutados para lograr una transformación maligna completa (Matlashewski et al., 1987; Crook et al., 1988). Si bien actualmente no es aún claro el mecanismo de cooperación entre estos oncogenes celulares y virales, existen algunos datos muy sugestivos al respecto. Por una parte, se sabe que la transcripción de los oncogenes E6 y E7 de HPV está controlada por el promotor viral a través de una gran variedad de proteínas virales y celulares que regulan su función. La región promotora de HPV-18 (P105) contiene sitios de unión para factores de transcripción, que incluyen AP-1 (García-Carrancá et al., 1988). Los estudios realizados con este promotor han permitido proponer que H-*ras* participa en el control de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, al incrementar la actividad de proteínas que se unen a los sitios AP-1 (Medina-Martínez et al., 1997).

Por otra parte, además de poder unirse a pRB, se ha demostrado que E7 es capaz de asociarse con miembros de la familia AP-1 y que la capacidad de E7 de unirse a proteínas Jun se correlaciona con un aumento en la transcripción de promotores con elementos de respuesta AP-1 (Antinore et al., 1996). Estos datos sugieren que la cooperación entre HPV y *ras* para inducir la transformación celular podría deberse, al menos en parte, a un mecanismo de retroalimentación que afecte la expresión génica a través de los sitios AP-1. Esto daría lugar a un aumento en la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, en células que tienen algún miembro de la familia *ras* mutado. Por su parte, un aumento de los niveles de E7 promovería la transcripción de los oncogenes de HPV al unirse a c-jun y aumentar la actividad de los complejos AP-1 y por lo tanto, la transcripción de los genes transactivados por estos complejos. De ahí la importancia de conocer con certeza la frecuencia de mutaciones en los miembros de la familia de genes *ras*, en tumores del cérvix.

Los genes *ras* en el desarrollo del cáncer cérvico uterino

Los oncogenes *ras* han sido implicados en el desarrollo de una gran cantidad de tumores humanos; su incidencia varía entre el 5-40% en los diferentes tumores (Bos, 1989). En particular, se ha observado que las mutaciones en *K-ras* son frecuentes en los adenocarcinomas (Enomoto et al., 1991), donde la presencia de mutaciones en este gen tiene un significado pronóstico. Varios estudios señalan la importancia de las mutaciones en el gen *K-ras* en tumores ginecológicos. Enomoto et al. (1991) muestran que las mutaciones en *K-ras* son frecuentes en adenocarcinomas mucinosos y no en tumores epiteliales de ovario; así también Ichikawa et al. (1994) encuentran asociaciones importantes de *K-ras* mutado con determinados subtipos histológicos de carcinoma de ovario. Otros estudios señalan que las mutaciones en *K-ras* presentan implicaciones clínicas en el carcinoma de endometrio (Enomoto et al., 1990; Mizuuchi et al., 1992; Sasaki et al., 1993); sin embargo, su significado pronóstico no es claro. Mizuuchi et al. (1992) apoyan la hipótesis de que las mutaciones en *K-ras* juegan un papel importante en determinar la agresividad del adenocarcinoma endometrial, mientras que Sasaki et al. (1993) sugieren que estas mutaciones pueden caracterizar a un grupo de tumores con mejor pronóstico.

A pesar de que también se han buscado mutaciones en los genes *ras* en cáncer cérvico uterino, su papel todavía es controversial (Willis et al., 1993; Koulos et al., 1993; Wong et al., 1995; Lee et al., 1996). Estudios recientes reportan una alta incidencia de mutaciones en el codón 12 de *K-ras* en adenocarcinomas mucinosos del cérvix (Tenti et al., 1995). En particular, Jiko et al. (1994) proponen que existen diferencias en la frecuencia de mutaciones en *K-ras* entre adenocarcinomas del cervix del tipo endocervical y los de tipo endometrial; y que de esta manera, los mecanismos patogénicos de este último se asemejan a los del adenocarcinoma de endometrio.

Caracterización molecular de HPV y distribución de tipos virales

En contraste con otros virus humanos, los virus de papiloma no han sido tipificados por métodos serológicos tradicionales, dado que no se cuenta con antisueros

que distingan entre los diferentes tipos de HPV. Durante las décadas de los 70s y 80s, los HPVs eran tipificados mediante hibridación de su DNA bajo distintas condiciones de astringencia. Las cepas aisladas de HPV históricamente fueron clasificadas en tipos, mediante la comparación de su DNA con un grupo de genomas de referencia de HPV (de Villiers et al., 1989). Actualmente se acepta por definición que el DNA de cada tipo difiere en por lo menos un 10% de la secuencia nucleotídica de los genes E6, E7 y L1, de aquélla de cualquier otro tipo viral conocido. Recientemente se ha observado que los distintos tipos de HPV presentan variaciones genéticas. Cuando las diferencias van de 10 a 2%, se dice que se trata de un subtipo, y cuando las diferencias son menores al 2%, se considera una variante.

Hoy en día, la búsqueda y tipificación de los HPV no tiene solo un mero interés académico, sino que resulta de gran importancia buscar diferencias que permitan distinguir a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar cáncer de cérvix, dada la fuerte asociación de algunos tipos específicos de HPV con los tumores malignos. Basados en secuencias de nucleótidos o de aminoácidos, se han construido los árboles filogenéticos o evolutivos de los HPV (ver figura 3) (van Ranst et al., 1992). Con esta información ha sido posible observar que los diferentes tipos de HPV se asocian con entidades clínicas bien definidas. Hasta ahora se han descrito más de 77 tipos de HPV (DeVilliers, 1994), muchos de los cuales ya han secuenciado. Los árboles filogenéticos de HPV han ido creciendo y ramificándose, a medida que se encuentran nuevos tipos virales (Myers et al., 1996). Ahora sabemos que muchos de los virus infectan de manera específica a un cierto subtipo de células epiteliales. Los análisis de secuencias genómicas muestran que los tipos virales que infectan el mismo epitelio o alguno similar (ej. HPV-16 comparado con HPV-18), están mas cercanamente relacionados que aquellos que infectan epitelios diferentes (ej. HPV-16 comparado con HPV-1) (Cole et al., 1987). De esta manera se observa que la evolución viral está ligada no solamente a la especie que infectan, sino a su tejido blanco específico.

Se conocen más de 36 tipos diferentes de HPV que infectan el tracto genital (Bernard, et al., 1994) y de ellos más de 20 se asocian con cáncer. En el estudio mundial realizado recientemente, se detectó la presencia de algún tipo de HPV en más del 93%

Variantes de HPV

Las variantes “intra-tipo” se definen como aquellos aislados de HPV que varían en menos del 2% con respecto al tipo viral de referencia en regiones conservadas del genoma, como E6, E7, L1 y L2 (Bernard et al., 1994). Las regiones no-codificantes muestran una variabilidad ligeramente mayor, con una desviación del 5% de la secuencia de referencia que se considera hipervariable (Ho et al., 1993; Ong et al., 1993). Las secuencias de DNA que codifican por dominios conservados en proteínas, permiten comparar a los tipos de HPV (van Ranst et al., 1992) y analizar el proceso de especiación, dado que en la taxonomía de los HPV el término “tipo” se considera equivalente al término “especie”. Por otra parte, las secuencias de fragmentos genómicos involucrados en la regulación de la transcripción (Chong et al., 1990) son altamente variables entre los diferentes tipos de HPV. Sin embargo, estas secuencias contienen un grado de diversidad entre clonas aisladas de un mismo tipo de HPV, suficiente para entender su evolución molecular (Ho et al., 1991). Los estudios de variantes permiten entender parte de la historia evolutiva de los virus de papiloma y resultan ser un modo eficiente de conocer el origen y forma de diseminación de estos virus. La gran especificidad y diversidad de tipos sugiere que estos virus están muy bien adaptados y que han estado en íntima asociación con su huésped por mucho tiempo. El pequeño grado de variación en regiones geográficas, comparado con la gran diversidad entre regiones, es consistente con la idea de una lenta acumulación de mutaciones en períodos de tiempo muy largos.

Hoy en día, a través del análisis de una gran cantidad de aislados de HPV obtenidos de diversas partes del mundo, se han definido cuales son las variantes de los tipos virales más frecuentes; en particular, de HPV-16 (Ho et al., 1993; Ho et al., 1991), HPV-18 (Ong et al., 1993), HPV-6 y HPV-11 (Heinzel et al., 1995), además de otros tipos menos frecuentes (Stewart et al., 1996). Los aislados virales que pertenecen a un mismo tipo de HPV se encuentran cercanamente relacionados entre ellos, en base a su secuencia nucleotídica y representan un grupo filogenético discreto. Con el estudio de variantes se ha llegado a establecer una relación entre los virus de papiloma y la geografía e historia de su origen. La hipótesis actual es que las variantes de HPV no se originan en

un período corto de forma individual en un paciente, sino que surgen con el hombre y evolucionan mientras se diseminan junto con los grandes movimientos de las poblaciones humanas al través de la historia (Chan et al., 1992; Ho et al., 1993). Existen ciertas evidencias que sugieren que al menos HPV-16 y HPV-18 tienen sus raíces en Africa (Ong et al., 1993). Además, los estudios muestran que diferentes razas humanas en lugares remotos, todavía cuentan con poblaciones de virus que parecen reflejar su separación geográfica, sexual y racial.

Aunque las cepas aisladas de HPV-16 se encuentran estrechamente relacionadas se han identificado cinco ramas filogenéticas principales de 301 aislados de HPV-16 que fueron colectados en Europa, Asia, Africa, Norte y Sudamérica (Ho et al., 1993). Las ramas se denominaron E (Europea), As (Asiática), AA (Asiática-Americana), Af1 (Africana-1) y Af2 (Africana-2). Recientemente se detectó una sexta rama de HPV-16 que es la NA1 (norteamericana) (Yamada et al., 1995). Cabe mencionar que el genoma del HPV-16 de referencia es un aislado alemán y es miembro de la rama Europea (Ho et al., 1993; Ho et al., 1991). Con estos estudios se piensa que ya se han identificado los principales linajes de la diversidad intra-tipo de HPV-16. Los árboles filogenéticos inferidos por Ho y sus colaboradores, (Ho et al., 1993) se basaron en el análisis de la secuencia nucleotídica de un segmento de la región LCR. Se eligió este segmento porque es hipervariable (las secuencias genómicas generalmente divergen más en secuencias no-codificantes, que en las secuencias codificantes), además de que se observa que el LCR varía de manera importante entre diferentes tipos de virus de papiloma sin perder su funcionalidad (Chong et al., 1990).

Las variaciones genómicas entre aislados de HPV-16 también se han identificado mediante el análisis de los genes L1, L2, E6 y E7 (Pushko et al., 1994; Yamada et al., 1995; Icenogle et al., 1991; Fujinga et al., 1994). La diversidad intra-tipo de HPV-18 guarda muchas similitudes con HPV-16. Actualmente se han detectado 3 ramas filogenéticas principales para HPV-18 (Europea, Africana y Asiática/Amerindia) (Ong et al., 1993). Con estos estudios se ha observado que la diversidad viral no se correlaciona con la ubicación geográfica, sino más bien con la composición étnica de las poblaciones y

que la filogenia de las ramas principales de HPV-16 y HPV-18 se asocia con las ramas principales de la evolución de los grupos étnicos humanos (Cavalli-Sforza, 1992).

Algunos autores sugieren que a lo largo del tiempo, la evolución del HPV ha dado lugar al desarrollo de variantes tipo-específicas y filogenéticamente relacionadas con comportamientos biológicos diferentes (Hecht et al., 1995).

¿Diferencias en comportamiento biológico de variantes de HPV ?

Los estudios de heterogeneidad genómica de HPV-16 y HPV-18 muestran la presencia de múltiples variantes en todas las poblaciones estudiadas; por ello merece gran consideración la posibilidad de que existan diferencias en las características biológicas de variantes de HPV. Existen evidencias experimentales donde ciertas alteraciones nucleotídicas de HPV-16, afectan su potencial de transformación *in vitro* (Mittal et al., 1993), y algunas alteraciones aumentan la actividad del promotor que da lugar a la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7 (May et al., 1994). Sin embargo, no se conoce cual de esas alteraciones nucleotídicas reportadas logran modificar la función biológica de HPV, de tal manera que afecte su oncogenicidad *in vivo*. Hoy en día no es tan claro que las variaciones genómicas encontradas entre diferentes aislados de HPV-16 y HPV-18 tengan alguna correlación con características clinicopatológicas del cáncer de cérvix, aunque algunos reportes mencionan la posibilidad de que ciertas variantes de HPV presenten diferencias en comportamiento biológico, con respecto a las clonas de referencia. En particular, los datos obtenidos por Xi y colaboradores (1997) sugieren que el riesgo a desarrollar neoplasias intraepiteliales de grado 2-3 (las lesiones precancerosas más importantes), no es el mismo para todas las variantes de HPV-16, y que las variantes menos parecidas al prototipo confieren un mayor riesgo, comparado a las variantes mas cercanas al prototipo. Por otro lado, Hecht y colaboradores (1995) sugieren que la variabilidad genética del HPV-18 puede ser responsable del amplio espectro de patologías asociadas a este tipo viral. Los autores identifican una variante de HPV-18 en el 40% de muestras con neoplasia intraepitelial, mientras que no la observan en casos de cáncer. Esto sugiere que dicha variante podría tener un menor potencial oncogénico.

Con este panorama queda claro que son varios los factores que pueden intervenir en el desarrollo del cáncer cérvico uterino. Existen diversas preguntas en el estudio de este tumor para las cuales las respuestas aún no son claras. Los eventos que hacen que una lesión persista, revierta o progrese, no se explican solamente por la presencia de HPV de alto riesgo. Del mismo modo, las diferencias en comportamiento biológico de las distintas presentaciones histológicas del cáncer de cérvix, continúan sin una explicación clara.

Objetivo General

En este trabajo buscamos algunos factores que pudieran intervenir en el proceso de transformación del cérvix uterino. Para ello, determinamos el papel tanto de alteraciones en los genes *ras*, como de variantes genómicas de HPV en el desarrollo y el pronóstico de las distintas presentaciones histológicas del cáncer cérvico uterino, que ocurren con mayor frecuencia en la población mexicana.

Objetivos Específicos

- Definir con qué frecuencia ocurren mutaciones activadoras en los codones relevantes (12, 13 y 61) de los genes H, K, y N-*ras* en carcinomas del cérvix de una población mexicana.
- Conocer la frecuencia de tipos y variantes de HPV en la misma población de tumores.
- Analizar la posible asociación de los hallazgos de mutaciones en los genes *ras* y HPV con factores clínicopatológicos de los tumores.
- Definir si el oncogen K-*ras*, es capaz de modular la expresión de los genes virales E6 y E7.

Material y Métodos

Muestras y diseño general

Un total de 77 biopsias de cáncer de cérvix fueron seleccionadas para este estudio. De material eficiente para amplificación por PCR se obtuvieron 53 biopsias congeladas de un muestreo al azar, de un grupo consecutivo de pacientes que asistió al Instituto Nacional de Cancerología (México D.F) durante 1992 y 1993. Estas muestras consistieron en 13 adenocarcinomas, 13 carcinomas adenoescamosos y 27 carcinomas de células escamosas del cérvix. También se seleccionó otro grupo de 24 biopsias embebidas en parafina, obtenidas de los archivos de patología del mismo Instituto; estas muestras fueron colectadas entre 1985 y 1994, obtenidas de lesiones que se diagnosticaron como carcinomas de células pequeñas. Todas las muestra fueron obtenidas previamente a cualquier tratamiento. El diagnóstico se basó en el expediente de patología que acompañaba a cada espécimen, incluyendo la clasificación histológica de acuerdo al criterio propuesto (Kurman et al, 1992). El rango de las etapas clínicas de los tumores fluctuó entre IIB y IVB.

El patrón histológico del carcinoma de células pequeñas se definió de acuerdo tanto a las características citológicas de las células tumorales, como a su patrón de agrupación. Las células fueron pequeñas, con escaso citoplasma, con núcleo de redondo a oval y sin un nucleolo sobresaliente.

La detección de mutaciones en los genes *ras* se realizó mediante una modificación del ensayo de SSCP-PCR previamente descrito (Gaidano et al., 1991). Las mutaciones de *ras* detectadas con este método fueron confirmadas mediante la secuencia directa de productos de *ras* amplificados por PCR. Se analizó el efecto de genes *ras* mutados en la transactivación de los genes de HPV, en células en cultivo y en muestras tumorales. La expresión de la proteína E6 fue analizada por Western blot comparativamente entre las muestras de CaCu con los alelos normales y mutado de K-*ras*. El efecto de

transactivación de *K-ras* sobre el promotor de HPV-18 fue analizado en líneas celulares de cérvix, con un plásmido que lleva la versión mutada de *K-ras*.

El análisis de presencia y tipo de HPV en los especímenes clínicos también se realizó con la técnica de SSCP-PCR mediante el análisis de un fragmento pequeño del gen L1 de HPV. Las muestras positivas a HPV fueron secuenciadas en fragmentos de los genes L1 y LCR. Las secuencias de HPV variantes encontradas se compararon con las reportadas en la literatura.

Los datos clínicos, que incluyeron etapa clínica del tumor, tipo histológico y edad, se utilizaron para analizar su posible correlación con la presencia de mutaciones en los genes *ras* y/o de variantes específicas de HPV.

Extracción de DNA

La extracción de DNA de biopsias congeladas se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Miller et al (1988). La obtención de DNA de tejidos embebidos en parafina se realizó de acuerdo al método descrito por Resnick et al. (1990).

