

A

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

77

FACULTAD DE CIENCIAS

DISTRIBUCION DE VARIANTES DE HPV TIPOS 16 Y 18 EN LESIONES PREMALIGNAS Y MALIGNAS DEL CERVIX

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JUAN MANUEL GUTIERREZ VILLAN



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARCELA LIZANOS BERON



2003 FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

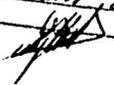
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

Permiso a la Dirección General de Bibliotecas  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso  
contenido de mi trabajo receptivo

NOMBRE: Juan Manuel  
Cardenas Villan

FECHA: 1º Abril 2003

FIRMA: 

La realización de éste trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por el  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA, México, D.F.  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, proyecto 28673M



C

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
 Facultad de Ciencias  
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

*"Distribución de variantes de HPV tipos 16 y 18 en lesiones premalignas y malignas del cérvix".*

realizado por **GUTIÉRREZ VILLÁN JUAN MANUEL**

con número de cuenta **07838606-2**, quien cubrió los créditos de la carrera de:

**BIOLOGÍA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**Atentamente**

Director de Tesis  
 Propietario

Dra. Marcela Lizano Soberón

*Marcela Lizano Soberón*

Propietario

Dr. Alejandro Manuel Garcia Carranca

*Alejandro Manuel Garcia Carranca*

Propietario

Dr. Víctor Manuel Valdés López

*Víctor Manuel Valdés López*

Suplente

Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera

*Alfonso José Vilchis Peluyera*

Suplente

M. en C. Adela Lucía Carrillo García

*Adela Lucía Carrillo García*

**FACULTAD DE CIENCIAS  
 U.N.A.M.**

**Consejo Departamental de BIOLOGIA**



*Juan Manuel Rodríguez Chávez*  
**M. en C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ CHÁVEZ**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**DEDICATORIA**

**A MIS PADRES ENRIQUE GUTIÉRREZ Y VICTORIA VILLÁN**

**QUE HAN ILUMINADO MI CAMINO PARA SABER DONDE PISAR**

**QUE ME HAN TRANSMITIDO SU SABIDURÍA**

**QUE ME BRINDARON LA OPORTUNIDAD DEL CONOCIMIENTO**

**QUE HAN AMADO A SUS HIJOS POR ENCIMA DE TODO.**

**A MIS HERMANOS.**

**EN MEMORIA DE MIS ABUELOS.**

**CON GRATITUD**

A la Dra. **MARCELA LIZANO SOBERÓN**, por la sencillez y trato cordial que la caracterizan y que son signos inequívocos de una persona sabia. Gracias por todas sus enseñanzas.

A la M. en C. **ADELA CARRILLO**, dispuesta siempre a compartir su conocimiento y brindarme su ayuda.

A **JOSE SOLANA**, por su apoyo en el trabajo de laboratorio y su amistad.

A la QFB **KARINA SOLÍS ÁVILA**, por su colaboración en la obtención de resultados.

A la Dra. **DULCE Ma. HERNÁNDEZ**, por facilitarme muestras para el análisis.

**ESPECIALES**

A mis amigos de la facultad, **ROSA MA. RAMIREZ, NORMA MILLÁN, JUAN NAVARRETE Y RUBÍ VELASCO**, por sus enseñanzas y sueños compartidos.

A mis amigos de siempre, donde quiera que estén: **ANGÉLICA ACOSTA, BETY VICENTE, GABRIELA RAMÍREZ, CRISTÓBAL GUZMÁN.**

A **GERARDO TOVAR**, por su invaluable amistad y apoyo.

A mi amiga **ESTHER BANDALA**, que hizo agradable mi estancia en el laboratorio.

A mi amiga la bióloga **AURORA MONREAL**, que siempre me impulsó a terminar el trabajo.

A dos excelentes profesores de la carrera: el Dr. Victor Manuel Valdés quien despertó mi afición a la Biología Molecular, y el Dr. Juan José de la Facultad de M.V.Z., profesor de Patología Animal. Ambos hacían de la ciencia una delicia.

A **BLANCA GARCIA** por compartir su inquebrantable deseo de aprender.

**Y ESPECIALMENTE A DIOS**, porque teniéndolo a Él en medio de nuestra vida nada nos faltará.

**GRACIAS**

T

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>CANCER: UN PROBLEMA DE SALUD PUBLICA</b>	<b>2</b>
<b>CANCER DE CERVIX</b>	<b>2</b>
<b>PAPILOMAVIRUS</b>	<b>5</b>
<b>VARIANTES MOLECULARES DE HPV<sub>s</sub> DE ALTO RIESGO</b>	<b>11</b>
<b>DIFERENCIAS EN EL POTENCIAL ONCOGENICO DE ALGUNAS VARIANTES DE HPV</b>	<b>13</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>21</b>
<b>ORIGEN DE LAS MUESTRAS</b>	<b>21</b>
<b>TIPIFICACION DE HPV<sub>s</sub> E IDENTIFICACION DE VARIANTES MOLECULARES</b>	<b>22</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>ANALISIS DE RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>FRECUENCIA DE LAS VARIANTES DE HPV 16</b>	<b>41</b>
<b>DIFERENCIAS DE EDAD DE LAS PACIENTES POSITIVAS A HPV 16</b>	<b>42</b>
<b>FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES DE HPV 18</b>	<b>45</b>
<b>DIFERENCIAS DE EDAD DE LAS PACIENTES HPV 18 POSITIVAS</b>	<b>46</b>
<b>FRECUENCIAS DE VARIANTES POR TIPOS DE CANCER</b>	<b>46</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

El cáncer cervico uterino (CaCU) constituye la primera causa de mortalidad por neoplasias entre las mujeres mexicanas. Aun cuando son varios los factores asociados al desarrollo del CaCU, estudios epidemiológicos señalan al virus del papiloma humano (HPV) como el principal agente etiológico.

Se conocen mas de 36 tipos diferentes de HPV's que infectan el tracto genital, pero el **HPV 16** es el tipo mas frecuentemente encontrado en cáncer de cérvix, apareciendo en 50% de los casos, en tanto que el **HPV 18** aparece en 10% a 20% de los casos. Estudios en distintas partes del mundo han mostrado la existencia de variantes moleculares de los HPV 16 y 18 que probablemente difieren en sus propiedades biológicas y bioquímicas. Se piensa que dichas variantes poseen diferentes grados de patogenicidad, provocando una infección persistente o la progresión hacia una enfermedad cervical invasiva. Creemos que conocer la prevalencia de variantes de HPV en muestras tanto de CaCU como de lesiones premalignas del cérvix en la población mexicana aportará información muy valiosa acerca de las posibles diferencias en el comportamiento biológico entre variantes. Ésto podría arrojar datos que permitan distinguir a las pacientes con mayor riesgo a desarrollar cáncer de acuerdo a la presencia de distintas variantes de los HPV de alto riesgo.

El interés de nuestro proyecto fue identificar las variantes de HPV 16 y HPV 18 en biopsias de CaCU de mujeres mexicanas positivas a éstos virus así como en muestras de lesiones premalignas y en tejido cervical de mujeres sanas. De ésta manera se intenta establecer alguna asociación entre las variantes encontradas y los diferentes aspectos clínico-patológicos que ayude a determinar posibles diferencias en su potencial oncogénico.

Para ello analizamos un grupo de muestras de cáncer cervical positivas a HPV 16 y HPV 18 y un grupo de muestras de lesiones premalignas y de muestras control positivas a HPV's de alto riesgo. Usando las técnicas de PCR-SSCP y la de secuenciación agrupamos las muestras en variantes y sub-variantes de los tipos 16 y 18 y encontramos datos que apuntan a la mayor agresividad de algunas de éstas variantes y sub-variantes.

La variante 1 de HPV 18 y la variante AA de HPV 16, especialmente la sub-variante AA-c, parecen tener un comportamiento más agresivo, asociado a cáncer invasor incluso en mujeres jóvenes. También podemos decir que el comportamiento biológico de la variante AA de HPV 16 podría inducir un progreso más rápido de una lesión premaligna a cáncer. Por otro lado, la variante 2 de HPV 18 parece menos agresiva pues se asocia con tumores epidermoides, que tienen un mejor pronóstico relativo que los tumores de otros tipos histológicos. Todo ello nos hace pensar que la presencia de ciertas variantes y sub-variantes en lesiones premalignas podría llegar a ser un indicador pronóstico de la lesión.

El análisis de un mayor número de muestras, y que incluya el seguimiento de pacientes, ayudará a definir con certeza a las variantes virales de mayor riesgo oncogénico.

## INTRODUCCION

### CANCER: UN PROBLEMA DE SALUD PUBLICA

El cáncer es una de las causas de mortalidad mas importantes, especialmente en las naciones tecnológicamente desarrolladas. La Organización Mundial de la Salud estima que esta enfermedad produce anualmente 6 millones de muertes en el mundo. En México se estima que 4 de cada 10 mexicanos en algún momento de su vida tendrán alguna forma de cáncer y 1 de cada 5 morirá por ésta causa. La información disponible para nuestro país confirma que el número total de pacientes con neoplasias malignas ha aumentado significativamente. En 1992, la tasa de mortalidad general por cáncer fue de 14.2 por cada 100 000 habitantes, y en 1994 había aumentado a 40 por cada 100 000 habitantes. En 1994 ocupó el 2o. lugar como causa de mortalidad general y generó 11.1% del total de muertes ocurridas en ése año (44 423). En ése mismo año se notificó un total de 62 725 casos nuevos de neoplasias malignas con predominio en el sexo femenino (64.7%). Los primeros lugares, según la topografía, sin importar el sexo, fueron: cuello del útero (23.2%), mama (10.2%), próstata (4.9%) y estómago (3.7%) (Herrera et al., 1999).

### CANCER DE CERVIX

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es un problema de salud pública en México. Es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. Se estima que cada 2 horas muere una enferma a causa de ésta neoplasia. La mayoría de las víctimas jamás se habían sometido a un estudio citológico cervicovaginal (Alcalá et al., 1999). A nivel mundial, el CaCU ocupa el 2o. lugar en frecuencia en la población femenina. Cada año se detectan cerca de 500,000 nuevos casos, de los cuales el 80% corresponden a países en vías de desarrollo (Alonso et al., 2000). Casi 200 000 muertes son atribuibles a ésta enfermedad. De acuerdo con el Registro Histopatológico de las Neoplasias, en México en 1995 se diagnosticaron 15 749 casos, los cuales constituyen 21% de 73 299 casos nuevos de neoplasias malignas en general. En el caso específico de las mujeres, el CaCU representó 33.2% de 47 456

casos nuevos, cifra que es el doble de la frecuencia del cáncer de mama, el cual se ubica en el 2o. lugar. En EU ésta neoplasia ocupa el 6o. lugar, o sea 9% de la prevalencia en general. La notable diferencia es resultado de la amplia disponibilidad y éxito de los programas de detección con citología cervicovaginal, que han contribuido a la disminución de la incidencia de cáncer invasor en los últimos 50 años (Alcalá et al., 1999). En México, el cáncer de cérvix ocupa el 4o. lugar como causa de muerte en general en la población de mujeres entre 35 y 45 años de edad (Alonso et al., 2000).

### HISTORIA NATURAL DEL CANCER DE CERVIX

Actualmente se tiene un profundo conocimiento de la historia natural de la enfermedad, conociéndose desde los cambios incipientes de una célula normal hasta su completa transformación en célula cancerosa, pasando por las diferentes etapas de transformación de epitelio normal a metaplásico a displasia leve, moderada y grave, a cáncer microinvasor y finalmente invasor. El cáncer del cuello uterino se presenta en la zona resultante de la unión de 2 epitelios: el vaginal y el endocervical. Esta zona se conoce como zona de transformación. La mayor parte de los investigadores está de acuerdo que el cambio a células premalignas y malignas sucede a lo largo de varios años. En promedio, la transformación de un epitelio normal a cáncer in situ es de 5 años y el cambio de un cáncer in situ a invasor en promedio es de 7 años (Alcalá et al., 1999).

### LESIONES PREINVASORAS

La progresión de las lesiones preinvasoras de cuello uterino implica una serie secuencial de cambios epiteliales que pueden evolucionar desde eventos fisiológicos, como la metaplasia escamosa, hasta cambios displásicos que finalmente se encaminan hacia el desarrollo de cáncer cervical. No obstante, es importante señalar que la progresión de la enfermedad puede revertirse, ya sea de manera espontánea o por medio del tratamiento oportuno de las lesiones detectadas tempranamente. Se estima que aproximadamente 5 a 15% de las displasias graves progresan a cáncer invasor dentro de un periodo de 3 años, mientras que de las neoplasias intraepiteliales leves sólo 1% progresa a cáncer invasor. La mayor frecuencia de neoplasias intraepiteliales cervicales ocurre en mujeres entre 20 y 34 años

de edad, en contraste con la del cáncer invasor cuyo pico se reporta en mujeres de 45 a 50 años. Esta diferencia entre los picos se atribuye al periodo de latencia entre el inicio de los cambios epiteliales y el desarrollo de cáncer cervical invasor (Hinojosa et al., 1999).

Todos los grados de **displasia** son lesiones **preinvasoras** que se limitan al epitelio escamoso sin rebasar la membrana basal. El concepto de "displasia cervical" comprende una serie de cambios celulares morfológicos que incluyen: atipia celular con núcleos hiperromáticos, aumento del índice de relación núcleo:citoplasma e incremento del índice mitótico. La presencia de éstos cambios en el tercio inferior, tercio medio o en el espesor completo del epitelio pavimentoso, da lugar a displasia leve, moderada o grave respectivamente. Tanto la displasia grave como el carcinoma in situ implican el reemplazo total del espesor del epitelio con células indiferenciadas. El término **Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)** se introdujo en 1970 para clasificar las lesiones en grados. Así, NIC I, NIC II y NIC III equivalen a displasias leve, moderada y grave respectivamente (Hinojosa et al., 1999).

En 1988 se propuso el sistema de clasificación "Bethesda" para lograr una mejor correlación con el pronóstico y la terapéutica y es ampliamente utilizado en la actualidad sobre todo en EU. Este sistema toma en cuenta además las alteraciones citológicas causadas por la infección del virus del papiloma humano:

**Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG).** Incluye tanto cambios celulares vinculados con la infección por HPV como displasia leve (NIC I).

**Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG).** Incluye tanto la displasia moderada (NIC II) como la displasia grave (NIC III).

**Células escamosas atípicas de significado indeterminado.** Comprenden la descripción de células que no son claramente displásicas y de cambios inflamatorios como respuesta a infecciones concomitantes (Hinojosa et al., 1999).

## CANCER DE CUELLO UTERINO

Dependiendo de la estirpe celular en que se origine, el cáncer de cérvix es de 3 tipos:

\_\_\_\_\_ introducción \_\_\_\_\_

- epidermoide o escamoso
- adenocarcinoma
- mixto o adenoescamoso

Muchos autores consideran éste último dentro de los adenocarcinomas. Existen además otras variedades histológicas menos frecuentes.