Detección de mutaciones en los genes *ras*

Este análisis se realizó mediante la técnica de SSCP-PCR (Single Strand Conformational Polymorphism) esencialmente como lo describen Gaidano et al. (1991). Esta metodología permite detectar, en productos amplificados por PCR, mutaciones puntuales mediante cambios conformacionales en las cadenas sencillas de DNA, que dan por resultado diferencias en su movilidad electroforética. Brevemente consiste en: fragmentos de DNA marcados con P^{32} se amplifican por PCR, en mezclas de 10 μ l totales; 1 μ l de los productos de PCR se diluye en 50 μ l de buffer de corrida con formamida al 95% y se desnaturalizan mediante ebullición por 15 min; las muestras se corren en geles no-desnaturalizantes de acrilamida (6-8%), en ausencia o en presencia de 5 o 10% de glicerol, según la mejor resolución; la electroforesis se lleva a cabo a 10 watts durante aproximadamente 4 horas a 4 °C; finalmente, los geles se secan y se exponen con placas de rayos X. Para la amplificación de los exones 1 y 2 de los tres

genes *ras* (H, K y N-*ras*), se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Suzuki et al. (1990), que se describen a continuación:

<i>Fragmento amplificado</i>			<i>Oligonucleótidos</i>	
<i>Gen</i>	<i>Codones incluidos</i>	<i>Longitud (pb)</i>	<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>
K-ras	1-36	162	K1a	GGCCTGCTGAAAATGACTGA
			K1b	GTCCTGCACCAGTAATATGC
K-ras	38-80	128	K2a	TTCCTACAGGAAGCAAGTAG
			K2b	CACAAAGAAAGCCCTCCCCA
H-ras	1-31	110	H1a	CAGGCCCCTGAGGAGCGATG
			H1b	TTCGTCCACAAAATGGTTCT
H-ras	38-97	194	H2a	TCCTGCAGGATTCCTACCGG
			H2b	GGTTCACCTGTACTGGTGGA
N-ras	2-37	118	N1a	GACTGAGTACAACTGGTGG
			N1b	GGGCCTCACCTCTATGGTG
N-ras	48-82	103	N2a	GGTGAAACCTGTTTGTGGA
			N2b	ATACACAGAGGAAGCCTTCG

Detección y tipificación de secuencias genómicas de HPV

Todas las muestras aptas para ser amplificadas por PCR (positivas a β -globina) fueron analizadas para la presencia de DNA de HPV con los oligonucleótidos consenso GP5/GP6 (van der Brule et al., 1990), que amplifican un fragmento de DNA de 140 pares de bases de la región L1 de HPV. Con este fragmento de PCR se analizó el tipo viral mediante la técnica de SSCP-PCR. En el análisis se incluyeron preparaciones de DNA de plásmidos o líneas celulares con secuencias virales conocidas. De esta manera se generaron productos de PCR que sirvieron como controles de los patrones electroforéticos.

Secuenciación de DNA

Para confirmar las mutaciones de los genes *ras* observadas por SSCP-PCR se amplificaron y secuenciaron productos de PCR obtenidos con los mismos oligonucleótidos utilizados para el SSCP-PCR (Suzuki et al., 1990). La secuenciación directa de los productos purificados de PCR se realizó utilizando el kit de AmpliTaqDNA Cycle Sequencing System (Perkin Elmer).

Para la amplificación y secuenciación de un fragmento de 450 pb de la región L1 de HPV, se utilizaron los oligonucleótidos consenso MY09/MY11 (Manos et al., 1989). Para la amplificación y secuenciación de fragmentos de 364 pares de bases del LCR se utilizaron oligonucleótidos que flanquean las posiciones 7485 a 7804 de HPV-18 (Ong et al., 1993) y los que flanquean las posiciones 7478 y 7841 de HPV-16 (Ho et al., 1991). Para el LCR de HPV-45 se utilizaron los oligonucleótidos empleados para HPV-18 a una menor astringencia. Las variantes de HPV que se detectaron en por lo menos dos muestras, se consideraron como variantes “naturales”, mientras que aquéllas que se encontraron sólo una vez se consideraron posibles artefactos de la reacción de PCR, por lo que esta última se volvió a repetir.

Análisis estadístico

El significado estadístico de la asociación entre la detección de variantes de HPV y las diferentes presentaciones histológicas del carcinoma del cuello uterino, fue analizado mediante la prueba exacta de Fisher.

Transfecciones y ensayos de CAT

Se transfectaron células C-33A, que se derivan de cáncer cérvico uterino y no contienen secuencias de HPV. La transfección se llevó a cabo mediante el método estándar de co-precipitación con fosfato de calcio (Wigler et al., 1977). Se utilizaron 2 µg del plásmido reportero: con el LCR de HPV-18 unido a CAT (P105) (Thierry et al., 1992) y 5 µg del plásmido que contiene al gen *K-ras* en su versión mutada en el codón 12 (Santos et al., 1984). Las células fueron cosechadas y lisadas 48 horas después de la

transfección. La actividad de cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) se determinó con el método de extracción de butiril-coenzima A, de la fase orgánica (Seed et al., 1988), utilizando cantidades equivalentes de proteína mediante la determinación de Bradford (1976).

Análisis por Western blot

Se analizó la expresión de la proteína E6 en los tejidos de algunas de las muestras de adenocarcinoma con y sin mutaciones en *K-ras*. Los tejidos fueron homogenizados en buffer de Laemmli (0.01 ml x mg peso) mediante el uso de un politrón. La cuantificación de proteína se realizó por el micro-método modificado de Bradford (Pande et al., 1994). 100 ug de proteína fueron sometidos a electroforesis en minigel (1.5 mm de grosor) desnaturalizante de acrilamida al 10% y transferidos a membrana PVDF (Millipore), en cámara húmeda de electrotransferencia en buffer de glicina. La membrana se lavó con PBS, se bloqueó con leche descremada al 2.5% en PBS y se incubó O/N con anticuerpo anti-E6 (1 µg/ml Abl Oncogene). Después de lavar con PBS seguido de TBS, se añadió un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa y revelado con quimioluminiscencia (kit ECL, Amersham). Posteriormente, la membrana se lavó con TBS y B-mercaptoetanol para despegar los anticuerpos, para luego incubarla durante 2 horas con un anticuerpo anti-tubulina (clona KMK-1 de Boeringer), como control interno de cantidad de proteína. Se siguió el mismo procedimiento con el segundo anticuerpo. Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos (14.3 a 200 kDa de Gibco). Como control positivo del Western se utilizaron células HeLa, que contienen la secuencia completa de HPV-18 integrada en su genoma. Para medir los niveles de proteína E6 observada en el Western se utilizó un analizador de imágenes con el programa PC Image. Se integró área con densidad, normalizando la señal de E6 con respecto a la de tubulina.

Resultados

Este trabajo consta de dos partes. La primera la constituyen los resultados obtenidos del análisis de mutaciones en los tres genes *ras* (H, K y N-*ras*) en tumores de cérvix de diferentes grupos histológicos. También se analiza el efecto de K-*ras* tanto en la expresión de las oncoproteínas virales en tumores, como en la transactivación de la LCR en ensayos con líneas celulares.

La segunda parte la conforma principalmente el artículo titulado: Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer, que fue publicado en la revista Journal of the National Cancer Institute vol 89 pp 1227-1231, 1997. En dicho artículo, la presencia y el tipo de variantes de HPV fue analizado en una muestra de tumores de pacientes mexicanas. Se encontraron asociaciones importantes de ciertas variantes de HPV con la edad de las pacientes y los tipos histológicos de los tumores.

Resultados

Análisis de mutaciones en los genes *ras*

La búsqueda de mutaciones en los genes *ras* se realizó en carcinomas de cérvix con diferente origen histológico. Los grupos de tumores incluidos en este análisis estaban formados por 13 adenocarcinomas, 13 carcinomas adenoescamosos y 27 carcinomas de células escamosas. Mediante la técnica de SSCP-PCR, se buscaron mutaciones puntuales en los tres genes de la familia *ras*. Con el fin de detectar las mutaciones activadoras más comunes en estos genes, se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos para amplificar por PCR fragmentos de los exones 1 y 2 de cada uno de estos genes (H, K, y N-*ras*).

En los 53 tumores analizados por ésta técnica, no se observaron migraciones electroforéticas alteradas que pudieran indicar la presencia de mutaciones puntuales de los genes H-*ras* ni N-*ras* (ej. figura 4). Sin embargo, se observaron movilidades electroforéticas, sugestivas de mutaciones, para el gen K-*ras* (figura 5). Se encontraron los cambios en el fragmento de DNA que incluye al codón 61, en 10 de los 53 tumores analizados (18%). La mayoría de las muestras que aparecían mutadas en el SSCP, también mostraron una banda correspondiente al alelo tipo silvestre. Esto podría indicar la presencia en las células cancerosas, tanto del alelo normal de K-*ras*, como del mutado; y/o la posible contaminación del tejido tumoral con células no-neoplásicas.

Para confirmar la presencia y el tipo de mutación de K-*ras*, los tumores fueron sometidos a secuenciación directa de los productos de PCR. Ejemplos de las secuencias se muestran en la figura 6. Debido a que probablemente las biopsias utilizadas en este estudio contenían una mezcla de células cancerosas y normales, en algunos casos las mutaciones no pudieron ser demostradas por secuenciación directa. En la secuencia de DNA de 4 tumores se encontró que aunque el codón 61 permanecía en su tipo silvestre, una banda extra aparecía en la tercera posición de dicho codón. Con esta mutación se identificó un reemplazo de glutamina (CAA) por histidina (CAT). En otros dos casos se encontró la presencia de una banda extra en la primera posición del codón 64, que

reemplaza una tirosina (TAC) por ácido aspártico (GAC). Dado que en la secuenciación directa también encontramos las formas silvestres de las bases en las mismas posiciones, existe la posibilidad de que contemos con muestras de dos poblaciones diferentes, correspondientes a células normales y cancerosas.

Correlación con datos clínicopatológicos

Al analizar la presencia de mutaciones de *K-ras*, de acuerdo al tipo histológico de los tumores de cérvix, se encontró una alta frecuencia de éstas en los tumores con componente glandular. En el grupo de adenocarcinomas, 5 de 13 tumores presentaron mutaciones en *K-ras*; en los carcinomas adenoescamosos 4 de 13 tumores presentaron dichas mutaciones. En contraste, los carcinomas de células escamosas presentaron una frecuencia muy baja de mutaciones en *K-ras* (1/27) (ver Tabla IV). Ni la edad de las pacientes cuyos tumores presentaron mutaciones en *K-ras*, ni la etapa clínica de los tumores, difirió significativamente de las mujeres cuyos tumores tenían al gen *ras* normal. Todos los tumores con mutaciones en *K-ras* fueron positivos a secuencias de DNA de HPV.

Transactivación de los genes virales por *K-ras* activado

Dado que con una frecuencia importante encontramos mutaciones en *K-ras* en tumores de cérvix con componente glandular, intentamos precisar el efecto específico de *K-ras* sobre los oncogenes virales. Primero, en un ensayo en células en cultivo se analizó la capacidad de transactivación de *K-ras* activado sobre el promotor de HPV; luego, se abordó este análisis directamente en tejido tumoral positivo a secuencias de HPV, donde tratamos de distinguir si la presencia de *K-ras* mutado repercute en un aumento importante en la expresión de las oncoproteínas de HPV.

En células C-33A, derivadas de un carcinoma de cérvix que no contiene secuencias de HPV, se examinó el efecto de *K-ras* activado en la actividad transcripcional del promotor temprano de HPV-18. El plásmido P105 que contiene la región LCR completa de HPV-18 (llamada P105) unida al gen reportero CAT, se transfectó en estas células junto con un vector que expresa al oncogen *K-ras* activado

(Ras^{Arg12}). Comprobamos que al igual que ocurre con H-*ras* activado (Medina-Martínez et al., 1997), K-Ras^{Arg12} es capaz de aumentar la transcripción por más de cinco veces, del gen reportero CAT a partir del promotor P105 (figura 7).

El nivel de proteína E6 se analizó en muestras de adenocarcinomas de cérvix con *ras* mutado y con *ras* normal, todas positivas a HPV. Las proteínas homogenizadas de cada tejido tumoral, fueron separadas por electroforesis y transferidos a una membrana que se incubó con anti-E6 (E6 ~ 16-18 kDa, según el tipo viral); y luego con anti-tubulina, (Tub ~ 50 kDa) (ver figura 8). Mediante el Western blot logramos detectar a la proteína E6 en los tumores. Para tratar de cuantificar las diferencias en expresión de E6 de muestras con K-*ras* mutado, comparando con muestras con K-*ras* normal, se normalizó las unidades de densidad obtenidas de la banda de E6 con respecto a la de tubulina de cada muestra (ver figura 9). Este análisis resulta muy grueso y solo se pudo apreciar una tendencia de las muestras con K-*ras* mutado de presentar niveles mayores de E6, con respecto a las muestras con K-*ras* normal (fig. 9).

Detección y tipificación de HPV.

Se analizó la serie completa de 77 tumores del cérvix de distinto tipo histológico (carcinoma escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoescamoso y carcinoma de células pequeñas). El DNA de algún tipo de HPV fue detectado en 56 de los 77 tumores (74%), mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen L1. De acuerdo al tipo histológico, el 85% de los carcinomas escamoso, el 85% de los adenoescamosos, el 69% de los adenocarcinomas y el 54% de los carcinomas de células pequeñas, fueron positivos a algún tipo de HPV (ver Tabla 1A del Artículo).

Dada la sensibilidad que tiene la técnica de SSCP-PCR para la detección de mutaciones puntuales en un fragmento discreto de DNA, consideramos que podría ser utilizada acertadamente para la detección y tipificación de secuencias de HPV en los tumores. Los tipos virales presentes en las muestras positivas a HPV fueron definidos mediante esta técnica (figura 1A del artículo). Para este análisis se amplificó por PCR un fragmento de 140 pares de bases del gen L1 (con los oligonucleótidos GP5/GP6). Hemos

visto que el ensayo de SSCP-PCR es muy sensible a pequeños cambios en composición de bases y tamaño del producto. El gen L1 se encuentra relativamente conservado entre los diferentes aislados de HPV, sin embargo, presenta la variación suficiente que permite generar un patrón muy claro para cada uno de los diferentes tipos de HPV.

Los patrones electroforéticos obtenidos para las secuencias de HPV, se compararon con patrones control de HPV conocidos. Esto nos permitió tipificar a la mayoría de las muestras que fueron positivas a DNA de algún HPV.

Los patrones de la mayoría de las muestras fueron claramente identificados como los tipos de HPV-16, 18, o 31. Sin embargo, algunas muestras presentaron patrones de migración diferentes, lo que sugirió la presencia de otros tipos virales o de variantes de los tipos conocidos. Ninguno de los patrones generados en el SSCP-PCR fue compatible con los tipos 6, 11 o 33, lo que mostró la ausencia de estos tipos virales entre las muestras.

Secuenciación de fragmentos de L1 y LCR

Para confirmar los resultados de los ensayos de SSCP-PCR y determinar la naturaleza de los patrones electroforéticos de HPV no identificados, se secuenciaron los productos de PCR del fragmento del gen L1 (ver figura 1B del Artículo) y de la LCR. El análisis de las secuencias confirmó los resultados obtenidos en el ensayo de SSCP-PCR respecto a los tipos de HPV-16, 18 y 31. También mostró la presencia de los HPV-45 y HPV-58. Entre las muestras con un patrón de SSCP no identificado, se encontraron variantes de HPV 16 (11 casos), de HPV-18 (8 casos) y de HPV-45 (3 casos). No se consideró que estas variaciones fueran artefactos de la reacción de PCR, ni que se debieran a mutaciones adquiridas en el desarrollo del tumor, dado que aislados independientes mostraron los mismos cambios para cada una de las variantes. También se observó que mientras que el HPV-16 predominó en los carcinomas escamosos (13 de 23 muestras), el HPV-18 prevaleció en los adenocarcinomas (5/9) y particularmente en los carcinomas de células pequeñas (10/13).

La variante de HPV-16 identificada en este estudio difiere de la clona prototipo en 6 posiciones del fragmento de 450 pb del gen L1 (generado con los oligonucleótidos MY09/MY11) (ver figura 10). Dentro de estos cambios, solo dos resultaron en cambios en los codones respectivos: una prolina cambia a una treonina (posición 6695; aminoácido 379), y una serina reemplaza a una treonina (posición 6803; aminoácido 415). Esta variante pertenece a la rama Asiática-Americana (ver figura 11).

Con respecto a HPV-18, una variante (var-1) que se encontró en 4 tumores, se distinguió de la clona de referencia por dos cambios en la región L1 amplificada. Uno de estos cambios (posición 6625), dio por resultado el reemplazo de prolina por arginina en el codón 399 (figura 10). Esta variante se ubica en la rama Europea, de acuerdo a la secuencia de la LCR. Var-2 fue la otra variante que se encontró de HPV-18 (ubicada en la rama Africana). Se detectó también en 4 casos y presentó 6 cambios en la región L1 con respecto al tipo de referencia. Cinco de estos cambios resultan mutaciones silenciosas, mientras que el cambio en el codón 399 (posición 6625), compartido con var-1, da lugar al reemplazo de prolina por arginina. Estas variantes corresponden a los aislados IS002 y IS168 de HPV-18 respectivamente, de acuerdo a las secuencias de L1 publicadas para diferentes aislados (Myers et al., 1996). En el caso de HPV-45 se detectó una misma variante en los tres casos que presentaron HPV de este tipo. Esta variante mostró cinco cambios en el fragmento L1 analizado, dos de los cuales resultaron en cambios de aminoácidos: el reemplazo de serina por glicina (posición 6676; aminoácido 383), y el cambio de glutamina por histidina (posición 6705; aminoácido 392, figura 5). La variante de HPV-45 encontrada entre la población Mexicana, comparte los cambios en la región L1, con la clona IS819 (Myers et al., 1996).