El **carcinoma epidermoide o de células escamosas** constituye 80 a 85% de los casos. Puede ser queratinizante o no queratinizante, de células pequeñas o grandes y puede mostrar diferentes grados de diferenciación.

El **adenocarcinoma** constituye el restante 15 a 20%. Se desarrolla en el conducto endocervical. Se puede presentar en diferentes variedades, por ejemplo, endometrioides, de células claras, adenoideoquístico, adenoma maligno y adenoescamoso (Alcalá et al., 1999).

Siendo muchas las causas que se asocian al desarrollo de CaCU, de acuerdo a estudios epidemiológicos un agente infeccioso parece ser el factor de riesgo más importante: el **virus del papiloma humano o papilomavirus (HPV)**. En la mayoría de los carcinomas cervicales se han encontrado genomas de tipos específicos de papilomavirus (Bosch et al., 1995). De entre ellos, el HPV 16 se ha asociado predominantemente con carcinomas de células escamosas y el HPV 18 con adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos (Bosch et al., 1995).

## PAPILOMAVIRUS

Los papilomavirus son un grupo heterogéneo de pequeños virus de ADN que inducen tumores epiteliales o fibroepiteliales de la piel o mucosa de vertebrados superiores. Estos tumores, llamados papilomas, son generalmente benignos y de limitado crecimiento. Sin embargo, ciertos miembros de la familia inducen tumores que pueden progresar a carcinomas epiteliales malignos, generalmente después de un largo período de latencia.

Los papilomavirus forman un género de la familia Papovaviridae y son partículas icosaédricas de diámetro aproximado a los 55nm. Poseen una molécula de ADN circular de

doble hebra, con un tamaño promedio de 7.8 kbp. Su clasificación se basa en el tipo de huésped y en similitud del ADN.

Los diferentes tipos de papilomavirus exhiben un rango restringido de hospederos, pero todos son estrictamente epiteliotróficos. Hasta ahora se han reportado más de 70 tipos distintos de papilomavirus humanos (Human Papillomavirus, HPV). Si bien presentan estructuras similares, muestran también una fuerte especificidad por los epitelios que infectan y el tipo de lesiones que producen. Basados en su asociación con tumores invasores, lesiones precursoras de alto grado o proliferaciones epiteliales benignas, los HPV se han clasificado en 2 categorías de riesgo oncogénico: de alto y bajo riesgo (Schiffman et al., 1993; Stoler et al., 1992). La definición original para incluir HPVs como de alto riesgo se basaba inicialmente en su frecuente presencia en cánceres cervicales y anogenitales (zur Hausen H., 1986). Posteriormente, otros hallazgos permitieron hacer más clara la distinción entre virus de alto y bajo riesgo: los HPVs de alto riesgo eran capaces de inmortalizar keratinocitos humanos (Dürst et al., 1987; Pirisi et al., 1987) mientras que los de bajo riesgo no lo hacían; oncoproteínas de HPVs de alto riesgo se unen a pRB y p53, en contraste con las oncoproteínas de HPVs de bajo riesgo (Werness et al., 1990; Dyson et al., 1989); la inducción de aberraciones cromosómicas como consecuencia de la intervención de las oncoproteínas de HPVs de alto riesgo en los mecanismos de control del ciclo celular (White et al., 1994; Demers et al., 1994; Hickman et al., 1994; Slebos et al., 1994; Kessis et al., 1993) parece ser la distinción funcional más importante entre HPVs de alto y bajo riesgo.

Se ha observado que el genoma de algunos tipos de HPV de alto riesgo se encuentra en más del 90% de las lesiones precursoras y de cáncer invasor (Boshart et al., 1984; Durst et al., 1983; Crum et al., 1984; Bosch et al., 1995).

## GENOMA DEL PAPILOMAVIRUS

Todos los papilomavirus exhiben una organización genómica similar que consiste de al menos 10 regiones potenciales de codificación de proteínas llamadas Marcos Abiertos de Lectura (ORF por sus siglas en inglés), todas ellas en la misma hebra de ADN. La otra hebra de ADN contiene solamente ORFs no conservados y se asume que no es codificante.

Los genomas de los papilomavirus pueden ser divididos en 3 regiones: 2 regiones codificantes separadas por una región no codificante de 0.4 – 1.0 kb. La región temprana E (Early) contiene los genes tempranos E1-E7 (E1-E8 en algunos papilomavirus como BPV1 del ganado bovino; Sousa et al., 1990), que poseen información necesaria para la replicación viral y la transformación celular. La región tardía L (Late) contiene los genes L1 y L2, que codifican para proteínas estructurales del virus (zur Hausen H., 1996). La región no codificante, que cubre alrededor del 10% del genoma, se localiza entre el final del ORF de L1 y el principio del ORF de E6 y exhibe rasgos característicos como regiones ricas en los nucleótidos AT, varios promotores de RNA polimerasa II, así como un sitio de unión para la proteína reguladora transcripcional de E2. Así, ésta región se involucra en el control de la expresión génica del virus y se conoce como Región Larga de Control (LCR) (Sousa et al., 1990).

La regulación de la expresión del genoma viral es compleja y está controlada por factores de transcripción virales y celulares. La mayoría de éstas regulaciones ocurren dentro de la Región Larga de Control que varía sustancialmente en su composición de nucleótidos entre tipos individuales de HPV (zur Hausen H., 1996).

#### TRANSFORMACION POR HPV

Los principales genes transformantes de los HPVs lo constituyen E6 y E7. Estudios moleculares han demostrado que las proteínas originadas de las regiones tempranas E6 y E7 de HPV 16 son capaces de immortalizar keratinocitos humanos in vitro, aunque existe buena evidencia de que además de la presencia de los productos de éstos oncogenes virales se requiere el mal funcionamiento de ciertos genes celulares como prerequisite para la immortalización (zur Hausen H., 1996). Estas proteínas virales están involucradas en la transformación maligna del epitelio cervical interactuando fuertemente con proteínas reguladoras del ciclo celular, especialmente p53 y pRb (Dyson et al., 1989; Werness et al., 1990; Von Knebel et al., 1994). Mas aún, parece necesaria una continua expresión de las oncoproteínas de E6 y E7 para mantener un fenotipo maligno (Von Knebel et al., 1988). La interacción de las oncoproteínas virales con sus blancos celulares resulta en una pérdida de la regulación normal en la progresión del ciclo celular y en la expresión de un conjunto de

genes. Estos sucesos aparentemente son críticos en el desarrollo del cáncer cervical.

### PROTEINA E6

La proteína E6 de HPV de alto riesgo posee una serie de propiedades biológicas interesantes. Cooperar con la proteína E7 en la immortalización de células humanas (Münger et al., 1989). La introducción de este gene en células mamarias humanas específicas conduce a immortalización aun en la ausencia de E7 (Band et al., 1990; Wazer et al., 1995). Una observación mas importante en relación a la función de la proteína E6 es su unión a la proteína celular p53 provocando su degradación (Scheffner et al., 1990). p53 actúa normalmente como un activador transcripcional uniéndose a secuencias específicas de ADN (Kern et al., 1991). Se requiere para detener el ciclo celular después de un daño al ADN celular (Kuerbitz et al., 1992; Lin et al., 1992). Esta función es inhibida por E6 de HPV 18 (Gu et al., 1994). La acumulación de mutaciones resultantes en el curso de subsecuentes divisiones celulares después del daño al ADN celular en presencia de p53 funcionalmente inactivo, es probablemente una condición muy importante para la selección de clones celulares con mutaciones de genes que provoquen immortalización celular (zur Hausen H., 1996).