- MS. Metastatic potential of murine fibrosarcoma cells is influenced by cell surface laminin. *Int J Cancer* 1984;33:651-5.
- (16) Barsky SH, Rao CN, Williams JE, Liotta LA. Laminin molecular domains which alter metastasis in a murine model. *J Clin Invest* 1984;74:843-8.
- (17) Castronovo V. Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion Metastasis* 1993;13:1-30.
- (18) Rao NC, Barsky SH, Terranova VP, Liotta LA. Isolation of tumor cell laminin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;111:804-8.
- (19) Kleinman HK, Ogle RC, Cannon FB, Little CD, Sweeney TM, Luckenbill-Edds L. Laminin receptors for neurite formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1282-6.
- (20) Castronovo V, Taraboletti G, Liotta LA, Sobel ME. Modulation of laminin receptor expression by estrogen and progestins in human breast cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:781-8.
- (21) Wewer UM, Taraboletti G, Sobel ME, Albrechtsen R, Liotta LA. Role of laminin receptor in tumor cell migration. *Cancer Res* 1987;47:5691-8.
- (22) Martignone S, Menard S, Bufalino R, Cascinelli N, Pellegrini R, Tagliabue E, et al. Prognostic significance of the 67-kilodalton laminin receptor expression in human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:398-402.
- (23) Daidone MG, Silvestrini R, D'Errico A, Di Fronzo G, Benini E, Mancini AM, et al. Laminin receptors, collagenase IV and prognosis in node-negative breast cancers. *Int J Cancer* 1991;48:529-32.
- (24) Pellegrini R, Martignone S, Tagliabue E, Belotti D, Bufalino R, Cascinelli N, et al. Prognostic significance of laminin production in relation with its receptor expression in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35:195-9.
- (25) Mafune K, Ravikumar TS, Wong JM, Yow H, Chen LB, Steele GD Jr. Expression of a Mr 32,000 laminin-binding protein messenger RNA in human colon carcinoma correlates with disease progression. *Cancer Res* 1990;50:3888-91.
- (26) Cioce V, Castronovo V, Shmookler BM, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, et al. Increased expression of the laminin receptor in human colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:29-36.
- (27) Campo E, Monteagudo C, Castronovo V, Claysmith AP, Fernandez PL, Sobel ME. Detection of laminin receptor mRNA in human cancer cell lines and colorectal tissues by *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 1992;141:1073-83.
- (28) D'Errico A, Garbisa S, Liotta LA, Castronovo V, Stetler-Stevenson WG, Grigioni WF. Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Mod Pathol* 1991;4:239-46.
- (29) van den Brule FA, Castronovo V, Menard S, Giavazzi R, Marzola M, Belotti D, et al. Expression of the 67 kD laminin receptor in human ovarian carcinomas as defined by a monoclonal antibody. *MLuCS. Eur J Cancer* 1996;32A:1598-602.
- (30) Demeter LM, Stoler MH, Sobel ME, Broker TR, Chow LT. Expression of high-affinity laminin receptor mRNA correlates with cell proliferation rather than invasion in human papillomavirus-associated cervical neoplasms. *Cancer Res* 1992;52:1561-7.
- (31) Pellegrini R, Martignone S, Menard S, Colnaghi MI. Laminin receptor expression and function in small-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 1994;Suppl 8:116-20.
- (32) Satoh K, Narumi K, Isemura M, Sakai T, Abe T, Matsushima K, et al. Increased expression of the 67kDa-laminin receptor gene in human small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:746-52.
- (33) Basolo F, Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Menard S, Castronovo V, et al. Expression of the 67 KD laminin receptor is an adverse prognostic indicator in human thyroid cancer: immunohistochemical study. *Clin Cancer Res* 1996;2:1777-80.
- (34) Grigioni WF, Garbisa S, D'Errico A, Baccarini P, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, et al. Evaluation of hepatocellular carcinoma aggressiveness by a panel of extracellular matrix antigens. *Am J Pathol* 1991;138:647-54.
- (35) Schroder FH, Hermanek P, Denis L, Fair WR, Gospodarowicz MK, Pavone-Macaluso M. The TNM classification of prostate cancer. *Prostate Suppl* 1992;4:129-38.
- (36) Mariani-Constantini R, Barbanti P, Colnaghi MI, Menard S, Clemente C, Rilke F. Reactivity of a monoclonal antibody with tissues and tumors from the human breast. Immunohistochemical localization of a new antigen and clinicopathologic correlations. *Am J Pathol* 1984;115:47-56.
- (37) Menard S, Tagliabue E, Canevari S, Fossati G, Colnaghi MI. Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res* 1983;43:1295-300.
- (38) Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
- (39) Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 1972;34:187.
- (40) Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974;111:58-64.

Notes

Supported in part by a grant from the National Fund for Scientific Research (Belgium).

We thank Laragh Gollogly for her technical assistance, Walther Dewe for his statistical work, and Mark E. Sobel for his evaluation of the manuscript.

Manuscript received February 19, 1997; revised June 3, 1997; accepted June 16, 1997.

Association Between Human Papillomavirus Type 18 Variants and Histopathology of Cervical Cancer

Marcela Lizano, Jaime Berumen, Miriam C. Guido, Leonora Casas, Alejandro García-Carrancá*

Adenocarcinoma, adenosquamous carcinoma, and small-cell carcinoma of the uterine cervix are reported to be low in incidence but clinically important. They usually exhibit a more aggressive biologic behavior and have a poorer prognosis than squamous cell carcinomas at similar stages (1-3). Although human papillomavirus type 16 (HPV16) is associated predominantly with squamous cell carcinomas and HPV18 is associated predominantly with adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas (4), differences in prognosis among these groups of cancers are largely still not understood. On the other hand, few reports have evaluated the role of HPV type in the development of small-cell carcinomas [e.g., (5)]. DNA sequence variations among different isolates of HPV16 and HPV18 have been found in various geographic locations and ethnic groups (6-11). To date, these variations have not been shown to correlate with pathologic features (12), and it is not clear whether HPV genetic-intratype variability could account for

*Affiliations of authors: M. Lizano, M. C. Guido, A. García-Carrancá, Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Division of Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico; J. Berumen, L. Casas, Multidisciplinary Research Laboratory, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Escuela Médica Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Mexico City.

Correspondence to: Alejandro García-Carrancá, Ph.D., Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apartado Postal 70-228, 04510 Mexico City, Mexico. E-mail: carranca@servidor.unam.mx

See "Notes" following "References."

© Oxford University Press

the wide spectrum of pathology found in the associated lesions.

To determine whether certain HPV variants from known virus types could be associated with particular histologic forms of cervical carcinoma, we analyzed the HPV-variant status in a sample of tumors from Mexican patients. Fifty-three frozen biopsy specimens were obtained from a random sample of a consecutive group of patients who sought medical care during the period from 1992 through 1993 at the Instituto Nacional de Cancerología in Mexico City. These samples consisted of 13 adenocarcinomas, 13 adenosquamous carcinomas, and 27 squamous cell carcinomas of the uterine cervix. Another group of 24 paraffin-embedded biopsy specimens obtained from the pathology files of the same institute was also selected for this study; these specimens were collected between 1985 and 1994, and all were obtained from lesions diagnosed as

small-cell carcinoma of the uterine cervix. This study was approved by an institutional review board. All diagnoses were based on the pathology records that accompanied each specimen, and these records included a histologic determination made according to proposed criteria (13).

We assessed the presence of HPV DNA in these specimens, and we attempted to define the virus types by modifying a previously described single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction (SSCP-PCR) assay (14). Although the SSCP-PCR patterns generated from many of the specimens were clearly identifiable as originating from HPV type 16, 18, or 31, other patterns suggested that other virus types or variants of known types were present (Fig. 1, A). To confirm these results and to determine the origins of the variant electrophoretic patterns, PCR products from

the HPV L1 gene (15) and the LCR (i.e., long control region) (7,16) were directly sequenced for those specimens that tested positive for viral DNA (e.g., Fig. 1, B). This analysis revealed the presence of HPV types 45 and 58 (Table 1, A) and showed the existence of variants of HPV types 16 (11 cases), 18 (eight cases), and 45 (three cases) in these tumors (Table 1, B).

A variant of HPV16 that was observed frequently in this Mexican population (Fig. 1, A; compare 16 ref [i.e., prototype reference] lanes with 16 var [variant] lanes) showed the same nucleotide changes as two variants already described, i.e., Bb-2 and IND-8, which belong to a group of Brazilian and Indian variants, respectively, that are considered to be representatives of a novel branch of HPV16 diversity (17). This variant has been grouped together with other variants into the Asian-American branch (10). One of the

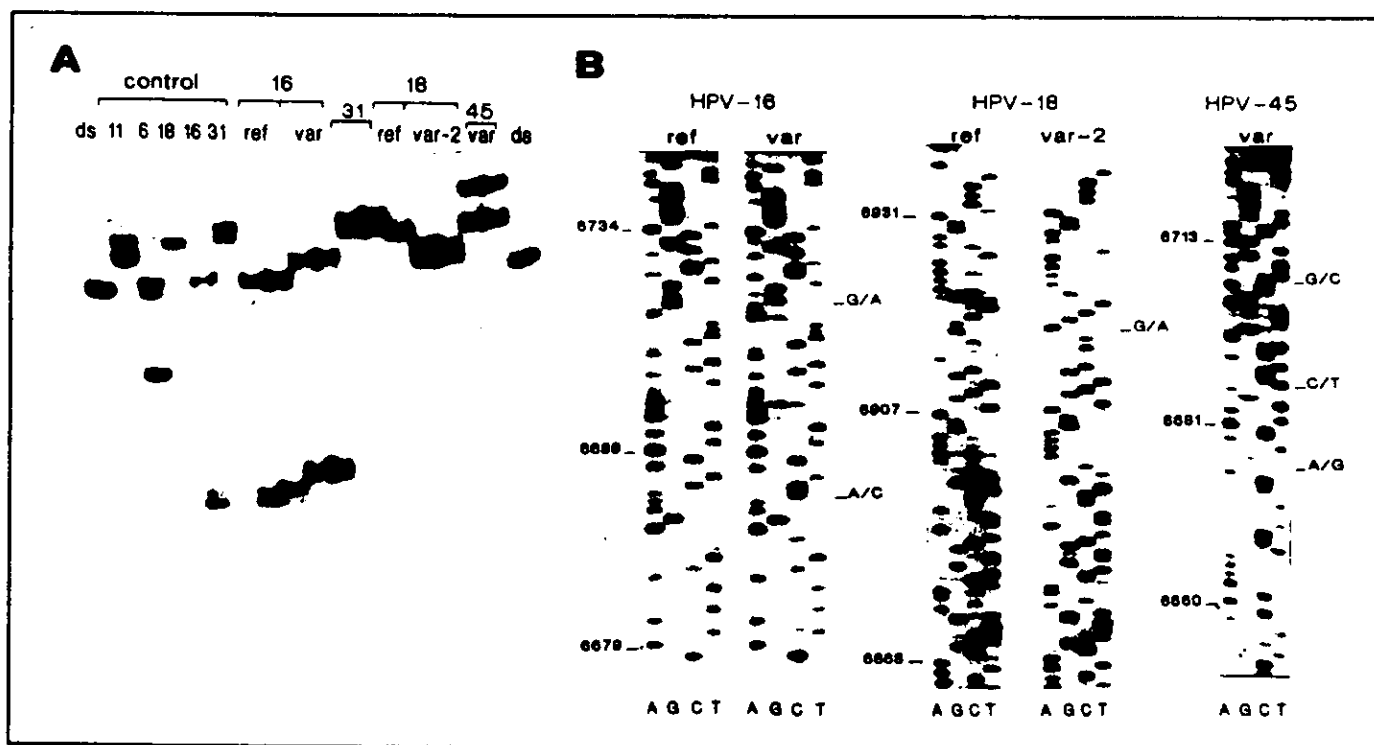


Fig. 1. Variants of human papillomavirus (HPV) types 16, 18, and 45 in cervical tumors from a Mexican population and alteration of the DNA sequence of an L1 gene fragment. A sensitive single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction (SSCP-PCR) assay allowed us to type HPV-positive samples by comparing the electrophoretic migration patterns of L1 gene amplification products. A) Samples that were shown to have amplifiable DNA (i.e., positive for β -globin gene PCR products) were analyzed for HPV DNA by use of GP5/GP6 consensus primers (26) that allow amplification of a 140-base-pair fragment of the HPV L1 gene. DNA samples from plasmids or cell lines known to contain specific viral sequences were also amplified, and the products were used to generate "control" electrophoretic patterns for different HPV types. The SSCP-PCR analysis was performed essentially as

described previously (14). Electrophoresis in 6% polyacrylamide gels was carried out at 10 W for approximately 4 hours at 4°C. ds = double-stranded DNA; ref and var = prototype-reference clones and variant clones, respectively, for the indicated HPV types (confirmed by DNA sequence analysis). Note that neither control nor reference DNA was available for HPV45; characterization of the HPV45 variant was based on DNA sequence analysis. Pairs of samples that had previously yielded similar patterns were loaded side by side onto the gel for a better comparison. B) DNA sequences of specific PCR products generated from the HPV L1 gene by use of primers MY09/MY11 (15) are shown for variant (var) or reference (ref) viral DNAs. Nucleotide position numbers are indicated to the left, whereas nucleotide changes (ref → var) are indicated to the right of each sequence panel.

Table 1. Distribution of different human papillomavirus (HPV) types and variants in carcinomas of uterine cervix of different histologic origin*

A) HPV types according to histologic type of carcinoma						
No. of carcinomas according to HPV type†						
Histologic type	HPV16	HPV18	HPV31	HPV45	HPV58	Total
Squamous cell carcinoma (n = 27)	13	6	3	—	1	23
Adenosquamous carcinoma (n = 13)	4	3	1	3	—	11
Adenocarcinoma (n = 13)	4	5	—	—	—	9
Small-cell carcinoma‡ (n = 24)	—	10	—	—	—	13§

B) Distribution of HPV16 and HPV18 reference (ref) clones and variants (var) according to histologic type of carcinoma					
No. of carcinomas according to HPV type					
Histologic type	HPV16		HPV18¶		
	ref	var	ref	var-1	var-2
Squamous cell carcinoma	8	5	0	2	4
Adenosquamous carcinoma	0	4	2	1	0
Adenocarcinoma	2	2	4	1	0
Small-cell carcinoma	—	—	10	0	0

*The presence of different HPV types and their variants was analyzed in a sample of tumors isolated from a homogeneous population of Mexican origin who belonged to a low socioeconomic class and who exhibited no variations in race and ethnicity. HPV DNA was detected by amplification of a conserved region of the HPV L1 gene, using primers GP5/GP6 (26) and the polymerase chain reaction.

†56 of 77 carcinomas were positive for HPV.

‡The histologic pattern of small-cell carcinoma was defined by the cytologic features of the tumor cells as well as by their grouping pattern. The cells were small, with scanty cytoplasm and uniform round-to-oval nuclei, with no prominent nucleoli.

§DNA from three HPV-positive, but HPV18-negative, samples was not available for further typing.

¶The proportion of HPV18 variant types in squamous cell carcinomas (six of six total tumors) and the proportion of variant types in the three other histologic types of tumors combined (two of 18 total tumors) were compared by use of the two-tailed Fisher's exact test; the difference was found to be statistically significant ($P = .000416$).

HPV18 variants (Fig. 1, A; 18 var-2 lanes) is almost identical to the Tanzanian T18-8 isolate except for nucleotide position 7529, which is unchanged, and this variant could belong to the African branch. The other HPV18 variant identified in this study (var-1; not shown) is identical to the T18-9 Tanzanian clone, which is located in the European branch (7). These HPV18 variants correspond to clones IS168 and IS002, respectively, according to L1 sequences published for different isolates (18). The HPV45 variant found in this Mexican population (Fig. 1, A; 45 var lanes [Note: 45 ref sample not available]), accounting for all three positive cases, is identical in the L1 region to clone IS819 (18).

When we evaluated the clinical stage of the tumors and the age distribution of the patients in relation to the presence of variants of HPV types 16, 18, and 45, we found some statistically significant associations. In particular, we observed that, in squamous cell carcinomas, the variant of HPV16 was present only among the 28- to 40-year age group, whereas the reference clone was

present in a high proportion of the 40- to 55-year age group (i.e., six of eight individuals with the reference clone were 41–55 years of age; the remaining two individuals were younger than 40 years of age). In other words, five of seven women who were 28–40 years of age and had squamous cell carcinomas had the variant, whereas none of six women who were more than 40 years of age to 55 years of age had the variant (two-tailed Fisher's exact test; $P = .033$).

The most important finding in this study was the apparently exclusive association between HPV18 var-2 and squamous cell carcinoma, in contrast to the reference clone, which was found to be associated with all other histologic types except this one (Table 1, B). The other HPV18 variant (var-1) was observed in all histologic types except squamous cell carcinoma. Finally, the HPV45 variant identified in this study was present exclusively in adenosquamous carcinomas (Table 1, A) and was represented in about one fourth (three [27%] of 11) of all HPV-positive tumors of this histologic type.

The association of particular HPV variants with specific histologic types of cervical cancer suggests either that different cellular factors influence viral ability to transform cells or that specific variants exhibit an intrinsic growth advantage over other HPV isolates in certain types of cells. It has been suggested that viral diversity correlates with the ethnic characteristics of populations rather than with geography (19). In Mexico, mixed ethnic groups are enriched mostly by American-Indian (Amerindian) rather than by Caucasian or African components (20). It is of particular interest that, besides the reference clone, the only HPV16 variant detected in this Mexican population has been found previously in Brazil (IND-8), i.e., in a population of Amerindian origin (17). Yamada et al. (10) detected the same variant along with many other HPV16 variants in a population in the United States with a high Amerindian component, suggesting that this variant may be frequent among certain populations in America.

Although patients infected with the HPV16 variant seemed to be younger

(seven of 11 women were ≤ 40 years of age) than those harboring the reference clone (eight of 10 women were >40 years of age), no significant associations were established. Nevertheless, in a preliminary study that included 120 patients with cervical carcinoma from a Mexican population, we observed that this variant was present in the tumors from younger women, in contrast to the reference clone, which was found in older women (Berumen J, Casas L, Lizano M, Guido MC, García-Carrancá A: unpublished data). These observations suggest that the HPV16 variant found in the Mexican population and apparently characteristic of Amerindian women may represent a higher risk variant. This possibility could explain, in part, the high incidence of cervical carcinoma observed among Latin-American women (21,22). Another possibility is that the variant is of recent origin and was not around when the older women were sexually active, although four individuals (with adenocarcinomas) of 11 who had the variant were older than 40 years of age (41, 43, 44, and 55 years of age, respectively).

The fact that one of the HPV18 variants (var-2) was found exclusively in squamous cell carcinomas suggests that this isolate may be associated with less aggressive behavior, since this group of tumors has a relatively better prognosis than adenocarcinomas or adenocarcinomas. Indeed, when we analyzed a group of small-cell cervical carcinomas (accounting for $<1\%$ of cervical neoplasias and with the worst prognosis) for the presence of HPV DNA, we found that all HPV18-positive tumors contained the reference clone. Since there were no HPV18 variants in this group, it is possible that the variants detected in our study may represent less aggressive isolates. An HPV18 variant with an apparently less aggressive behavior has already been described in precancerous lesions (23). It is tempting to speculate that this variant could represent, together with var-2 (and probably with var-1), a subgroup of HPV18 variants with a different biologic behavior.

Because certain HPV isolates and the histopathologic characteristics of tumors appear to be associated, it will be impor-

tant to determine whether these associations reflect true functional differences among viral variants that affect the relative risk of progression of precancerous lesions. This information could also be relevant for some immunization strategies, since some amino acid (aa) positions, including aa 379 and aa 415 for HPV16 and aa 399 for HPV18, are part of identified L1 linear epitopes (9,24,25). Finally, it will be important to assess the prevalence of each variant in the normal population to determine its associated relative risk in the development of cervical cancer.

References

- (1) Gallup DG, Harper RH, Stock RJ. Poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1985;65:416-22.
- (2) Berek JS, Hacker NF, Fu YS, Sokale JR, Leichter RC, Lagasse LD. Adenocarcinoma of the uterine cervix: histologic variables associated with lymph node metastasis and survival. *Obstet Gynecol* 1985;65:46-52.
- (3) Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1991;77:912-7.
- (4) Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
- (5) Pao CC, Lin CY, Chang YL, Tseng CJ, Hsueh S. Human papillomaviruses and small cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1991;43:206-10.
- (6) Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992;66:2057-66.
- (7) Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993;67:6424-31.
- (8) Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, Tucker RA, Rawls WE. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virology* 1991;184:101-7.
- (9) Pushko P, Sasagawa T, Cuzick J, Crawford L. Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1994;75:911-6.
- (10) Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 1995;69:7743-53.
- (11) Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Fukushima M, Kato I, et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes* 1994;9:85-92.
- (12) McLachlin CM, Tate JE, Zitz JC, Sheets EE, Crum CP. Human papillomavirus type 18 and intraepithelial lesions of the cervix. *Am J Pathol* 1994;144:141-7.
- (13) Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E, editors. Tumors of the cervix, vagina, and vulva. Fascicle 4. In: Atlas of tumor pathology. Washington (DC): Armed Forces Institute of Pathology. 1992.
- (14) Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5413-7.
- (15) Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-14.
- (16) Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, et al. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 1991;29:1765-72.
- (17) Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 1993;67:6413-23.
- (18) Myers G, Baker C, Wheeler C, Halpern A, McBride A, Doorbar J. Human papillomaviruses. 1996. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos (NM): Theoretical Biology and Biophysics Group. 1996.
- (19) Cavalli-Sforza LL, Minch E, Mountain JL. Coevolution of genes and languages revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5620-4.
- (20) Lisker R, Ramirez E, Briceno RP, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791-801.
- (21) Parkin DM, Muir CS. Cancer incidence in five continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992;120:45-173.
- (22) Tapia R, Kuri P, Macías C, De la Garza J, Mohar A, Meneses A, et al, editors. Registro histopatológico de neoplasias malignas en México. Mexico City: Dirección General de Epidemiología SS. 1996.
- (23) Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype

with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer* 1995;60:369-76.

- (24) Zhou J, Sun XY, Davies H, Crawford L, Park D, Frazer IH. Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology* 1992;189:592-9.
- (25) Heino P, Skyldberg B, Lehtinen M, Rantala I, Hagmar B, Kreider JW, et al. Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J Gen Virol* 1995;76:1141-53.
- (26) van den Brule AJ, Snijders PJ, Raaphorst

PM, Schrijnemakers HF, Delius H, Gissmann L, et al. General primer polymerase chain reaction in combination with sequence analysis for identification of potentially novel human papillomavirus genotypes in cervical lesions. *J Clin Microbiol* 1992;30:1716-21.

Notes

Partially supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1705-M9209 and F383), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universi-

dad Nacional Autónoma de México (UNAM) (IN-211394), Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Postgrado-UNAM, and the Miguel Alemán Foundation.

We thank J. L. Ramírez-Gaytán, L. M. Hinojosa, A. Meneses, and F. Arenas for providing clinical samples; C. D. Robles for collecting and analyzing clinical data; A. Osorio, A. Mohar, L. Rocha, O. Medina, and I. López for critically reading the manuscript; and E. Reyes for providing assistance.

Manuscript received February 25, 1997; revised June 4, 1997; accepted June 17, 1997.

Germine CDKN2A Mutations in Childhood Melanoma

Cutaneous melanoma, primarily a disease of adulthood, does occur in children and displays similar biologic behaviors, including invasion, metastasis, and death (1). The proposition that those who develop melanoma during childhood harbor a strong predisposition to melanocyte neoplasia is consistent with Knudson's hypothesis that cancers arising in the very young may result from mutations to key regulatory genes passed through the germline (2). Evidence from melanoma kindreds indicates that germline mutations in the CDKN2A tumor-suppressor gene are causally related to the development of a subset of these cancers (3). CDKN2A would also be expected to have a role in the etiology of some early-onset melanomas. To test this hypothesis, we screened a population-based series of childhood melanoma cases for evidence of germline CDKN2A mutations.

During the interval January 1, 1987, through June 30, 1994, 61 histologically confirmed cases of cutaneous melanoma occurring in children less than 15 years of age were notified to the Queensland Cancer Registry. As part of a larger case-control study (4), blood samples were subsequently obtained from 31 of these children (males:females, 20:11; age range at diagnosis, 3-14 years). Written informed consent was obtained from the parents of each subject, and the study was approved by our institutional ethics review board.

DNA was extracted from lymphocytes of each case and the three exons of CDKN2A that encode p16 (3) were screened for mutations by single-strand conformation polymorphism analysis following amplification by polymerase chain reaction (5). Samples that showed aberrant mobility patterns (Fig. 1) were sequenced (5) to identify specific nucleotide changes.

Of the 31 cases, 10 had a family history of melanoma and were a priori considered to have a greater likelihood of inherited disease susceptibility; the remainder were 'sporadic' cases. Among

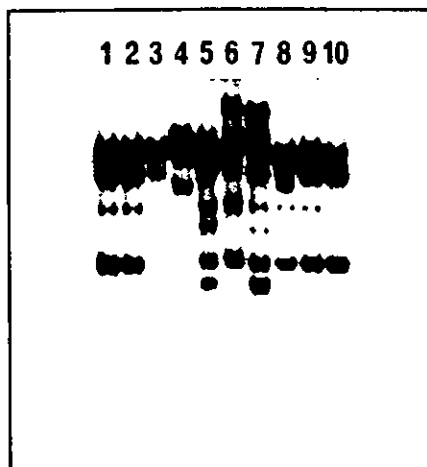


Fig. 1. Autoradiograph of a single-strand conformation polymorphism gel showing mobility shifts in exon 1 of CDKN2A. Lanes 1, 2, 9, and 10 are wild-type polymerase chain reaction products; lanes 3-8 are positive controls from melanoma cell lines with known exon 1 mutations; lane 3 is from melanoma case No. 140090.

the familial cases, one germline mutation was observed in a female (case No. 140090) with a history of two primary melanomas before age 13 years. The mutation was a thymidine-to-cytosine transition, resulting in a leucine-to-proline substitution at codon 16. No disease-associated CDKN2A mutations were detected among the sporadic cases, although one individual carried the well-characterized alanine-to-threonine polymorphism at codon 148.

The prevalence of CDKN2A mutation among childhood cases as a whole (one of 31) was lower than anticipated; however, the finding that one of 10 familial melanoma cases harbored a germline mutation accords with the prevalence among melanoma kindreds (3). These data indicate that mutations of CDKN2A are not commonly associated with childhood melanoma. Although this finding does not preclude a central role for CDKN2A in the evolution of some pigment cell cancers (3), it suggests that other genes are important in the genesis of early-onset melanomas.

DAVID C. WHITEMAN
AMANDA MILLIGAN
JOHN WELCH
ADELE C. GREEN
NICHOLAS K. HAYWARD

References

- (1) Tate PS, Ronan SG, Feucht KA, Eng AM, Das Gupta TK. Melanoma in childhood and adolescence: clinical and pathological features of 48 cases. *J Pediatr Surg* 1993;28:217-22.
- (2) Knudson AG Jr, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:5116-20.
- (3) Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Mol Med* 1997;3:5-20.
- (4) Whiteman DC, Valery P, McWhirter W, Green AC. Risk factors for childhood melanoma in Queensland, Australia. *Aust J Cancer* 1997;70:26-31.
- (5) Walker GJ, Hussussian CJ, Flores JF, Glendening JM, Hafuska FG, Dracopoli NC, et al. Mutations of the CDKN2/p16INK4 gene in Australian melanoma kindreds. *Hum Mol Genet* 1995;4:1845-52.

Notes

Affiliation of authors: Queensland Institute of Medical Research, Royal Brisbane Hospital, Herston, Australia.

Correspondence to: Nicholas K. Hayward, Ph.D., Queensland Institute of Medical Research, PO Royal Brisbane Hospital, Herston, Qld 4029, Australia. E-mail: nickH@qimr.edu.au

Erratum: "Aspartame Consumption in Relation to Childhood Brain Tumor Risk: Results From a Case-Control Study," by Gurney et al. [*J Natl Cancer Inst* 1997;89:1072-4 (Issue 14)]. In paragraph 2, line 11, the sentence should read, in part, "Briefly, case patients were 19 years of age or younger. . . ." The Journal regrets the error.

Erratum: "Association Between Human Papillomavirus Type 18 Variants and Histopathology of Cervical Cancer," by Lizano et al. [*J Natl Cancer Inst* 1997;89:1227-31 (Issue 16)]. There is a discrepancy between the text on page 1229 (column 2, sentence beginning on line 20) and data shown in Table 1, B, concerning HPV18 variant 1. The information in the table is correct, and the sentence in the text should read as follows: "The other HPV18 variant (var-1) was observed in all histologic types except small-cell carcinoma." The Journal regrets the error.

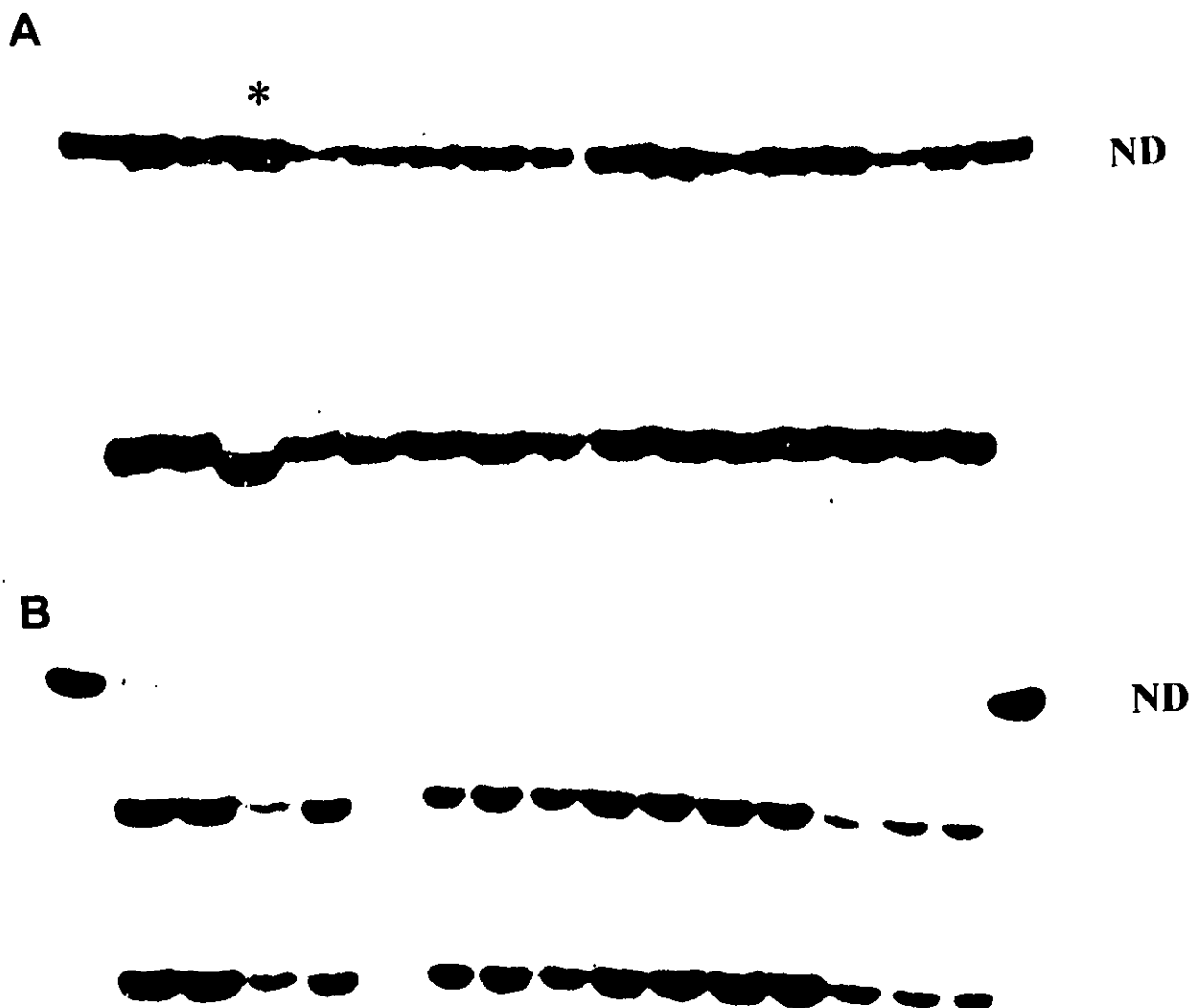


Figura 4. Análisis por SSCP-PCR de la presencia de mutaciones en los genes *ras*. Se muestran dos ejemplos de ensayos de SSCP donde los DNAs tumorales no presentaron cambios en la migración electroforética, con respecto a controles normales negativos. A) Muestras de tumores del cuello uterino analizadas para el primer exón de *H-ras*. El asterisco señala al patrón que fue utilizado como control positivo de mutación, que corresponde a un plásmido que contiene la versión mutada en el codón 12 de *H-ras* (EJ). B) Incluye el análisis del segundo exón de *N-ras*. En ninguno de los casos se observó variación en la migración electroforética de los DNAs analizados. ND, es la porción de la muestra que no se desnaturizó adecuadamente, antes de ser sometido a la electroforesis.

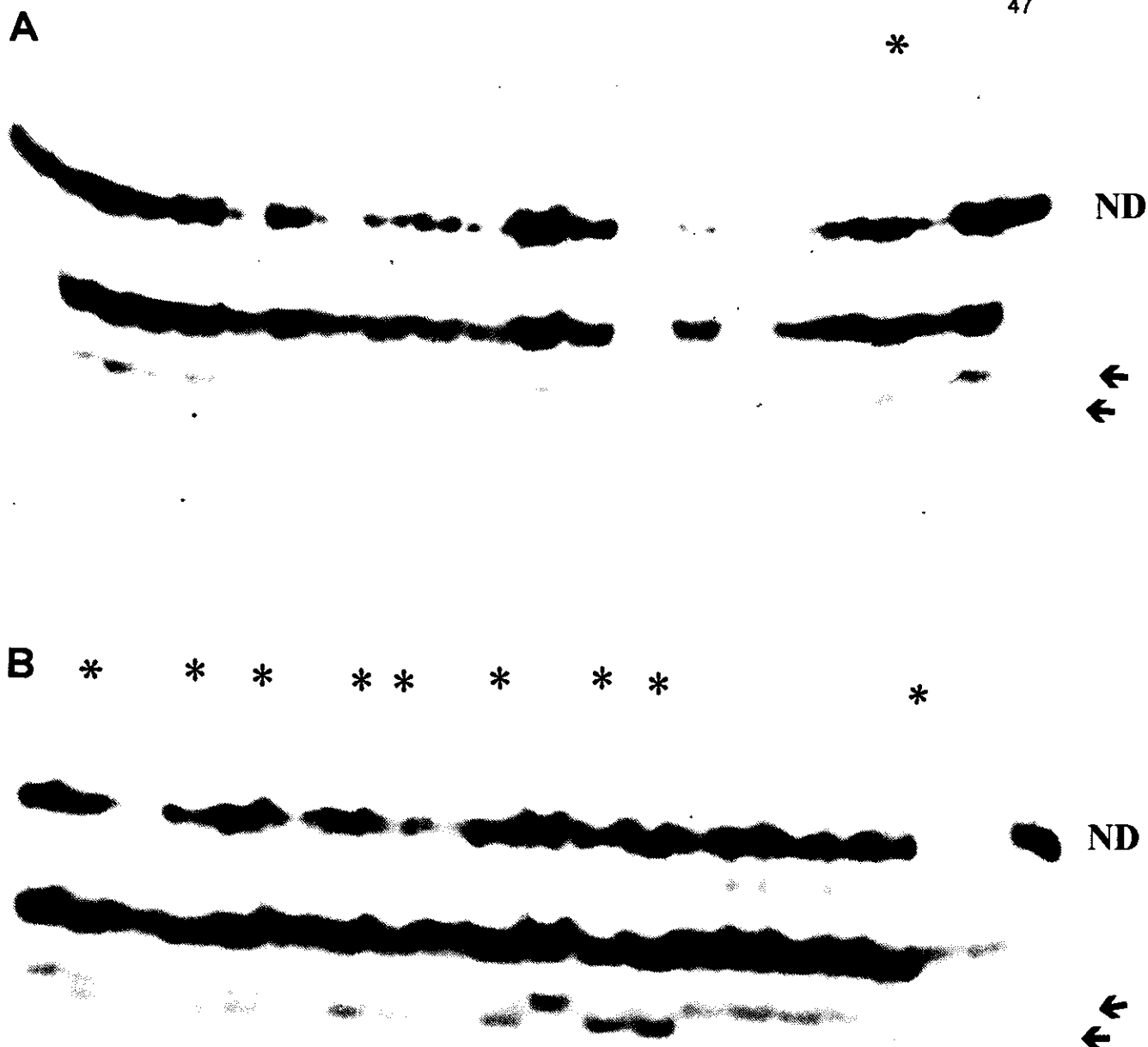


Figura 5. Análisis por SSCP-PCR de la presencia de mutaciones en el exón 2 de K-*ras*. Se muestran los cambios en migración electroforética obtenidos del DNA de la serie de tumores analizada por SSCP-PCR. La flecha superior señala la banda esperada para un alelo *ras* normal; la banda inferior señala una posible mutación de *ras*. Los asteriscos indican los casos donde se encontraron patrones alterados que sugieren posibles mutaciones de K-*ras*. ND, es la porción de DNA que permaneció sin desnaturizar al inicio de la electroforesis. A) Tumores de origen escamoso; B) Adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos.