Se reconoce también que p53 tiene propiedades supresoras de tumor (Finlay et al., 1989; Eliyahu et al., 1989). No obstante, el mal funcionamiento de p53 parece no deberse exclusivamente a su interacción con E6. El gene que codifica a p53 se ha encontrado mutado en líneas celulares cancerosas HPV negativas (C-33 y HT-3) (Scheffner et al., 1991). Esto apoya la hipótesis de que la inactivación de las funciones normales de p53, ya sea por mutación o por la interacción con E6, es un paso importante en la carcinogénesis cervical humana.

Ha sido demostrado que variantes E6 de HPV 16 difieren en sus propiedades biológicas y bioquímicas, y se piensa que esto se refleja en diferencias en su patogenicidad (Stöppler et al., 1996). Se ha encontrado que algunas variantes E6 de HPV 16 están presentes mas comúnmente en carcinoma cervical invasivo (hasta en 94%), sugiriéndose que las variantes de E6, especialmente aquéllas que contienen una sustitución en el residuo 83, pueden ser mas oncogénicas que la prototipo y conllevan entonces un mayor riesgo para el desarrollo

de cáncer (Zehbe et al., 1998).

### PROTEINA E7

Las proteínas E7 de los virus de alto riesgo contribuyen a la progresión oncogénica mediante su interacción con la proteína de susceptibilidad a retinoblastoma (pRb). La afinidad de E7 por pRb en los HPV de alto riesgo es 10 veces mayor que la mostrada en HPV de bajo riesgo (Huibregtse et al., 1994). La interacción E7/pRb libera el factor de transcripción E2F del complejo con pRb y se activa la transcripción de genes que regulan la proliferación celular (Chapellapan et al., 1992). E7 sola puede transformar células de roedor establecidas tales como NIH 3T3 (Kanda et al., 1988; Phelps et al., 1988; Vousden et al., 1988; Watanabe S. & Yoshiike K., 1988; Bedell et al., 1989; Tanaka et al., 1989) y puede cooperar con el oncogene *ras* activado para transformar células primarias de rata (Phelps et al., 1988). La unión de pRb a oncoproteínas virales parece inactivar la actividad supresora de tumor de pRb. En retinoblastomas humanos y otros cánceres esporádicos, se han encontrado mutaciones en regiones involucradas en la unión con las oncoproteínas virales (Hu et al., 1990; Huang et al., 1990). Las formas mutadas de pRb no se unen con las oncoproteínas virales en células tumorales, sugiriendo que pueden ser deficientes en su habilidad para unirse con sus blancos celulares normales (Hu et al., 1990; Huang et al., 1990; Kaye et al., 1990). En estudios con biopsias de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical y cáncer invasor se ha encontrado que las variaciones en E7 de HPV 16 son extremadamente raras (4% en NIC III y 6% en cáncer cervical) (Zehbe et al., 1998). Esto sugiere que E7 en HPV 16 está altamente conservado y que su estructura terciaria no tolera sustituciones aminoácidas.

### PROTEINA E2

Los productos de los genes E2 de papilomavirus son proteínas reguladoras importantes involucradas en el control de la replicación y la transcripción del ADN de HPV (revisado en Ham et al., 1991; McBride et al., 1991). El marco de lectura abierto (ORF) de E2 codifica al menos 2 (posiblemente 3) proteínas diferentes, todas ellas actuando como

factores de transcripción (Bouvard et al., 1994). Experimentos in vitro han demostrado que los promotores de HPV 16 y HPV 18 (P97 y P105 respectivamente) que regulan la transcripción de los genes E6 y E7 son a su vez regulados por la proteína viral E2. Esta proteína se une como un dímero a sus sitios de reconocimiento palindrómico en LCR y puede reprimir o activar la expresión de E6 y E7 dependiendo de la concentración de E2 (Dostatni et al., 1991; Steger G. & Corbach S., 1997; Tan et al., 1994). Se reporta que la integración del ADN viral en el genoma hospedero ocurre en la región ORF de E1 y E2, con consecuente delección o disrupción de estos genes (Choo et al., 1987; Das et al., 1992; El Awady et al., 1987) en la mayoría de los cánceres cervicales y menos comúnmente en lesiones premalignas (Cullen et al., 1991; Das et al., 1992). Existe entonces la hipótesis de que la pérdida de la integridad del gen E2 durante la integración resulta en desrepresión de la transcripción de los genes E6 y E7 y la sobre-expresión de sus productos. Mas aún, se sugiere un papel mayor de E2 en el cáncer debido a la observación de que la introducción del gen E2 de BPV en líneas celulares cancerosas no sólo decrece la expresión de E6 y E7, sino que también decrece la proliferación celular (Hwang et al., 1993). Por otro lado, se piensa que el aumento en la expresión de los genes E6 y E7 puede también ser debido a la presencia de un gran número de copias del genoma, aún en ausencia de integración viral (Berúmen et al., 1994). El papel funcional de E2 en la patogénesis de la enfermedad no es todavía claro. El gen E2 intacto es frecuentemente detectable en cánceres positivos a HPV 16 o HPV 18 (Matsukura et al., 1989; Cullen et al., 1991), aunque su estado físico (episomal o integrado) es usualmente desconocido. Una noción ampliamente difundida es la de que los carcinomas cervicales infectados con HPV 18 contienen ADN del HPV sólo en su forma integrada (Berumen et al., 1994; Cullen et al., 1991), en contraste a los tumores infectados por HPV 16 en donde el ADN del HPV puede estar en forma integrada o episomal (Das et al., 1992). De hecho, se ha sugerido que la naturaleza agresiva de los cánceres infectados con HPV 18 puede estar relacionada a los consistentes patrones de integración del ADN viral debido a una pérdida mas completa de E2 y por tanto una mayor desregulación de E6 y E7 (Cullen et al., 1991). Hecht et al., (1995), encontraron la pérdida de E2 de HPV 18 en muestras de cáncer de mujeres jóvenes

(en sus 30s), pero pudieron amplificar E2 en muestras de cáncer de mujeres en sus 60s, sugiriendo que la disrupción de E2 no es esencial para el desarrollo de cáncer y que la pérdida de E2 es un factor que puede actuar reduciendo el número de eventos tiempo-dependientes que podrían ser requeridos para la oncogénesis en presencia de E2. Terry et al., (1997), también encontraron algo similar en muestras con HPV 16, amplificando secuencias completas de E2 en 86% de muestras de cáncer, concluyendo que la disrupción del ORF de E2 no es un pre-requisito para el desarrollo de cáncer cervical.

### VARIANTES MOLECULARES DE HPV<sub>s</sub> DE ALTO RIESGO

Estudios de variación entre genomas de aislados de papilomavirus de especímenes clínicos de todo el mundo han permitido la construcción de árboles filogenéticos de tipos virales relacionados (Ho et al., 1993; Ong et al., 1993); dentro de un tipo específico, variantes y subtipos filogenéticamente relacionados tienen alteraciones en común en sus bases nucleotídicas, tanto en regiones codificantes como no codificantes del genoma. Durante la Conferencia Anual en Papilomavirus 1995 llevada a cabo en la ciudad de Quebec se acordó que diferencias mayores al 10% en la región ORF de L1 de HPV<sub>s</sub> respecto a prototipos establecidos se considerarían como nuevos tipos (zur Hausen H., 1996).

Antes ya se había acordado que los genomas de aislados que difiriesen entre un 2% y un 10% respecto del genoma de un tipo establecido se considerarían como subtipos (Van Ranst et al., 1992). Si la variación era menor al 2% entonces se considerarían como variantes (Bernard et al., 1994). Datos de secuenciación de ácidos nucleicos demuestran que existen muchas variantes naturales de HPV (Yamada et al., 1997) y algunas de éstas están asociadas con cambios en aminoácidos en dominios funcionales y/o antigénicos responsables de introducir propiedades biológicas e inmunológicas únicas que confieren diferencias en comportamiento.