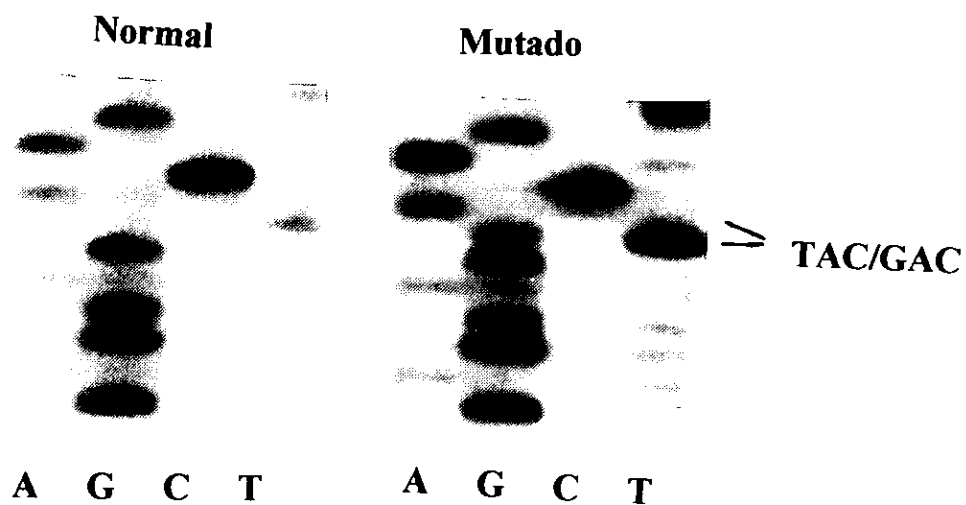
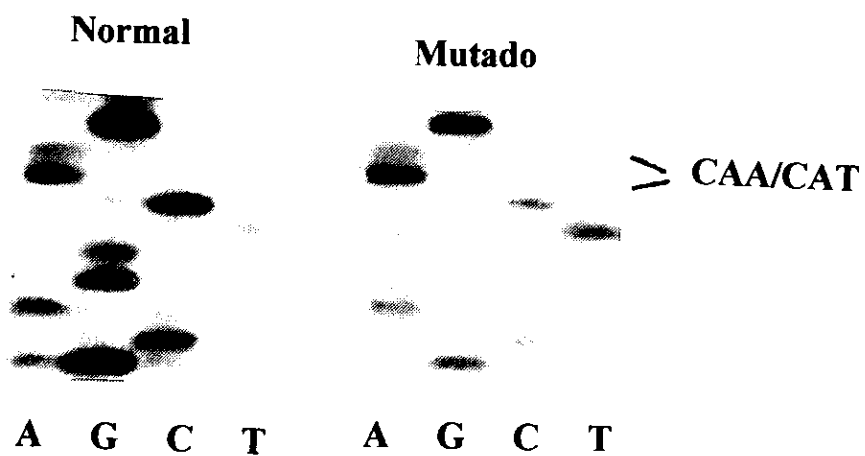
Tyr64**Gln61**

Figura 6. Secuencia directa de productos de PCR del exón 2 de K-ras de cáncer de cérvix. Se muestran los cambios encontrados para los codones 61 y 64 de K-ras en los tumores de cérvix.

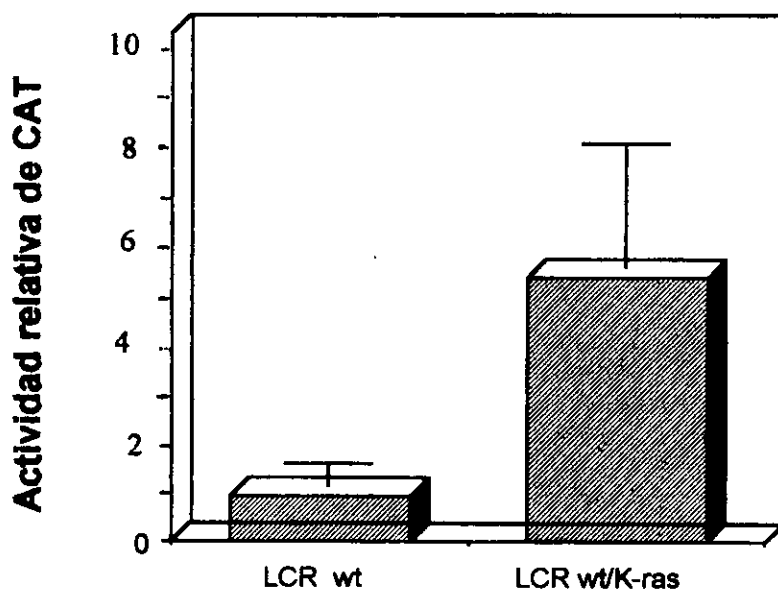


Figura 7. Activación transcripcional del promotor P105 de HPV-18 por K-ras. Líneas celulares de cáncer de cérvix C-33A, se cotransfectaron con un plásmido que contiene a la LCR de HPV-18 (P105) unido al gen CAT; y con el plásmido que contiene una versión activada de K-ras ($\text{Ras}^{\text{Arg12}}$). La actividad del gen reportero se midió 48 horas después de la transfección en dos experimentos independientes.

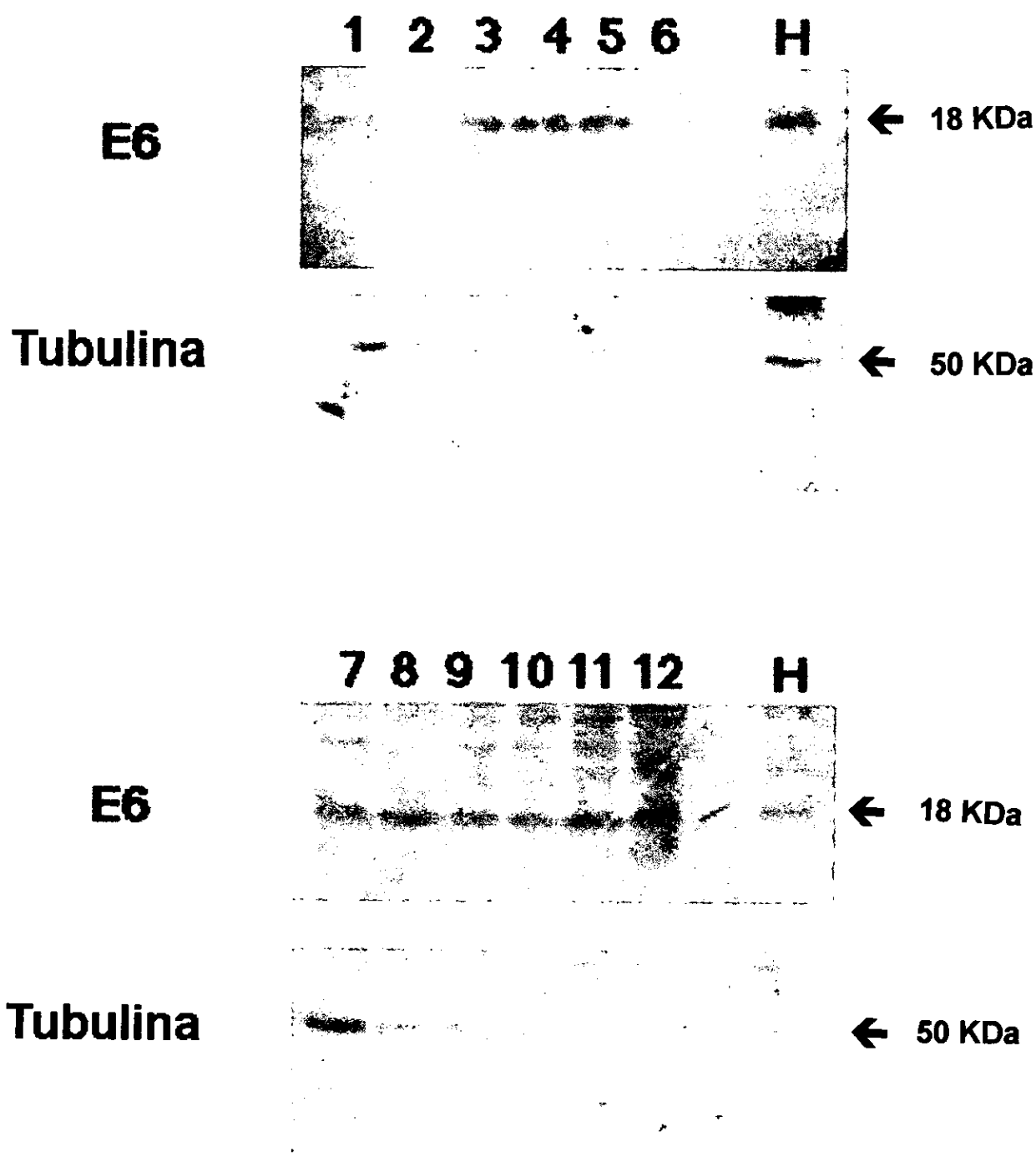


Figura 8. Efecto de K-ras sobre la expresión de la proteína E6 en tumores. Se analizó por Western blot las diferencias en expresión de la proteína E6 de HPV en muestras de adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos de cérvix con *ras* mutado y normal. Las flechas muestran los pesos moleculares esperados, de acuerdo a los marcadores preteñidos, para E6 (~ 18-19 kDa) y para Tubulina (~ 50 kDa). H, Hela; carriles 1,2,7,8 y 10, son muestras HPV+/K-*ras* normal; carriles 3,4,5,6,9,11 y 12 son muestras HPV+/K-*ras* mutado.

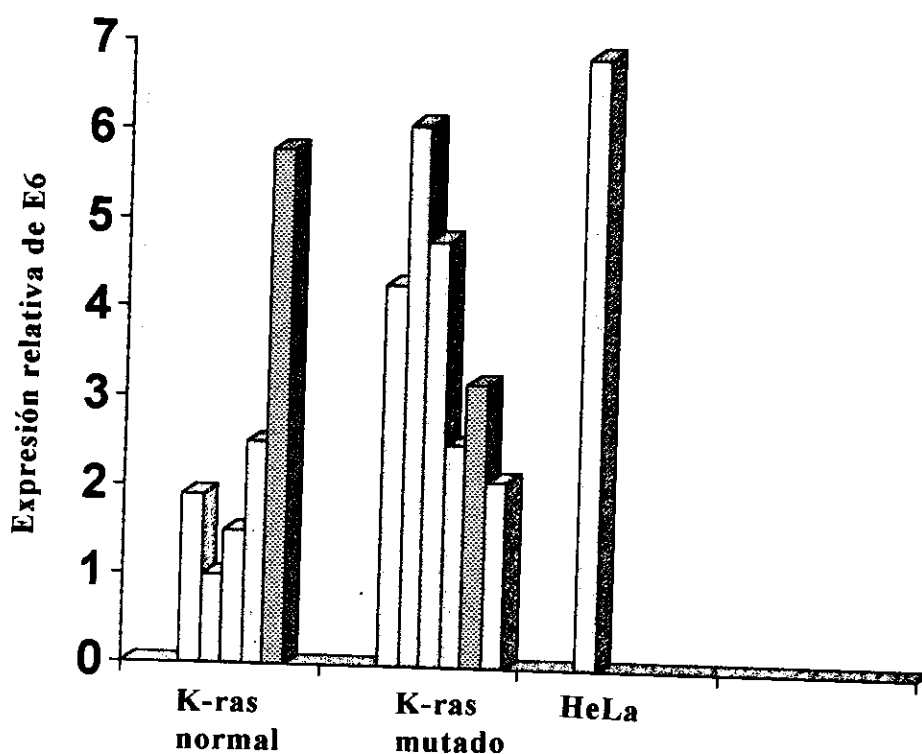


Figura 9. Efecto de K-ras mutado en los niveles de E6 en los tumores de cérvix. Se midieron por densitometría las bandas de E6 y tubulina del Western blot de la figura 8. El valor de E6 de cada carril se obtuvo normalizando E6 con tubulina. El bloque de K-ras normal corresponde en el mismo orden, a las muestras de los carriles 1,2,7,8,10 de la figura 8. El bloque de K-ras mutado son las muestras 3,4,5,6,9,11 y 12, en el mismo orden; H, es HeLa.

HPV16

	L1	LCR	
	6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	
	6 6 7 8 8 8 8 8 9 9 9 9	4 4 5 5 6 6 7 7 7 7 7 7 7 7 8 8 8 8	
	1 9 2 0 2 5 6 6 1 6 6 7 7	8 8 0 2 6 8 1 2 3 4 5 6 8 8 2 3 3 3 4	
	8 5 1 3 6 4 2 5 8 4 5 0 5	5 9 7 1 9 9 4 9 0 3 2 4 1 6 6 4 7 9 2	
ref	A A G A C C T C C A A C T G	A G A G C C T A A T A C T C G G A A G	E
var	- C A T - T - T - - - T - -	C A - A T A - C - G - T - T - - - -	AA
	* *		

HPV18

	L1	LCR	
	6 6 6 6 6 6	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	
	6 6 7 7 9 8	5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 6 6 6 6 6 7 7 7 7	
	2 2 1 4 1 4	1 2 2 2 3 3 4 5 6 6 6 9 4 5 5 7 8 0 1 2 3	
	5 6 9 9 7 2	2 7 8 9 0 6 9 1 3 4 7 2 3 1 8 0 1 4 7 6 0	
ref	C C G G G C	G A A C T C C C G A A T T T A A T T A C C	As+AI
var-2	G T A A A G	T - - - C - - - A - C C G C C T - C - T A	AF
var-1	G - - - - G	- - - A - - - - - C C - - - T - - - - -	E
	*		

HPV45

	L1	LCR
	6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	7 7 7 7
	6 6 6 6 6 6 7 8 8 8 8	5 5 6 7
	2 6 6 7 7 8 0 1 3 5 6	2 6 2 3
	1 1 5 6 7 7 5 6 7 2 1	7 3 9 4
ref	C C A A G C G A C T G	C C T G
var	- - - G - T C G - - A	T A C A
	* *	

Figura 10. Variaciones genómicas de los fragmentos de L1 y LCR de aislados de HPV-16, HPV-18 y HPV-45. Se muestran los cambios en la secuencia nucleotídica de las variantes encontradas en la población mexicana. Arriba de cada bloque, leído verticalmente se indica la posición nucleotídica del gen L1 y la región LCR en donde se encontraron algunos cambios. La clona de referencia de cada tipo viral se indica como ref, y cada variante como var. Para cada variante, las posiciones que no varían en relación a la clona de referencia, se marcan con guiones. Los asteriscos muestran los cambios de las bases que dan por resultado cambios en aminoácidos. A la derecha se señala el grupo filogenético al cual pertenece cada variante, de acuerdo al análisis de secuencias de LCR (Myers et al., 1996). E, rama Europea; AA, Asiática-Americana; As+AI, Asiática+Amerindia; Af, africana.

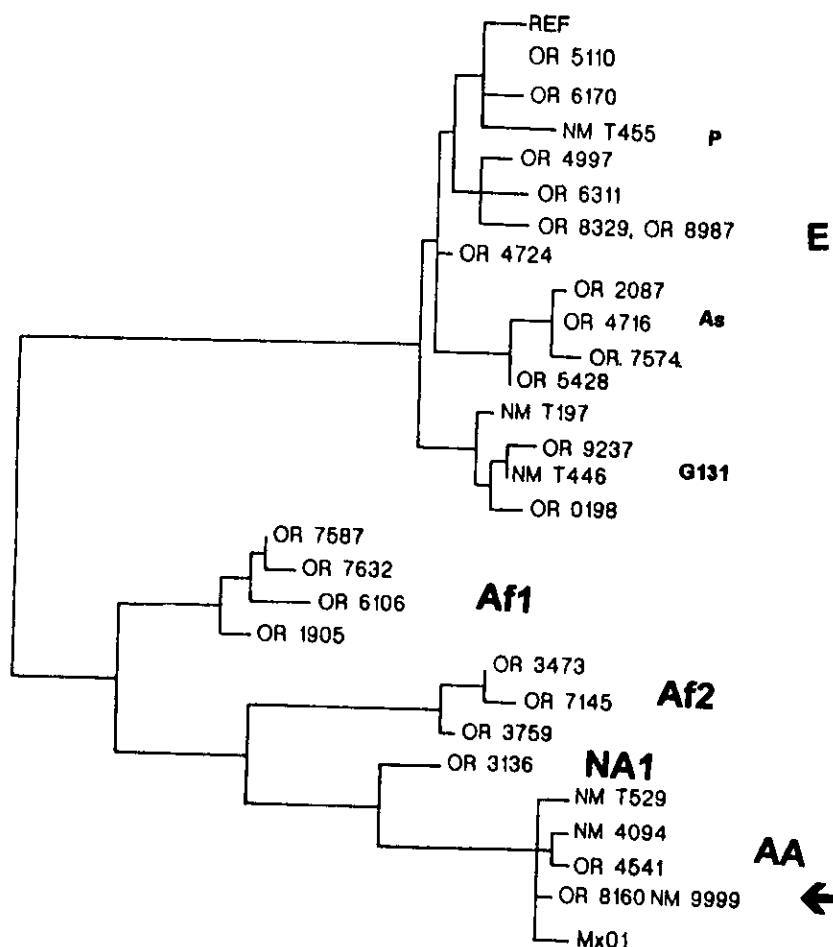


Figura 11. Árbol filogenético de variantes de HPV-16. El árbol filogenético se realizó de acuerdo al mayor parecido de secuencias de E6-L2-L1-LCR (Yamada et al., 1995). REF es la clona de referencia de HPV-16. Las variantes se muestran con los códigos de identificación de secuencias publicadas. La longitud de la línea horizontal de cada rama es proporcional al número de cambios. Las letras grandes a la derecha muestran los subgrupos en que se han dividido las variantes de HPV-16: E, Europea; Af1, Africana 1; Af2, Africana 2; NA1, norteamericana; AA, Asiática-Americana. Las letras pequeñas indican las subclases dentro del linaje Europeo. La flecha señala donde se ubica la variante mexicana de HPV-16, encontrada en este estudio.

Tabla IV
Frecuencia de mutaciones en *K-ras* en
tumores de cuello uterino

Tipo Histológico	Total de muestras	<i>K-ras</i> mutado	%
Escamoso	27	1	4
Adenoescamoso	13	4	31
Adenocarcinoma	13	5	38

Se muestra la distribución de las mutaciones encontradas en el exón 2 de *K-ras* de acuerdo al tipo histológico de los tumores de cérvix analizados.

Discusión

De las variedades del cáncer cérvico uterino, los adenocarcinomas, los carcinomas adenoescamosos y los carcinomas de células pequeñas del cérvix, presentan una incidencia baja; sin embargo, generalmente tienen un comportamiento más agresivo y un peor pronóstico que los carcinomas escamosos en etapas similares (Gallup et al., 1985; Berek et al., 1985; Hopkins et al., 1991). A pesar de que el HPV-16 se ha asociado predominantemente con los tumores de cérvix de origen escamoso y el HPV-18 con los adenocarcinomas (Bosch et al., 1995), las diferencias en pronóstico entre estos grupos de tumores continúa sin una explicación clara. En la búsqueda de factores que pudieran determinar diferencias en el pronóstico de las distintas presentaciones histológicas del cáncer cérvico uterino, en este estudio analizamos tanto la presencia y tipo de variantes de HPV, como de mutaciones activadoras de los tres genes *ras* (*H*, *K* y *N-ras*), en tumores del cuello uterino de pacientes mexicanas.

Actualmente son muchas las evidencias que muestran que las alteraciones en los genes celulares que controlan el crecimiento celular y la diferenciación juegan un papel crítico en la patogénesis del cáncer. Por ello se ha puesto especial atención en el análisis de estos genes. Los genes *ras* fueron identificados en cáncer humano hace ya varios años (Shih et al., 1982; Krontiris et al., 1981). Desde entonces, se ha aprendido mucho no solo acerca de la proteína Ras, sino también de las proteínas con las que interacciona y el efecto bioquímico de sus mutaciones; sin embargo, aún no es del todo claro cómo es que los oncogenes *ras* alteran el crecimiento y promueven el desarrollo del cáncer. Desde que fueron identificados, se ha reportado que en una gran variedad de tumores humanos ocurren mutaciones en los genes *ras* y las incidencias más altas se encuentran para *K-ras* y en particular en adenocarcinomas (Bos, 1989).

La etiología del carcinoma escamoso de cérvix y del adenocarcinoma de cérvix, probablemente se relaciona con una compleja interacción de factores hormonales y de agentes infecciosos, en donde HPV es el más importante. Los modelos experimentales indican que los oncogenes de HPV y los genes *K-ras* y *H-ras* activados cooperan para

inducir un fenotipo completamente transformado en células epiteliales (Dürst et al., 1991). Sin embargo las interacciones entre *K-ras* y secuencias oncogénicas de HPV no se han confirmado en humanos.

El grupo de tumores incluidos en este estudio es representativo de los tipos histológicos en que el cáncer de cérvix se presenta con mayor frecuencia en México. Con el análisis de estos tumores mostramos que las mutaciones en *K-ras* son más frecuentes en carcinomas adenoescamosos y en adenocarcinomas, que en tumores escamosos del cérvix. Estos datos van acorde con lo reportado en la literatura, en donde se demuestra la baja incidencia de mutaciones activadoras de *ras* en general en carcinomas escamosos humanos (Rumsby et al., 1990). Koulos et al., (1993) han encontrado, con poca frecuencia (12%), mutaciones de *K-ras* en adenocarcinomas del cérvix. Sin embargo, Tenti y colaboradores (1995) reportan una frecuencia más elevada (22%), los autores observan que las mutaciones en el codón 12 de *K-ras* son más frecuentes en los adenocarcinomas mucinosos. Nosotros encontramos una mayor incidencia de mutaciones en adenocarcinomas (38%) y en carcinomas adenoescamosos del cérvix (31%). Esta elevada incidencia podría deberse a la alta sensibilidad del método de SSCP-PCR que utilizamos para el análisis de los genes *ras*. Este método permite la detección de mutaciones en poblaciones mixtas con bajas proporciones de alelos mutados con respecto a los alelos normales. Se ha reportado que en este tipo de muestras, esta técnica resulta inclusive más sensible que la secuenciación directa (Enomoto et al., 1991b). Nuestros resultados se aproximan más a los obtenidos por Jiko y colaboradores (1994), que muestran una frecuencia de mutaciones en *K-ras* hasta del 50% en adenocarcinomas con componentes endometriales.

Todos los tumores con mutaciones en *K-ras*, fueron positivos a secuencias de DNA de algún tipo de HPV, hecho que no descarta la posible cooperación entre los dos eventos moleculares en el proceso de transformación.

Los tumores incluidos en este trabajo corresponden a etapas clínicas avanzadas (de IIB a IVB). Pensamos que para determinar el impacto de las mutaciones de *K-ras* en la sobrevida de las pacientes, se requiere del análisis de tumores en etapas clínicas tempranas con los cuales se pueda hacer un seguimiento cuidadoso de la evolución de las

pacientes. Mientras que muchos estudios han dado evidencias persuasivas de que las mutaciones en los genes *ras* tienen un papel crítico en el desarrollo del cáncer, sabemos muy poco acerca de su papel en lesiones no neoplásicas o preneoplásicas. Los estudios de las mutaciones en *ras* en lesiones precursoras y en cánceres en fases tempranas ayudarán a determinar su utilidad en el diagnóstico y detección temprana de una gran variedad de tumores humanos. La participación de *ras* en el desarrollo de cáncer de cérvix sólo podrá ser entendida a medida que se analice la presencia de mutaciones en estos genes en un número considerable de lesiones premalignas y fases muy tempranas del tumor.

Aunque no es claro el mecanismo, nuestros datos muestran que las mutaciones en *K-ras* se encuentran evidentemente asociadas a células con algún componente glandular en cérvix. Ciertos estudios realizado *in vitro* muestran que la activación de *K-ras* induce diferenciación celular (Bar-Sagi et al., 1985; Sadot et al., 1998). Resulta sugestivo pensar que si *K-ras* se activa en células basales del epitelio, podría tener un papel importante en el proceso de diferenciación del adenocarcinoma.

Existen datos que apoyan, en parte, la cooperación que ocurre entre *ras* y los oncogenes E6 y E7 de HPV para inducir la transformación celular: 1) Ras activa una cascada de cinasas, que finalmente repercute en la activación de jun y fos, los elementos de AP-1; 2) los papilomavirus humanos tiene en su región de control LCR sitios de respuesta a elementos AP-1; 3) los resultados de Antinore y colaboradores (1996) muestran que el efecto transcripcional del complejo E7/jun, incide en los genes con elementos de respuesta a AP-1; entre ellos pudieran estar E6 y E7; 4) la cooperación de *ras* activado con el gen E7 de HPV-16 para transformar completamente células de rata, se correlaciona con los niveles de expresión de E7 (Liu et al., 1995); y 5) clones de células HeLa que expresan altas cantidades de *H-ras* en forma estable, presentan un incremento dramático en los niveles de RNA mensajero de E6 y E7 (Medina-Martínez et al., 1997). Con estas observaciones, resulta atractivo pensar que en presencia de un gen *ras* activado, puede existir un proceso de activación y retroalimentación que aumentaría los niveles de los oncogenes virales.

En estudios en líneas celulares, se ha visto que *H-ras* activado es capaz de aumentar la actividad transcripcional del promotor de HPV-18 (Medina-Martínez et al., 1997). Nosotros ampliamos este resultado al análisis de *K-ras*. En este sistema *K-ras* activado también es capaz de aumentar la transcripción de genes dependientes del promotor viral. Lo que muestra que la LCR en particular de HPV-18, y probablemente de otros tipos virales, es un blanco potencial no sólo de *H-ras*, sino también de *K-ras* activados. Estos datos nos motivaron a analizar si *K-ras* podría ser capaz de activar la expresión de las oncogenes virales en los tumores. En el análisis de los tumores de cérvix no encontramos diferencias significativas entre los niveles de expresión de la proteína E6 en muestras con *K-ras* mutado y con *K-ras* normal; sin embargo, observamos una tendencia de las muestras con *K-ras* mutado, de presentar niveles ligeramente mayores de E6 con respecto a las muestras con *K-ras* normal. La metodología utilizada podría no ser tan sensible como para detectar adecuadamente los niveles de expresión de la proteína E6, ya que no detecta epítopes conformacionales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los tumores que no presentan mutaciones en *ras*, si bien pueden ser otros los mecanismos de transformación involucrados, pudieran tener alteraciones en otros componentes de la vía de Ras, que también repercutieran en el aumento en la transcripción de oncogenes virales. Otra alternativa es que *ras* repercute en las proteínas virales al inicio del desarrollo del tumor. En esta forma, aunque *ras* no tenga efectos importantes sobre HPV en etapas avanzadas del tumor, pudo haber cooperado con HPV al inicio de la tumorigénesis.

Por otra parte, se debe tomar en cuenta que el mecanismo de cooperación entre *ras* y HPV in vivo, no sólo puede resultar de un efecto directo de la vía de Ras (tal vez mediada por c-jun) sobre el promotor viral, sino que diferentes vías o proteínas pudieran estar involucradas en el proceso. Resulta muy importante considerar que Ras activa a promotores con elementos de respuesta a sitios AP-1, por lo que pudiera existir una gran variedad de genes involucrados en el control del ciclo celular, independientes a HPV, que serían modulados por Ras. De este modo, el estudio del proceso de transformación de *ras* y HPV debería de ampliarse al análisis de otros genes.

Hoy en día, numerosos estudios muestran la fuerte asociación de secuencias de HPV, con tumores invasores del cérvix y lo señalan como el más importante de los posibles factores etiológicos. En nuestro estudio, también encontramos una alta prevalencia de positividad a HPV, donde HPV-16 predominó en el 57% de los tumores. En los adenocarcinomas y en los carcinomas de células pequeñas, HPV-18 fue el de mayor frecuencia con 56% y 82%, respectivamente. La prevalencia de los tipos virales específicos en estos grupos de tumores, concuerda con los datos obtenidos del estudio epidemiológico más completo del momento (Bosch et al., 1995). Dada la baja frecuencia con que ocurren los carcinomas de células pequeñas del cérvix ($< 1\%$), existen muy pocos estudios que permitan evaluar la participación de HPV en su desarrollo (Pao et al., 1991). En este trabajo se encontraron secuencias de HPV en 13 de los 24 tumores de células pequeñas (54%), donde HPV-18 predominó en el 77% de los tumores positivos a HPV. La positividad a HPV encontrada en este grupo, no necesariamente refleja la naturaleza del tumor. Es decir, no podemos saber si la prevalencia de HPV en los carcinomas de células pequeñas realmente es menor que en los otros tipos histológicos de cáncer de cérvix, o que dada la calidad del material del tejido incluido en parafina, la prevalencia se subestima. A este respecto, Baay y colaboradores (1996) mostraron que la eficiencia del PCR para material de parafina, tiene una correlación inversa con la longitud del fragmento amplificado. Utilizando los oligonucleótidos GP5/GP6 (mismos que utilizamos en el ensayo de SSCP-PCR), los autores muestran una prevalencia de HPV del 61% en sus muestras, mientras que la positividad a secuencias de HPV aumenta al 88% con el uso de oligonucleótidos que en PCR generan fragmentos más pequeños. Por lo tanto en nuestras condiciones, algunos de los tumores de células pequeñas pudieran contener secuencias de HPV que no estemos detectando.

En la población mexicana estudiada, encontramos variantes para los tipos HPV-16, HPV-18 y HPV-45. En los estudios de variaciones de HPV-16 y 18, se ha observado que la diversidad viral, más que asociarse a una ubicación geográfica, se asocia con las características étnicas de las poblaciones (Cavalli-Sforza, 1992). Es decir, que muchas similitudes entre variantes virales se extienden a los países que tienen una composición étnica relacionada. En la población mexicana predomina un mestizaje enriquecido

principalmente por amerindios y en mucha menor proporción se encuentran los componentes caucásico y africano (Lisker et al., 1990). En este estudio, incluimos una población homogénea de origen mexicano, que no presentó variaciones en raza ni composición étnica. Resulta muy interesante la observación de que a pesar de que la población brasileña es más fuerte en sus componentes caucásico y africano que en indoamericano, la misma variante de HPV-16 presente en la población mexicana, se detectó en una pequeña población con origen amerindio de Brasil (Ho et al., 1991). Yamada y sus colaboradores (1995) detectaron el mismo aislado de HPV-16 en una población de los Estados Unidos con un alto componente amerindio, lo que sugiere que esta variante puede ser muy frecuente entre ciertas poblaciones de América.

Al buscar alguna correlación de la variante de HPV-16 con parámetros clínicos, encontramos algunas asociaciones estadísticamente significativas. Las pacientes que presentaron el aislado mencionado, tienden a ser mujeres menores de 40 años al momento del diagnóstico y de la toma de biopsia. En particular, observamos que en los carcinomas de origen escamoso, la variante de HPV-16 solo estuvo presente en el grupo de mujeres menores de 40 años, mientras que la clona de referencia se presentó en mayor proporción en el grupo de mujeres mayores de 40 años de edad. Estas observaciones sugieren que la variante de HPV-16 encontrada en la población mexicana y aparentemente característica del grupo amerindio, puede constituir una variante de mayor riesgo. Esto ayudaría a explicar, al menos en parte, la alta incidencia de cáncer cérvico uterino que se observa en mujeres latino-americanas (Parkin et al., 1992), además de la menor edad de presentación de este tipo de tumor en relación con otros lugares del mundo (la mitad de las mujeres con carcinoma *in situ* en México tiene menos de 35 años) (Tapia et al., 1996).

Con el fin de evaluar la relación entre variantes naturales de HPV-16 y el riesgo de desarrollar neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grado 2 o 3, Xi y colaboradores realizaron un interesante estudio de seguimiento en mujeres que no tuviesen NIC 2-3 al momento de ingresar en el estudio, y que fueran positivas a HPV-16. En las mujeres que luego desarrollaron NIC 2 o 3 prevalecieron las variantes menos parecidas al prototipo de HPV-16, lo que sugiere que el riesgo para NIC 2 o 3 no es el mismo para todas las variantes y que las menos parecidas al prototipo confieren mayor riesgo. Resulta

importante resaltar que dentro de sus variantes menos parecidas al prototipo, la que más frecuentemente encontraron fue la misma variante de HPV-16 que nosotros encontramos en nuestro estudio. Aunque los autores no detectaron alguna variación significativa en la distribución de variantes por grupos de edad, ni composición étnica, sus datos apoyan a los nuestros: que la variante de HPV-16 encontrada en la población mexicana pudiera tener un comportamiento biológico más agresivo.

Para las variantes de HPV-45 y HPV-18, encontramos asociaciones muy significativas de acuerdo al tipo histológico de los tumores. La variante de HPV-45 identificada en este estudio solo estuvo presente en los tumores adenoescamosos. En relación a HPV-18, encontramos tres aislados: var-1, var-2 y la clona de referencia. Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio fue la asociación, aparentemente exclusiva, entre var-2 y los tumores de origen escamoso ($P=.000416$). Var-1 se encontró en los 4 grupos histológicos, excepto en los tumores de células pequeñas. Estos datos sugieren que var-2 pudiera estar asociada con un comportamiento biológico menos agresivo, dado que los carcinomas escamosos tienen un mejor pronóstico relativo que los adenocarcinomas, los carcinomas adenoescamosos, y en particular los carcinomas de células pequeñas. En contraste, en los carcinomas de células pequeñas (los carcinomas de cérvix con el peor de los pronósticos), positivos a HPV-18, sólo se encontró la clona de referencia, lo que refuerza la idea de una mayor agresividad de esta clona, con respecto a var-2. Por su parte, var-1 presenta menos cambios que var-2 en los fragmentos de L1 y LCR secuenciados; sin embargo, dichos cambios están contenidos en var-2 (con excepción de un cambio extra en var-1 en el nucleótido 7529). De este modo, var-1 podría reflejar un punto intermedio en la evolución entre var-2 y la clona de referencia. La asociación de ciertas variantes de HPV con tipos histológicos específicos de cáncer cérvico uterino sugiere que diferentes factores celulares influyen en la capacidad de transformación viral, o que algunas variantes específicas presentan cierta ventaja en crecimiento en determinados tipos celulares, sobre otros aislados virales.