Se conocen mas de 36 tipos diferentes de HPV<sub>s</sub> que infectan el tracto genital (Bernard et al., 1994). Un estudio a nivel mundial que analizo mas de 1000 tumores invasores de cérvix reveló la presencia de algún tipo de HPV en mas del 93% de las muestras (Bosch et al., 1995), siendo el HPV 16 el de mayor prevalencia (cerca del 50% de los casos), seguido por los HPV<sub>s</sub> 18, 31 y 45. Mediante comparaciones en las secuencias de nucleótidos se ha

podido reconstruir la dispersión de éstos virus en las poblaciones humanas (Bernard et al., 1994a). A pesar de la enorme heterogeneidad de éste grupo de virus, sus cambios mutacionales parecen ocurrir a muy baja frecuencia, indicando diversificación de tipos ya en tiempos prehistóricos (zur Hausen H., 1996). Esta antigua dispersión de éstos virus y sus bajos ritmos de evolución sugieren que los HPVs han co-evolucionado junto con sus hospederos naturales durante un período de varios millones de años. Así, datos obtenidos de 25 diferentes regiones geográficas en el mundo permitieron establecer en un principio que el HPV 16 ha evolucionado en 5 ramas mayores: Europea (E), Africana (Af) (2 ramas), Asiática (As) y Asiática Americana (AA) (Ho, et al, 1993). Esta filogenia, inferida por Ho y colaboradores, se basó en el análisis de secuencias nucleotídicas en fragmentos de LCR, que es una región no codificante que regula la transcripción y contiene el origen de la replicación. La región LCR se dice que es hipervariable, pues se sabe que las secuencias genómicas no-codificantes divergen más que las codificantes. Se ha observado que la LCR varía de modo importante entre los diferentes tipos de HPV, sin por ello perder su funcionalidad (Chong et al., 1990). Una sexta rama se estableció posteriormente, la Norteamericana (NA1), estrechamente relacionada con la Asiática-Americana (Yamada et al., 1995).

Los estudios de Yamada et al., (1995), basados en secuenciaciones del genoma de las regiones LCR y ORF de L1, L2 y E6 de muestras de cérvix de sujetos enrolados en investigaciones epidemiológicas en Estados Unidos de Norteamérica, señalan que la mayoría de las mutaciones separan las variantes en 2 grandes grupos: uno que contiene todos los aislados europeos (E) y otro que contiene todos los aislados de AA, Af1, Af2 y NA1. El punto medio del árbol corresponde al probable ancestro de HPV. El genoma de referencia de HPV 16 es un aislado alemán miembro del linaje Europeo (Ho et al., 1991; Ho et al., 1993; Seedorf et al., 1985). La región L2 es la que más variaciones presenta en comparación con las otras regiones codificantes, y es tan variada como la LCR. Los cambios básicamente se presentan en la región carboxilo terminal del ORF de L2, en tanto que la amino terminal se presenta extremadamente conservada (Yamada et al., 1995).

Un estudio posterior de Yamada y cols. (1997) analizando tumores colectados de 22 países diferentes en los 5 continentes, pudo establecer un mapa más claro de la distribución de

éstas variantes (fig. 1): la variante Europea (**E**), que predomina en Europa y Norteamérica; las Africanas (**Af1** y **Af2**) que predominan en Africa; la variante asiática (**As**) que fue encontrada principalmente en el sureste de Asia y la Asiática-Americana (**AA**) agrupada en centro y sudamérica, así como en Europa (principalmente en España), a donde pudo haber entrado a través de los conquistadores españoles que regresaban de América (Yamada et al., 1997). Los patrones de migración humana han sido también un factor importante en la distribución geográfica del HPV.

Con respecto al HPV 18 se han detectado 3 ramas filogenéticas principales: Europea, Africana y Asiática/Amerindia (Ong et al., 1993) (fig. 2). El genoma de referencia de HPV 18 pertenece a la rama Asiática/Amerindia.

De acuerdo a éstos estudios, se observa que la diversidad viral se correlaciona con las poblaciones étnicamente homogéneas mas que con la ubicación geográfica y que la filogenia de las ramas principales de los HPV 16 y 18 se asocia con las ramas principales de la evolución de los grupos étnicos (Cavalli-Sforza et al., 1992).

#### DIFERENCIAS EN EL POTENCIAL ONCOGENICO DE ALGUNAS VARIANTES DE HPV

Las lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado son las que tienen mas probabilidad de progresar hacia cáncer cervical. No obstante, la mayoría de las lesiones NIC sin tratamiento observan regresión natural, demostrándose que la mayoría de los individuos son capaces de generar una respuesta inmune específica efectiva contra HPV. Algunos estudios han sugerido que las diferentes variantes de los HPVs presentan diferente comportamiento biológico y por tanto diferente grado de asociación con lesiones cervicales. Esta asociación, si causal, podría explicarse por diferencias en la regulación de la transcripción del virus en diferentes variantes, en las actividades biológicas de las proteínas codificadas por las diferentes variantes, o en la habilidad del huésped para responder inmunológicamente a epítopos virales específicos codificados por las variantes (Hildesheim et al., 2001). Varios investigadores han reportado diferencias en los comportamientos de las variantes asociándolas con diferentes lesiones cervicales, aunque algunos otros no han encontrado una correlación entre la variante y el tipo de lesión.

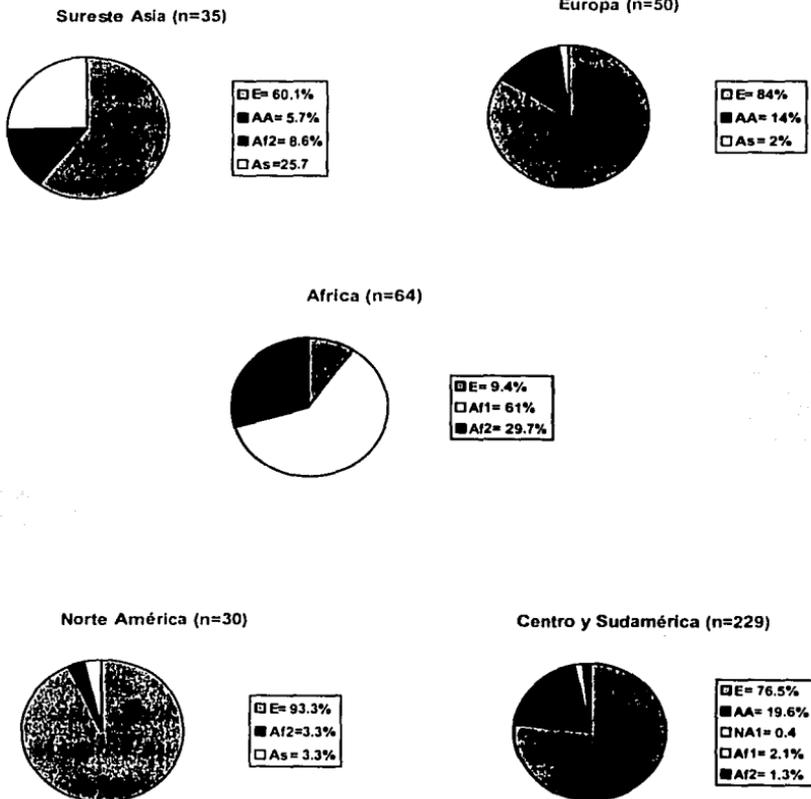


Figura 1. DISTRIBUCION DE VARIANTES DE HPV 16 POR CONTINENTES  
Modificado de Yamada et al, 1997

\_\_\_\_\_ introducción \_\_\_\_\_

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

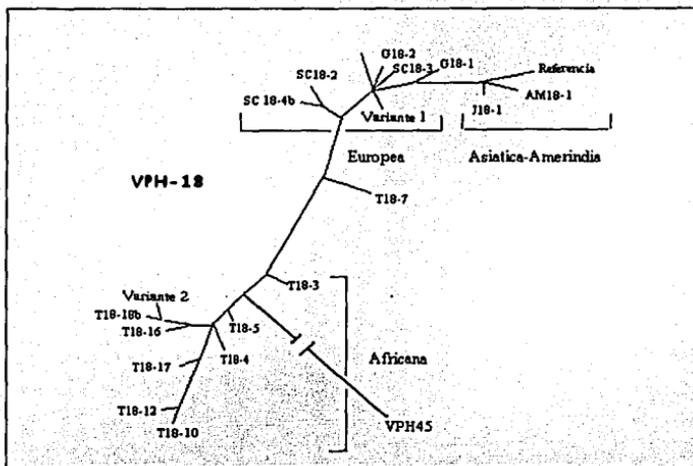


Figura 2. Mapa filogenético del HPV 18 (tomado de Ong et al, 1993)

Londesborough y su grupo, estudiando variabilidad genética en el gen E6 de HPV 16 en mujeres en Inglaterra, describieron una sustitución G por una T en el nt 350 de la variante Europea (E-350G, denominada L83V pues cambia una Leucina por una Valina en el aa 83) sorprendentemente asociada con persistencia del virus y riesgo de neoplasia cervical (Londesborough et al., 1996). Ellos encontraron que 10 de 12 mujeres infectadas con ésta variante de E6 de HPV 16 desarrollaron NIC III independientemente de su status morfológico inicial, comparado con sólo 1 de 16 mujeres infectadas con la prototipo. Zehbe y cols. reportaron resultados similares al encontrar que 94% de muestras con carcinoma cervical invasivo presentaron casi exclusivamente variantes E6 de HPV 16 y raramente el prototipo (6%), mientras que en NIC III se encontró una distribución mas uniforme de variantes (56%) y prototipo (44%). Aquí, la variación mas frecuente de E6 fue encontrada también en el residuo 83 (Zehbe et al., 1998). Es interesante mencionar que 2 líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales, Caski y SiHa, también contienen este

polimorfismo L83V. Mas aún, en mujeres con cáncer cervical invasivo en Centro y Sudamérica, el cambio en E6 de L83V se encontró significativamente incrementado comparado con la variante prototipo (Yamada et al., 1997). Esto podría indicar que las variantes E6 HPV 16, especialmente aquéllas conteniendo la sustitución en el residuo 83 (L83V), pueden ser mas oncogénicas que la prototipo y por tanto representar un mayor riesgo para el desarrollo de cáncer invasivo. No se sabe aún como éstas sustituciones específicas en aminoácidos afectan las propiedades biológicas de las proteínas, pero se cree que son posiciones importantes en el reconocimiento inmune del huésped. Hildesheim A. reportó resultados que asegura proporcionan evidencia epidemiológica de que diferentes variantes de HPV 16 tienen diferente potencial oncogénico. De acuerdo a su estudio, las mujeres infectadas con variantes NE (non-European) de HPV 16 tienen 11 veces mas probabilidades de ser diagnosticadas con cáncer cervical que aquéllas infectadas con la prototipo, concluyendo que el riesgo asociado con la infección de variantes NE es en verdad grande (Hildesheim et al., 2001). Otro estudio reportó un cambio en el nt 647 de E7 de HPV 16 mas frecuentemente encontrado en carcinomas cervicales (Song et al., 1997). Xi y su grupo observaron que variantes NPL (non-prototype-like) de HPV 16 estuvieron mas fuertemente asociadas con el desarrollo de lesiones cervicales que las variantes PL (prototype-like) (Xi et al., 1997). Algo similar se observó en una serie de carcinomas anales donde variantes NPL eran mas prevalentes que las PL (Xi et al., 1998). Villa y cols. parecen corroborar los resultados encontrados por Xi en 1997. Encontraron que infecciones con variantes de la rama no-Europea de HPV 16 y 18 tienen una tendencia general a persistir mas frecuentemente y estar mas asociadas con lesiones pre-invasivas (Villa et al., 2000). Ellis et al., (1995), describieron una variante de HPV 16 con una sola sustitución en el nt 131 del oncogene E6 (A por T) que normalmente fue encontrado en un grupo de mujeres HLA-B7 (Human Leukocyte Antigen) positivas con cáncer cervical. El genotipo HLA-B7 se ha asociado con un pronóstico más pobre en estas pacientes. Se ha sugerido que, tanto la baja regulación de HLA-B7 vista en células tumorales como su asociación con la variante de HPV 16, contribuyen a la evasión de la respuesta inmune. Stöppler et al., (1996), encontraron una correlación directa entre la actividad biológica de las proteínas de variantes E6 de HPV 16 y sus habilidades para inducir degradación in vitro de p53, lo que

sugiere que variantes naturales de HPV 16 pueden tener diferencias en patogenicidad. Una variante Af2 presentó la menor actividad en la degradación de p53, en tanto que una variante AA presentó la mayor actividad. Lizano M. y su grupo observaron que en carcinomas de células escamosas la variante AA de HPV 16 estuvo presente sólo en un grupo de muestras de mujeres de 28 a 40 años de edad, mientras que la clona de referencia estuvo presente en una alta proporción en el grupo de 40 a 55 años (6 de 8 individuos con la clona de referencia tenían de 41 a 55 años; los otros 2 eran menores de 40 años). En otras palabras, 5 de 7 mujeres entre 28-40 años con carcinoma de células escamosas tenían la variante, mientras que 0 de 6 mayores de 40 y hasta 55 tenían la variante. Esto sugiere que la variante de HPV 16 encontrada en la población mexicana y aparentemente característica de las mujeres amerindias puede representar una variante de alto riesgo. Esto podría explicar, al menos en parte, la alta incidencia de cáncer cervical observada entre las mujeres latinoamericanas (Lizano et al., 1997). Otro hallazgo importante de Lizano y su grupo fue la asociación aparentemente exclusiva entre la variante 2 de HPV 18 y el carcinoma de células escamosas, en contraste con la clona de referencia, asociada con todos los otros tipos histológicos excepto éste. La otra variante de HPV 18 (variante 1) se observó en todos los tipos histológicos excepto en carcinoma de células escamosas. El hecho de que la variante 2 de HPV 18 se encontrara exclusivamente en carcinomas de células escamosas sugiere que este aislado puede estar asociado a un comportamiento menos agresivo, puesto que éste grupo de tumores tiene un pronóstico relativo mejor que el de adenocarcinomas o carcinomas adenoescamosos. Otro estudio encontró 3.3 y 2.8 veces mayor actividad en el promotor P97 de las variantes AAc y NA1 respectivamente comparado con la variante Europea de referencia, en tanto que las variantes Af1a y Af2a exhibieron actividades de P97 similares a la E de referencia (Kämmer et al., 2000). Parece que el incremento en la actividad de p97 puede ser atribuido a las variantes AAc en general. Xi et al., (1997), demostraron un incremento en la tendencia de la progresión en infecciones con variantes no prototipo tales como la AAc. Este mayor potencial oncogénico de las variantes AA podría atribuirse entonces tanto a las diferencias en la actividad biológica de la proteína E6 como a una sobre-regulación del promotor P97. Comparando todas las variaciones en secuencias en la parte E6 proximal de LCR entre las variantes mas activas y las menos activas, Kämmer