Dentro de los virus de papiloma humanos de alto riesgo, HPV-18 es de particular importancia. Se observa que este virus se asocia preponderantemente con los tumores más agresivos y menos diferenciados y no con las lesiones intraepiteliales del cérvix

(Arends et al., 1993). De la misma manera, la presencia de HPV-18 se correlaciona con una mayor probabilidad de recurrencia tumoral y de metástasis a nódulos linfáticos. A pesar de su naturaleza agresiva, en algunas ocasiones HPV-18 se asocia con un fenotipo diferente, característico de infecciones con tipos de HPV de bajo riesgo como 6 u 11 (McLachlin et al., 1994). Los estudios llevados a cabo por Hecht y colaboradores (1995) sugieren que la variabilidad genética de HPV-18 puede ser responsable del amplio espectro de patologías asociadas a este tipo viral. Los autores identifican una variante de HPV-18 en el 40% de muestras con neoplasia intraepitelial, mientras que no la observan en casos de cáncer. Esto sugiere que dicha variante tiene un menor potencial oncogénico. Con esto resulta muy sugestivo pensar que esta variante, junto con var-2 (y probablemente var-1) pueden representar un subgrupo de variantes de HPV-18 con un comportamiento biológico diferente.

Dado que parece existir una asociación entre ciertos aislados de HPV y las características histopatológicas de los tumores, resulta muy importante determinar si estas asociaciones reflejan verdaderas diferencias funcionales entre las variantes virales, lo que puede repercutir en el riesgo relativo de progresión de lesiones precancerosas. Existen evidencias que muestran que ciertas alteraciones nucleotídicas de HPV-16 afectan su potencial de transformación *in vitro* (Mittal et al., 1993); asimismo, se ha visto que algunas alteraciones aumentan la actividad del promotor que da lugar a la transcripción de los oncogenes E6 y E7 (May et al., 1994). Por otra parte, Stöppler y sus colaboradores (1996) han demostrado que ciertas variantes naturales de HPV-16 difieren en sus propiedades biológicas y bioquímicas, lo que podría resultar en diferencias en patogenicidad. Estos autores mostraron que proteínas E6, con sustituciones en aminoácidos, presentaban diferencias significativas en su capacidad de anular la diferenciación que se lleva a cabo en queratinocitos humanos bajo ciertas condiciones; a su vez, la actividad de las proteínas E6 variantes y su capacidad de inducir la degradación de p53 *in vitro*, estaban directamente relacionadas. En este sentido, resulta importante realizar ensayos comparativos entre distintos aislados virales, que permitan apreciar las consecuencias de los cambios nucleotídicos en regiones específicas, sobre procesos como la replicación viral, la transactivación de genes celulares o virales y finalmente, la

transformación. Al analizar la secuencia del fragmento LCR que obtuvimos de nuestras variantes, notamos que las mutaciones en las posiciones 7485 y 7521 de HPV-16 se sobrelapan con sitios de unión para YY1. Aunque su papel resulta controversial, se ha visto que este factor de transcripción reprime la expresión de genes tempranos y que mutaciones en estas regiones de HPV permiten que en estado episomal, el virus escape a la represión celular (Bauknecht et al., 1992; May et al., 1994). Por lo tanto, los cambios en estos sitios entre otros, de la variante de HPV-16 encontrada en la población mexicana, podrían alterar los mecanismos de control o regulación de dicha variante.

Se sabe que una gran mayoría de mujeres infectadas con HPV nunca desarrollarán cáncer (Koutsky et al., 1988)). Una proporción de estas mujeres están infectadas con tipos de HPV con bajo potencial oncogénico. Sin embargo, aun en los casos de infección con HPV de alto riesgo, muchas lesiones revierten espontáneamente y sólo algunas desarrollarán neoplasias intraepiteliales o cáncer de cérvix.

En la búsqueda de los factores que determinan que una infección por HPV persista y/o progrese, se ha puesto atención en eventos exógenos (como infecciones por otros agentes, paridad, uso de anticonceptivos orales, cigarro) y particularmente en la respuesta inmune del huésped (Bosch et al., 1992; Tsukui et al., 1996). Actualmente se sospecha que las variantes virales puedan conferir diferentes riesgos a la enfermedad (Lizano et al., 1997; Xi et al., 1997). De ser cierto, se explicaría en parte, como es que algunas mujeres infectadas con los HPV de alto riesgo presenten enfermedad persistente o progresiva, mientras que otras no.

De este modo, el conocimiento del comportamiento biológico de las variantes de HPV tiene implicaciones importantes para el diseño de vacunas. Hoy en día los esfuerzos para desarrollar vacunas profilácticas o terapéuticas contra los HPV continúan (Schiller et al., 1996; McNeil et al., 1997). Las vacunas terapéuticas se encaminan principalmente hacia la estimulación de la respuesta inmune celular del huésped contra el virus, que permita a los individuos con enfermedades relacionadas con HPV, dirigir sus defensas contra la lesión neoplásica infectada con HPV. En contraste, las vacunas profilácticas

más recientes van dirigidas a inducir una respuesta de anticuerpos, capaces de neutralizar al HPV y de prevenir o limitar una infección inicial con el virus.

Extendiendo el conocimiento de que los determinantes antigénicos de las proteínas L1, L2, E6 y E7 difieren en las variantes naturales de HPV, las vacunas efectivas deberán de incorporar estas variaciones en sus fórmulas. Cabe mencionar que los cambios en los aminoácidos de las posiciones 379 y 415 en la variante mexicana de HPV-16 y 399 de var-2 en HPV-18, constituyen parte de epítopes lineales ya identificados (Pushko et al., 1994; Zhou et al., 1992; Heino et al., 1995), lo que podría reflejar la existencia de cambios en epítopes conformacionales. A este respecto, Cheng y colaboradores (1995) muestran la existencia de reactividad cruzada entre variantes de HPV-16 de grupos muy distantes. Sus estudios se basan en epítopes conformacionales de las partículas tipo virus (VLPs), compuestas por la proteína mayoritaria de la cápside, L1 (Cheng et al., 1995). Sin embargo, existe otro estudio en que se propone que tanto el haplotipo del complejo principal de histocompatibilidad (HLA), como la variación de la cepa de HPV-16 deben de considerarse en la búsqueda de individuos de alto riesgo (Ellis et al., 1995). En dicho trabajo identifican variaciones específicas de la proteína E6 de HPV-16, que alteran un epítope presentado por HLA-B7, de una manera tal que puede influir en el reconocimiento inmune por linfocitos T citotóxicos (CTL) restringidos por HLA. De ahí la importancia de conocer si cambios específicos de ciertas variantes repercuten en la antigenicidad de blancos importantes para el diseño de vacunas.

Hoy en día, dado los pocos estudios publicados al respecto, existe la necesidad de saber con certeza si realmente las variantes de HPV presentan un comportamiento biológico diferente, que determinen el tipo de enfermedad o la respuesta inmune del huésped. Además, no se conoce si las asociaciones entre variantes y enfermedad, son el resultado de diferencias específicas en la actividad biológica del mismo virus (en este caso, las mismas variantes serían de mayor riesgo en todas las poblaciones), o se debe a la co-evolución específica y adaptación de variantes particulares en diferentes poblaciones (en este caso, diferentes variantes podrían tener un peor pronóstico en diferentes poblaciones).

Con este panorama resultaría importante lograr esclarecer la etiología de HPV y sus variantes, mediante amplios estudios capaces de determinar la asociación de estas variantes con la enfermedad en diferentes poblaciones. Será de gran importancia precisar la prevalencia de cada variante en la población normal para determinar su riesgo relativo en el desarrollo de cáncer de cérvix.

El cáncer cérvico uterino, como la mayoría de los tumores, tiene un origen multifactorial. Si bien HPV es el factor etiológico principal, podría existir una importante gama de factores que intervengan en su desarrollo. El estudio del papel que juega cada uno de estos factores en cooperación o de manera independiente, aportará información muy valiosa para entender el proceso de la carcinogénesis del cérvix.

Conclusiones

- 1) En tumores del cérvix con componentes glandulares, *K-ras* se encuentra frecuentemente mutado y no así en los tumores de origen escamoso. Esto podría reflejar una contribución de *K-ras* en los mecanismos de transformación neoplásica de estos tipos celulares.
- 2) *K-ras* es capaz de transactivar la respuesta del promotor de HPV en ensayos con líneas celulares. En los tumores de cérvix esta activación positiva de los genes virales por *ras* no resulta evidente, probablemente debido a la participación de muchos otros factores.
- 3) De las variedades histológicas de cáncer de cérvix analizadas en este estudio (carcinomas escamosos, adenoescamosos, de células pequeñas y adenocarcinomas), los tumores de células pequeñas presentaron, aparentemente, la menor frecuencia de secuencias de HPV. Esto podría indicar la participación de otros factores distintos a HPV en la génesis de este grupo de tumores.
- 4) La técnica de SSCP-PCR ha probado ser práctica y sensible para tamizar la presencia de tipos y variantes de HPV en un gran número de muestras de cáncer de cérvix.
- 5) La variante de HPV-16 detectada en la población mexicana, podría tener un comportamiento más agresivo, dado que se encuentra en mujeres más jóvenes, en relación con la clona de referencia.
- 6) La variante de HPV-18, var-2, podría asociarse a un comportamiento biológico menos agresivo, dado que se encontró exclusivamente en los carcinomas de células escamosas, las cuales presentan un mejor pronóstico relativo que los otros carcinomas estudiados.
- 7) Pudiera ser que var-2 y probablemente var-1 representen a un subgrupo de variantes de HPV-18 con un comportamiento biológico menos agresivo. Esto se deduce del reporte que muestra que una variante de HPV-18 se presenta exclusivamente en lesiones precancerosas del cérvix (Hecht et al., 1995).
- 8) Los aminoácidos que cambian en las posiciones 379/415 y 399 de L1 en las variantes encontradas de HPV-16 y 18 respectivamente, constituyen parte de epítopes lineales ya identificados, lo que puede reflejar cambios en epítopes conformacionales.
- 9) La asociación de ciertas variantes de HPV con tipos histológicos específicos de cáncer cérvico uterino, sugiere que: a) diferentes factores celulares influyen en la capacidad de transformación viral, o b) variantes específicas de HPV presentan alguna ventaja en crecimiento en ciertos tipos celulares, sobre otros aislados virales.

Perspectivas

Dada la asociación de variantes específicas de HPV con factores clínicopatológicos de los tumores, resultaría importante conocer la prevalencia de cada una de las variantes en la población normal, para determinar su riesgo relativo en el desarrollo de cáncer cérvico uterino. Por otra parte, sería importante determinar si estas asociaciones reflejan verdaderas diferencias funcionales entre variantes virales, que afecten el riesgo relativo de progresión de lesiones precancerosas. Para ello resultaría necesario analizar la implicación de las variaciones no solo en el promotor viral, sino en genes virales críticos en los procesos de regulación y replicación virales y en la transformación celular.

La única variante de HPV-16 que se encontró en la población mexicana estudiada, se ubica en la rama Asiática-Americana y parece ser característica de los grupos con componente indígena en América. Esto concuerda con la composición étnica principal de la población mexicana. Si esta variante resulta tener un comportamiento biológico más agresivo, esto podría explicar, en parte, la particular incidencia de cáncer cérvico uterino en mujeres muy jóvenes, característica de la población mexicana. Por ello resultaría importante el análisis de la prevalencia de esta variante en un grupo grande de mujeres mexicanas con lesiones preneoplásicas y malignas del cérvix.

El estudio de las implicaciones de las variaciones en distintas proteínas virales en la inmunidad celular y humoral podría ser relevante para las estrategias de diseño de vacunas. Además de que daría información a considerar dependiendo de a qué población va dirigida la vacuna. Si las variantes de HPV prevalentes en determinada población son más agresivas, se debe de considerar si las variaciones repercuten en la función inmune, de manera que afecten la respuesta a una vacuna que se base en los aislados de HPV de referencia.

Los tumores de cérvix tienen un origen multifactorial y pudiera existir una gran variedad de factores que influyan en su desarrollo. De esta manera resulta muy complejo lograr observar efectos directos del oncogen *K-ras*, en la expresión de HPV en los tumores. Para poder entender el mecanismo de cooperación entre *ras* y HPV resulta necesario abordar sistemas donde se logre controlar algunas variables, lo que tal vez ayude a extrapolar a los mecanismos que ocurren en el cáncer cérvico uterino. Por otra parte, para poder establecer un papel pronóstico para el oncogen *K-ras* en los tumores de cérvix con componente glandular, es necesario analizar su prevalencia en lesiones más tempranas.

Referencias

- Androphy EJ, Hubbert NL, Schiller JT, Lowy DR: Identification of the HPV-16 E6 protein form transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J* 6:989-992, 1987. transcription factors. *EMBO J* 15:1950-1960, 1996.
- Antinore MJ, Birrer MJ, Daksha P, Nader L, McCance DJ: The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J* 15:1950-1960, 1996.
- Arends MJ, Donaldson YK, Duvall W, Wyllie AH, Bird CC: Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. *Human Pathol* 24:432-437, 1993.
- Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Stolz E, Herbrink P: Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 34:745-747, 1996.
- Baker CC, Howley PM: Differential promoter utilization by the papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J* 6:1027-1035, 1987.
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MT, Gonda MA, Howley PM: Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 61:962-971.
- Baló J, Korpássy B: Warzen, Papillome und Krebs. Johann Ambrosius Barth Verlagsbuchhandlung, Leipzig, 1936.
- Banks L, Spence P, Androphy E, Hubbert N, Matlashewski G, Murray A, Crawford L: Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinoma. *J Gen Virol* 68:1351-1359, 1987.
- Barbacid M: ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779-827, 1987.
- Bar-Sagi D, Feramisco JR: Microinjection of the ras oncogene protein into P12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 42:841-848, 1985.
- Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT: In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among HPVs of different oncogenic potential. *J Virol* 65:292-298, 1991.
- Bauknecht T, Angel P, Roger HD, zur Hausen H: Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J* 11:4607-4617, 1992.
- Barbacid M: ras genes. *Ann Rev Biochem* 56:779-827, 1987.
- Barron BA, Richart RM: A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst* 41:1343-1353, 1968.

Bedell MA, Jones KH, Laminins LA: The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *J Virol* **61**:3635-3640, 1987.

Bedell MA, Jones KH, Grossmann SR, Laimins LA: Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cell. *J Virol* **63**:1247-1255, 1989.

Benda JA: Pathology of cervical carcinoma and its prognostic implications. *Semin Oncol* **21**:3-11, 1994.

Beral V: Cancer of the cervix: A sexually transmitted infection? *Lancet* **i(865)**:1037-1040, 1974.

Berek JS, Hacker NF, Fu YS: Adenocarcinoma of the uterine cervix: histologic variables associated with lymph node metastasis and survival. *Obstet & Gynecol* **65**:46-49, 1985.

Bernard HU, Chan MM, Manos CK, Ong LL, Villa H, Delius, CL, Peyton, HM, Bauer, Wheeler CM: Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* **170**:1077-1085, 1994.

Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, García-Carrancá A: Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* **56**:640-645, 1994.

Bibbo M, Dytch SB, Alenghat E, Bartels PH, Wied GL: DNA ploidy profiles as prognostic indicators in CIN lesions. *Am J Clin Pathol* **92**:261-265, 1989.

Binétruy B, Smeal T, Karin M: Ha-ras augments c-jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**:122-127, 1991.

Ciuffo G: Innesto positivo con filtrado di verrucae volgare. *Giorn Ital Mal Venereol* **48**:12-17, 1907.

Bos JL: Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**:4682-4689, 1989.

Bosch FX, Muñoz N, de Sanjosé S, Navarro C, Moreo P, Ascunce N, González IC, Tafur L, Gili M, Larranaga I: Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: a case control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2**:415-422, 1993.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman M, Moreno V, Kurman R, Shah KV: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Can Inst* **87**:796-802, 1995.

Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Klinheinz, A, zur Hausen H: A new type of papillomavirus DNA and its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* **3**:1151-1157, 1984.

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

- Broker TR, Botchan M: Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In Botchan M, Grodzicher T, and Sharp PA (eds): *Cancer Cells, Vol 4, DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1986, pp 17-35.
- Buckley JD Doll R, Harris RWC, Vessy MP, Williams PT: Case-control study of husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. *Lancet* **ii**:1010-1014, 1981.
- Cavalli-Sforza LL, Minch E, Mountain JL: Coevolution of genes and languages revisited. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:5620-5624, 1992.
- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Dürst M, Meulen J, Villa L, Luande, Mgaya H, Bernard HU: Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* **66**:2057-2066, 1992.
- Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Mürger K, Howly OM, Phelps WC, Nevins JR: Adenovirus E1A simian virus 40 tumor antigen and human papillomavirus E7 protein share the capacity of disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:4549-4553, 1992.
- Cheng G, Icenogle JP, Kirnbauer R, Hubbert NL, St Louis ME, Han C, Svare EI, Kjaer SK, Lowy DR, Schiller T: Divergent human papillomavirus type 16 variants are serologically cross-reactive. *J Infect Dis* **172**:1584-1587, 1995.
- Chong T, Chan WK, Bernard HU: Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor 1, AP1, steroid receptor, and a possible novel transcription factor, PVF; a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res* **18**:465-470, 1990.
- Cole ST, Danos O: Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J Mol Biol* **193**:599-608, 1987.
- Coppelson LW, Brown B: Observations on a model of the biology of carcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol* **122**:127-136, 1975.
- Crook T, Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L: Human Papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in the hormone-dependent transformation of primary mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8820-8824, 1988.
- Crum CP, Mitao M, Levine RU, Silverstein S: Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J Virol* **54**:675-681, 1984.
- Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT: Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* **65**:606-612, 1991.
- DeCarpio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Pachuca E, Livingston DM: SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**:275-283, 1988.
- Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F: Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* **16**:504-514, 1997.