y su grupo (2000) identificaron una sola sustitución en el nt 7729 (Citosina en lugar de Adenina), restringida a AAc y NA1. Con la ayuda de mutagénesis sitio-dirigida, la transición A/C en el nt 7729 fue revertida en AAc y NA1 dejando el resto de la cadena intacta y encontraron que la actividad de Mut-AAc y Mut-NA1 se redujo en comparación con los clones originales, obteniéndose niveles de expresión similares a la Europea. Bible y su grupo (2000) también encontraron diferencias entre variantes con el gen E5 de HPV 16 mutado. Sus resultados muestran que una variante, que denominaron variante 2 RFLP de HPV 16 (caracterizada por pérdida del sitio Sspl), está asociada predominantemente con neoplasia cervical y con actividad transcripcional alta. Hecht y cols. (1995) reportan un subtipo de HPV 18 encontrado en sus muestras con una oncogenicidad disminuida. Este subtipo se encontró en más del 40% de las muestras con NIC, pero no se encontró entre los casos de cáncer. Recientemente, Berumen y su grupo encontraron que la frecuencia de variantes AA de HPV 16 en muestras cervicales de pacientes con cáncer fue 21 veces mayor a la encontrada en muestras control, en tanto que la diferencia con variantes E fue de sólo 2.1 veces en el mismo sentido (Berumen et al., 2001). También reportan que las pacientes AA positivas eran en promedio 7.7 años más jóvenes que las pacientes E positivas y que las variantes AA se asociaron con carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas, en tanto que las variantes E sólo con carcinomas de células escamosas. Pareciera ser entonces que las variantes AA son más oncogénicas que las variantes E. Sin embargo, otros investigadores no han encontrado resultados que apoyen las asociaciones de diferentes variantes con diferentes grados de lesiones. Luxton et al., concluyen que una variante E6 de HPV 16 no juega un papel importante en la patogénesis de HPV 16 en relación a la enfermedad cervical en mujeres del área del sur de Londres (Luxton et al., 2000). Esto es interesante pues se trata de la misma variante que Ellis y su grupo (1997) habían reportado con un 30% de incidencia entre mujeres con anomalías citológicas persistentes. Luxton sólo reporta una incidencia de 3% (3 de 95 muestras, 2 con histología normal y 1 con NIC II), en tanto que encuentra la variante prototipo en 97% (92 de 95 muestras). Un tercio de las muestras estudiadas procedían de displasia de alto grado. La prevalencia de tales variantes probablemente sea afectada por locaciones geográficas y por tanto el origen étnico de los pacientes puede ser un factor importante.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que el cáncer cervicouterino es la principal causa de muerte por cáncer entre mujeres en México, es imperiosa la necesidad de entender mejor los factores que intervienen en el desarrollo de ésta enfermedad y así poder encontrar mejores formas de combatirla o de evitar su aparición.

Se conoce muy bien la asociación que existe entre ciertos tipos del virus del papiloma humano (HPV) y el cáncer de cérvix. También se postula que las variantes de éstos tipos, principalmente de HPV 16 y 18, tienen comportamientos biológicos diferentes. Es importante entonces conocer la distribución de éstas variantes en la población mexicana y determinar si están asociadas a un mayor riesgo en el desarrollo del CaCU. Así también es importante conocer la presencia de éstas variantes en las diferentes etapas de la lesión del cérvix que finalmente llevan a la aparición de la lesión cancerosa. El conocimiento de todo lo relacionado con las variantes de éstos tipos virales puede ser fundamental para la elaboración de vacunas dirigidas a una población determinada.

## OBJETIVOS

### General:

Conocer la distribución de variantes de HPV 16 y HPV 18 asociadas a neoplasias del cérvix en México: en tejido cervical de mujeres sanas, en lesiones premalignas y en cáncer invasor.

### Específicos:

- Determinar la distribución de variantes de los tipos HPV 16 y 18 en muestras de CaCU previamente seleccionadas por su positividad a éstos tipos virales.
- Determinar la distribución de todos los tipos de HPV en muestras provenientes de mujeres sanas o con lesiones premalignas, seleccionadas por su positividad al método de captura híbrida para los tipos de alto riesgo.
- En éste mismo grupo, determinar la distribución de variantes de HPVs 16 y 18.
- Determinar la eficacia del método de SSCP para detectar tanto tipos como variantes de HPV.
- Tratar de establecer alguna asociación entre las variantes encontradas y los diferentes aspectos clínico-patológicos que ayude a determinar posibles diferencias en su potencial oncogénico.

## MATERIAL Y METODOS

### ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Un primer grupo consistió de un total de 87 muestras de ADN procedentes de biopsias de cáncer de cérvix tomadas a pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (Tabla 1) y que habían resultado positivas a HPV 16 o HPV 18 (Carrillo A., Tesis de Maestría, 2001 pg 44) mediante PCR con los juegos de oligonucleótidos E6/E7.

	HPV 16 (n=67)	HPV 18 (n=20)
epidermoides	56	13
adenocarcinomas	3	4
adenoescamosos	7	2
diagnóstico incierto	1	1

Tabla 1. Grupo de muestras de cáncer y su diagnóstico.

El segundo grupo consistió de 114 muestras de cérvix, 79 con diagnóstico de NIC I a NIC III tomadas a pacientes que acudieron al Servicio de Patología y Colposcopia del Tracto Genital Inferior Femenino de un hospital de tercer nivel de atención médica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y 35 muestras con citología aparentemente normal (sin alteraciones de NIC o cáncer) tomadas a mujeres que acudieron a una unidad de primer nivel de atención médica del IMSS (grupo control) (Tabla 3). Todas estas muestras fueron tomadas en el periodo comprendido entre octubre de 1998 a enero del 2000.

A este segundo grupo se le diagnosticó la presencia de HPV de alto riesgo mediante la técnica de captura de híbridos (Prueba de Captura de Híbridos II de ADN de HPV, Digene Corp). Esta técnica indica la presencia de HPV de alto riesgo pero no el tipo específico.

#### Captura de Híbridos

La captura de híbridos es un ensayo comercial basado en la hibridación de ADN blanco con ARN de prueba y en su posterior detección quimioluminiscente, y se basa en 5 pasos

simples:

- 1- Liberación y desnaturalización del ácido nucleico de especímenes clínicos vaginales o cervicales.
- 2- Hibridación del ADN blanco liberado con ARN de prueba para crear híbridos ARN-ADN.
- 3- Captura de los híbridos ARN-ADN en una fase sólida por un anticuerpo específico para los híbridos.
- 4- Marcado de los híbridos capturados con múltiples conjugados de anticuerpos.
- 5- Un sustrato quimioluminiscente produce entonces luz que es medida en un luminómetro. La cantidad de luz generada es proporcional a la cantidad de ADN blanco en el espécimen original.

#### **Extracción de ADN de las muestras de captura de híbridos**

La extracción del ADN de las muestras tomadas mediante la técnica de captura de híbridos se realizó de acuerdo a lo descrito por Miller y col. (1988):

- Tomar 500 ul de la muestra previamente tratada para captura híbrida.
- Añadir 500 ul de buffer de lisis (Tris.Cl 10 mM pH 8, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5%, proteinasa K 200 µg/ml, RNAsa 20 µg/ml).
- Incubar a 55°C durante toda la noche.
- Extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol al 100% y acetato de amonio de acuerdo a lo descrito por Sambrook et al (1989).