- de Villiers EM: Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* **63**:4898, 1989.
- deVilliers EM: Human pathogenic papillomaviruses: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* **86**:1, 1994.
- DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doninger J: Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential infection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* **4**:395-399, 1989.
- Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM: Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* **69**:7791-7799, 1995.
- Drescher CW, Hopkins MP, Roberts JA: Comparison of the pattern of metastatic spread of squamous cell cancer and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* **33**:340-343, 1989.
- Dürst M, Gissman L, Ikenberg H, zur Hausen H: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:3812-3815, 1983.
- Dürst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K: Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:1070-1074, 1987.
- Dürst M, Bosch FX, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H: Inverse relationship between human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression and cell differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV-positive human cell lines. *J Virol* **65**:796-804, 1991.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**:817-825, 1993.
- Ellis JRM, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, Stern PL: The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Medicine* **1**:465-470, 1995.
- Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Terakawa N, Tanizawa O, Rice JM: K-ras activation in neoplasm of the human female reproductive tract. *Cancer Res* **50**:6139-6145, 1990.
- Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM: K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *Amer J Pathol* **139**:777-785, 1991.
- Enomoto T, Inoue M, Perantoni A, Buzard GS, Miki H, Tanizawa O: K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Can Res* **51**:5308-5314, 1991b.
- FIGO. International Federation of Gynecology and Obstetrics. Staging announcement: FIGO staging of gynecologic cancers: cervical and vulva. *Int J Gynecol Cancer* **5**:319, 1995.

- Finney RE, Bishop JM: Predisposition to neoplastic transformation cause by gene replacement of H-ras1. *Science* **260**:1524-1527, 1993.
- Fu YS, Braun L, Shah KV, Lawrence KD, Robboy SJ: Histologic, nuclear DNA and human papillomavirus study of cervical condylomas. *Cancer* **52**:1705-1711, 1983.
- Fu YS, Huang I, Beaudenon S, Ionesco M, Barrasso R, de Brux J, Orth G: Correlative study of human papillomavirus DNA, histopathology, and morphometry in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* **7**:297-307, 1988.
- Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K: Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes* **9**:85-92, 1994.
- Furth ME, Aldrich TH, Cordon-Cardo C: Expression of ras proto-oncogene products in normal human tissues. *Oncogene* **1**:47-58, 1987.
- Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcob EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla Favera : p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:5413-5417, 1991.
- Gallup DG, Hasper RH, Stock RJ: Poot prognosis in patients with adenosquamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet & Gynecol* **65**:416-419, 1985.
- García-Carrancá A, Thierry F, Yaniv M: Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus 18. *J Virol* **63**:4321-4330, 1988.
- Gersell DJ, Mazoujian G, Mutch DG, Rudolf MA: Small-cell undifferentiated carcinoma of the cervix: A clinicopathologic, ultrastructural, and immunocytochemical study of 15 cases. *Am J Surg Pathol* **12**:684-698, 1988.
- Gissman L, zur Hausen H: Human papillomaviruses: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Nat Acad Sci* **73**:1310-1314, 1980.
- Gissman L, Wolnick L, Ikenberg H, Koldovsky K, Schnurch HG, zur Hausen H: Human papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:560-563, 1983.
- Gloss B, Gloss MY, Meisterernst M, Rogge L, Winnacker EL, Bernard HU: Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res* **9**:3519-3533, 1989.
- Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM: p53 inactivation by HPV-16 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res* **55**:4420-4424, 1995.
- Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JJ: HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* **8**:3905-3910, 1989.
- Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk R: Genetic Characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer* **60**:369-376, 1995.

- Heino P, Skyldberg B, Lehtinen M, Rantala I, Hagmanr B, Kreider JW: Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J Gen Virol* 76:1141-1153, 1995.
- Heinzel PA, Chan S-Y, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Saveria M, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H, Steinberg BM, Tay S-K, Villa LL, Bernard HU: Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* 33:1746-1754, 1995.
- Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Mitrani-Rosenbaum S, Norrild M, Pillai MR, Stoerker J, Syrjaenen K, Syrjaenen S, Tay SK, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU: The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 67:6413-6423, 1993.
- Ho L, Chan SY, Chow T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU: Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 29:1765-1772, 1991.
- Hopkins MP, Morley GW: A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet & Gynecol* 77:912-917, 1991.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM: A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10:4125-4135, 1991.
- Hwang ES, Riese DJ, Seetleman J, Nilson L, Hong J, Flynn S, Di Maio D: Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J Virol* 67:3720-3729, 1993.
- Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, Tucker RA, Rawls WE: Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 operon reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virol* 184:101-107, 1991.
- Ichikawa Y, Nishida M, Suzuki H, Yoshida S, Hajime T, Kubo T, Uchida K, Miwa M: Mutation of K-ras protooncogene is associated with histological subtypes in human mucinous ovarian tumors. *Cancer Res* 54:33-35, 1994.
- Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K: Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res* 32:583-586, 1972.
- Jewers RJ, Hilderbrandt P, Ludlow JW, Kell B, McCance DJ: Regions of human papillomavirus type 16E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol* 66:1329-1335, 1992.
- Jiko K, Tsuda H, Ssto S, Hirohashi S: Pathogenic significance of p53 and c-K-ras gene mutations and human papillomavirus DNA integration in adenocarcinoma of the uterine cervix and uterine isthmus. *Int J Cancer* 59:601-606, 1994.

- Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakufufu M, Satoh T: Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 60:349-400, 1991.
- Khosravi-Far R, Solski PA, Clark GJ, Kinch MS, Der CJ: Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol* 15:6443-6453, 1995.
- Koulos JP, Wright TC, Follen M, Silva E, Atkinson EN, Richart RM: Relationship between c-K-ras mutations, HPV types and prognostic indicators in invasive endocervical adenocarcinomas. *Gynecol. Oncol*, 48:364-369, 1993.
- Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK: Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 10:122-163, 1988.
- Krantz KE: The anatomy and the human cervix, gross and microscopic. In Blandau RJ, Moghissi K (eds): *The Biology of the Cervix*, Chicago, University of Chicago Press, 1973 pp 57-69.
- Krontiris TG, Cooper GM: Transforming activity in human tumor DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1181-1184, 1981.
- Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E, editors. Tumors of the cervix, vagina and vulva. Fascicle 4 In: Atlas of tumor pathology. Washington (DC): Armed Forces Institute of Pathology, 1992.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Arruch J, Woodgett JR: The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinases. *Nature* 369:156-160, 1994.
- Layde PM: Smoking and cervical cancer: Cause or coincidence. *JAMA* 261:1631-1632, 1989.
- Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY: Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 62:49-54, 1996.
- Leon J, Guerrero I, Pellicer A: Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* 7:1536-1540, 1987.
- Lewandowsky F, Lutz W: Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). *Arch Dermatol Syph* 141:193, 1922.
- Lisker R, Ramírez E, Pérez-Briseño R, Granados J, Babinsky V: Gene frequencies and admixture estimates in four mexican urban centers. *Human Biology* 62:791-801, 1990.
- Liu Z, Ghai J, Ostrow RS, Faras AJ: The expression levels of the human papillomavirus type 16 E7 correlate with its transforming potential. *Virol* 207:260-270, 1995.
- Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, García Carrancá A: Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Can Inst* 89:1227-1231, 1997.
- Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD: Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 79:671-676, 1987.

- Lorincz A, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster WD, Kurman RJ: Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**:328-337, 1992.
- Lowy DR, Dvoretzky I, Shober R: In vitro tumorigenic transformation by a defined subgenomic fragment of bovine papillomavirus DNA. *Nature* **287**:72-74, 1980.
- Lowy DR: Function and regulation of ras. *Ann Rev Biochem* **62**:851-891, 1993.
- Mack DH, Laimins LA: A keratinocyte-specific transcription factor KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:9102-9106, 1991.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM: The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* **7**:209-214, 1989.
- Matlashewski G, Schneider J, Banks L: Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cell. *EMBO J* **6**:1741-1746, 1987.
- May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H: The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes form cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* **13**:1460-1466, 1994.
- McLachlin CM, Tate JE, Zitz JC, Sheets EE, Crum CP: Human papillomavirus type 18 and intraepithelial lesions of the cervix. *Am J Pathol* **144**:141-147, 1994.
- McNeil C: HPV vaccine treatment trials proliferate, diversify. *J Natl Cancer Inst* **89**:280-281, 1987.
- Meyers C, Laimins LA: In vitro systems for the study and propagation of human papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**:199-215, 1994.
- Medina- Martínez O, Vallejo V, Guido MC, García-Carrancá A: H-ras oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. *Mol Carcinog* **2**:83-90, 1997.
- Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM: The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 oncoprotein. *EMBO J* **11**:5013-5020, 1992.
- Miller B, Dockter M, Eltorky M, Protopulos G: Small cell carcinoma of the cervix: a clinical and flow cytometric study. *Gynecol Oncol* **42**:27-33, 1991.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky H: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* **16**:1215-1217, 1988.
- Mittal R, Pater A, Pater MM: Multiple human papillomavirus type 16 glucocorticoid response elements functional for transformation, transient expression, and DNA protein interactions. *J Virol* **67**:5656-5659, 1993.
- Mizuuchi H, Nasim S, Kudo R, Silverberg SG, Greenhouse S, Garret CT: Clinical implications of K-ras mutations in malignant epithelial tumors of the endometrium. *Cancer Res* **52**:2777-2781, 1992.

- Münger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel RJ: The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**:4417-4421, 1989A
- Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley P: Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* **8**: 4099-4105, 1989.
- Muñoz B, Bosch FX, de Sanjosé S, Tafur I, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, González LC, Kaldor JM, Guerrero I, Lorincz A, Santamaría M, Alonso de Ruiz P, Aristizabal N, Shah K: The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* **52**: 743-749, 1992.
- Myers G, Baker C, Wheeler C, Hilpern A, McBride A, Doorbar J: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos (NM): Theoretical Biology and Biophysics Group, 1996.
- O'Hanlan KA, Goldberg GL, Jones JG, Runowicz CD, Ehrlich L, Rodríguez-Rodríguez L: Adjuvant therapy for neuroendocrine small cell carcinoma of the cervix: Review of the literature. *Gynecol Oncol* **43**:167-172, 1991.
- Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Psfister H, Tay SK, Meulen J, Villa LL, Bernard HU: Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* **67**:6424-6431, 1993.
- Pande SV, Murthy MS: A modified micro-Bradford procedure for elimination of interference from sodium dodecyl sulfate, other detergents and lipids. *Anal Biochem* **220**:424-426, 1994.
- Pao CC, Lin CY, Chang YL, Tseng CJ, Hsueh S: Human papillomaviruses and small cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* **43**:206-210, 1991.
- Parkin DM, Muir CS: Cancer incidence in five continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* **120**:45-173, 1992.
- Pfister H: Human papillomaviruses and genital cancer. *Advances Cancer Res* **48**:113-147, 1987.
- Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM: The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**:539-547, 1988.
- Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger JD, DiPaolo JA: Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* **61**:1061-1066, 1987.
- Platz CE, Benda JA: Female genital tract. *Cancer* **75**:270-294, 1995.
- Pushko P, Sasagawa T, Cuzick J, Crawford L: Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **75**:911-916, 1994.

- Qiu RG, Chen J, McCormick F, Symons M: A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:11781-11785, 1995.
- Rauscher FJ 3d, Voulalas PJ, Franza BR Jr, Curran T: Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev* **2**:1687-1699, 1988.
- Reeves WC, Brinton LA, Brenes MM, Quiroz E, Rawls WE, De Britton RC: Case control study of cervical cancer in Herrera Province, Republic of Panama. *Int J Cancer* **36**:55-60, 1985.
- Reeves WC, Brinton LA, Garcia M, Brenes NN, Herrero R, Gaitan E, Tenorio F, de Britton RC, Rawls WE: Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med* **320**:1437-1441, 1989.
- Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Husain M, Willett J, Daoud Y, Temple G, Stanhope CR, Sherman AI, Phibbs GD, Lorincz AT: Sexually transmitted papillomaviral infection. I. The anatomic distribution and pathological grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* **156**:212-227, 1987.
- Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Voorhorst FJ, Rozendaal I, Risse EKJ, Meijer CJLM, Kenemans P: The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* **61**:306-311.
- Resnick RM, Cornelisson, MTE, Wright DK, Eichen GH, Fox HS, Shegget H, Manos MM: Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Can Inst* **82**:142-149, 1990.
- Richart RM, Wright TC Jr: Controversies in the management of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* **71**:1413-1421, 1993.
- Romanczuk H, Howley PM: Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:3159-3163, 1992.
- Rumsby G, Carte RL, Gusterson BA: Low incidence of ras oncogene activation in human squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* **61**:365-368, 1990.
- Sadot E, Jaaro H, Seger R, Ginzburg I: Ras signaling pathway positive and negative regulation of tau expression in PC12 cells. *J Neurochem* **70**:428, 431, 1998.
- Santos E, Martin-Zanca P, Reddy EP, Pierotti MA, Della Porta G, Barbacid M: Malignant activation of K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* **223**:661-664, 1984.
- Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, Tada A, Furusato M, Terashima Y, Siegal GP, Parker SL, Kholer MF, Berchuck A, Boyd J: Mutation of the K-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res* **53**:1906-1910, 1993.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley P: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-1136, 1990.

- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM: The HPV-16 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**:495-505, 1993.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stanton CK, Manos M: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **85**:958-964, 1993.
- Schiller JT, Lowy DR: Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development. *Semin Cancer Biol* **7**:373-382, 1996.
- Schneider-Gädick A, Schwarz E: Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* **5**:2285-2292, 1986.
- Schneider A, Hotz M, Gissman L: Increased prevalence of human papillomavirus in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* **40**:198-201, 1987.
- Schneider A, Grubert T: Diagnosis of HPV infection by recombinant DNA technology. *Clin Obstet Gynecol* **32**:127-140, 1989.
- Schwarz E, Freese UK, Gissman L, Mayer W, Roggerbuck B, Stremlau A, zurHausen H: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**:111-114, 1985.
- Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JJ: The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* **65**:4860-4866, 1991.
- Seed B, Sheen JY: A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene* **67**:271-277, 1988.
- Seedork K, Oltersdorf T, Krämer G, Röwekamp W: Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J* **6**:139-144, 1987.
- Sheer CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**:1059-1065, 1993.
- Sheer CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependant kinases. *Genes Dev* **9**:1149-1163, 1995.
- Sheets EE, Berman ML, Hountas EK, Liao SY, DiSaia PJ: Surgically treated, early-stage neuroendocrine small-cell cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* **71**: 10-14, 1988.
- Shih C, Weinberg RA: Isolation of transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29**:161-169, 1982.
- Schütte J, Minna JD, Birrer MJ: Deregulated expression of human c-jun transforms primary embryo cells in cooperation with an activated c-Hras gene and transforms rat 1a cells as a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:2257-2261, 1989.
- Silva EG, Kott M, Ordoñez NG: Endocrine carcinoma intermediate cell type of the uterine cervix. *Cancer* **54**:1705-1713, 1984.

- Smotkin D, Wettstain OF: The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol* 61:1686-1689, 1987.
- Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Muñoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM: Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 70:3127-3136, 1996.
- Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J: Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70:6987-6993, 1996.
- Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hagashi K, Sekiya T: Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 5:1037-1043, 1990.
- Tapia R, Kuri P, Macías C, De la Garza J, Mohar A, Meneses A, Angeles A, Chávez L y Fernández R: Registro histopatológico de neoplasias malignas en México. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. México, pp. 37-42. 1996.
- Tenti P, Romanogli S, Silini E, Pellegata SN, Zappatore R, Spinillo A, Zara C, Ranzani GN, Carnavalli L: Analysis and clinical implications of K-ras gene mutations and infection with human papillomavirus types 16 and 18 in primary adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Cancer* 64:9-13, 1995.
- Thierry F, Yaniv M: The BPV1 E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J* 6:3391-3397, 1987.
- Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley PM: Two AP-1 sites binding jun B are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol* 66:3740-3748, 1992.
- Tommasino M, Adamczewski JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, Cavaliere F, Hunt T, Crawford L: HPV16E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 8:195-202, 1993.
- Trahey M, McCormick F: A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, does not affect oncogenic mutants. *Science* 238:542-545, 1987.
- Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J 3rd, Contois D, Lawler P, Rugh BB, Lorincz AT, Corrigan A, Burk RD, Qu W, Marshall MA, Mann D, Carrington M, Clerici M, Shearer GM, Carbone DP, Scott DR, Houghten RA, Berzofsky JA: Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* 56:3967-3974, 1996.
- Ulsh LS, Shih TY: Metabolic turnover of human c-ras H p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs. *Mol Cell Biol* 8:1647-1652, 1984.
- Van der Brule AC, Meijer CJL, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM: Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28:2739-2743, 1990.
- Van Nagell JR, Powell DE, Gallion HH, et al: Small cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 62:1586-1593, 1988.

- Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD: Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 73:2653-2660, 1992.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM: Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79, 1990.
- Verreault R, Chu J, Mandelson M, Shy K: A case-control study of diet and invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 43:1050-1054, 1989.
- White A, Livanos M, Tlsty TD: Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 8:666-677, 1994.
- Wigler MS, Silverstein S, Lee LS, Pellicer A, Cheng Y, Axel R: Transfer of purified herpes simplex thymidine kinase genes to cultured mouse. *Cell* 11:223-232, 1997.
- Wilczynski SP, Pearlman I, Walker J: Identification of HPV 16 early genes retained in cervical carcinomas. *Virology* 166:624-627, 1988.
- Willett GD, Kurman RJ, Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Lorincz AT: Correlation of the histological appearance of intraepithelial neoplasia of the cervix with human papillomavirus types. *Int J Gynecol Pathol* 8:18-25, 1989.
- Willis G, Jennings B, Ball RY, New EN, Gibson I: Analysis of ras point mutations and human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinomata and their metastases. *Gynecol Oncol* 49:359-364, 1993.
- Willumsen BM, Christensen A, Hubbert NL, Papageorge AG, Lowy DR: The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 310:583-586, 1984.
- Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AM: Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. *Cancer Lett* 95:29-32, 1995.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler C, Holmes KK, Kiviat NB: Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Can Inst* 89:796-802, 1997.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Muñoz N, Bosch FX, Wheeler C: Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71:2463-2462, 1997.
- Yee CL, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, SchlegelR, Howley P: Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119:361-366, 1985.
- Zhou J, Sun XY, Davies H, Crawford L, Park D, Frazer IH: Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology* 189:592-599, 1992.
- Zur Hausen H: Condyloma acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 36:530, 1976.

Zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW: Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* **13**:650, 1974.

Zur Hausen H: Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol* **78**:1-30, 1977.