#### **TIPIFICACION DE HPV'S E IDENTIFICACION DE VARIANTES MOLECULARES**

##### **PCR como técnica de tipificación de HPV**

La técnica de PCR (polymerase chain reaction) fue usada para amplificar una región blanco del ADN viral contenido en las muestras. La amplificación requiere la presencia de un par de oligonucleótidos complementarios a los extremos de la región blanco en cuestión, tanto el extremo 5' como el 3'. Estos oligonucleótidos son conocidos como "primers". La

\_\_\_\_\_ material y métodos \_\_\_\_\_

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

amplificación se lleva a cabo a través de ciclos repetidos de desnaturalización del ADN blanco, hibridación del primer y elongación del ADN.

Posterior a la **desnaturalización** del ADN (que permite la apertura de la doble hebra) los primers de amplificación **hibridizan** con sus secuencias complementarias de ADN. La ADN polimerasa usa entonces el ADN como molde para extender cada hebra a partir del primer. La repetición de éstos ciclos provee un acumulado de la secuencia blanco, pudiéndose obtener aproximadamente 1  $\mu$ g de ADN.

### Ensayos de PCR-SSCP.

#### Amplificación de fragmentos virales de ADN mediante ensayos de PCR con d-CTP P<sup>32</sup>

Las muestras se sometieron a reacción de PCR para amplificar una región blanco del ADN viral y poder después identificar el tipo o variante de HPV presente mediante la técnica de Polimorfismo conformacional de cadena sencilla o SSCP (del inglés Single-Strand Conformation Polymorphism).

En la reacción de PCR se incluyó un nucleótido radiactivo (d-CTP P<sup>32</sup>) para lograr su incorporación en la cadena de ADN viral y se llevó a cabo usando aproximadamente 60-200 ng de ADN por tubo de reacción de 10  $\mu$ l (tabla 2). Se utilizaron los juegos de oligonucleótidos universales GP5+/GP6+ (van der Brule, 1990) que amplifican una región de 140 pb del ORF del gen L1 de HPV, nucleótidos 6624-6765:

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
GP5+	5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3'
GP6+	5'GAAAAATAAACTGTAATCATATTC3'

Se usó una temperatura media (TM) de 43°C. Se incluyó 0.1  $\mu$ l de d-CTP P<sup>32</sup> en cada tubo de reacción de 10  $\mu$ l.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### DESNATURALIZACION INICIAL

10 minutos                      94°C

### REACCION DE AMPLIFICACION (38 ciclos)

Desnaturalización	40 segundos	94°C
Hibridación	1 minuto	43°C
Extensión	40 segundos	72°C

### EXTENSION FINAL

10 minutos                      72°C

La reacción de amplificación se llevó a cabo usando un termociclador Perkin Elmer modelo 480 programado para 38 ciclos. Al término de la reacción se añadieron 2 µl de solución stop (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul bromofenol, 0.05% xilencianol FF) a cada uno de los tubos de reacción.

REACTIVO	CONCENTRACION FINAL
Buffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
dATP	200 µM
dGTP	200 µM
dTTP	200 µM
dCTP	25 µM
dCTP <sup>32</sup>	1 µCi/muestra
GP5+	10 pM
GP6+	10 pM
AmpliTaq Gold (Perkin Elmer)	0.1 U/muestra

Tabla 2. Condiciones de reacción de PCR (10 µl)

El siguiente paso para tipificar el HPV de las muestras se hizo mediante la técnica de SSCP. Esta técnica se basa en el principio de que las moléculas de ADN de hebra simple toman estructuras secundarias específicas (conformómeros) de acuerdo a su secuencia de nucleótidos. Esta estructura secundaria está determinada por el balance entre fluctuaciones

material y métodos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

térmicas y fuerzas estabilizadoras débiles tales como apareamientos cortos intracatenarios entre bases (Orita et al., 1989). Moléculas de ADN de hasta 1000 pares de bases que difieren aún en un solo nucleótido pueden formar diferentes conformómeros que migran diferencialmente en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida cuando se someten a electroforesis (fig. 3). Este método fue primeramente reportado por Orita y cols. en 1989 describiéndolo como una técnica capaz de detectar alteraciones genéticas pequeñas, particularmente mutaciones puntuales (Orita et al., 1989).

Se ha observado que varios factores pueden afectar la sensibilidad de la técnica, tales como temperatura, composición del gel, fuerza iónica, aditivos adicionados al gel (glicerol), entre otros (Glavac et al., 1993). De éstos, el factor mejor entendido es el tamaño del fragmento de ADN. Varios estudios han reportado un decremento en la sensibilidad con el incremento del tamaño del fragmento (Sarkar et al., 1992; Sheffield et al., 1993), sugiriéndose que un fragmento menor a 200 pb es el que mejores resultados produce.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

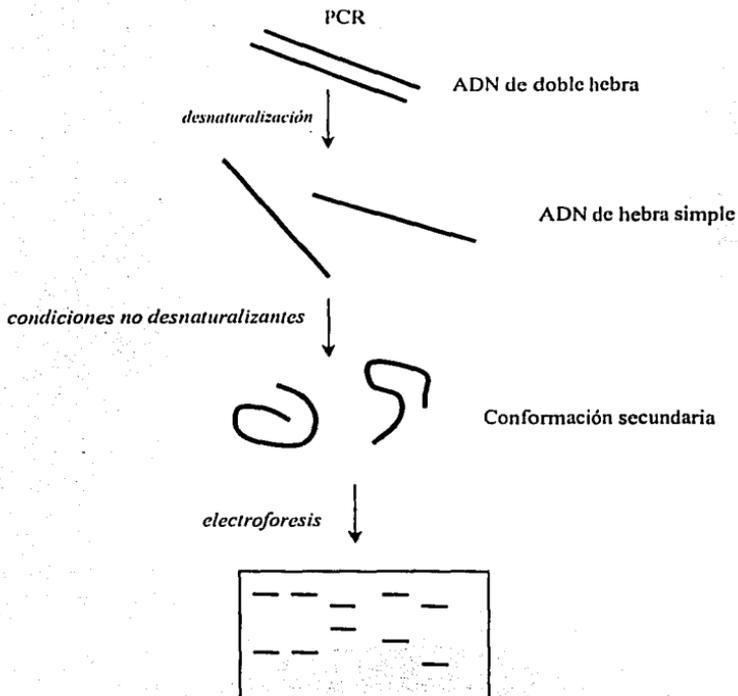


Figura 3- Principio de la técnica de SSCP

### Electroforesis

Para la electroforesis se utilizó un gel no desnaturante de acrilamida al 6% de una solución stock de acrilamida/bisacrilamida (19:1)/TBE. Se tomó 1  $\mu$ l del producto de cada tubo de reacción y se diluyó en 13  $\mu$ l de la misma solución stop. Los tubos se calentaron a 95°C durante 10-15 minutos para su desnaturalización y después fueron rápidamente

\_\_\_\_\_ material y métodos \_\_\_\_\_

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

colocados en hielo. También se incluyeron controles positivos para HPV 16 y HPV 18, tanto de las clonas de referencia (tomadas de ADN extraído de las líneas celulares Caski y Hela, positivas a HPV 18 y HPV 16 respectivamente) como de sus variantes. 3-4  $\mu$ l de cada tubo de reacción se cargaron en cada uno de los carriles del gel y se llevó a cabo la electroforesis con un corrimiento de 4-5 hrs. a 4°C a 20 W. Después de esto el gel se colocó en un cassette junto con una placa fotográfica (Kodak X-OMAT XK-1) para exponerse de 1 a 3 días y revelarse.

### **Identificación de tipos y variantes de HPV**

Mediante la técnica de PCR-SSCP pudimos identificar variantes de los HPVs 16 y 18 comparando los patrones de corrimiento de las muestras con los patrones de corrimiento de los controles, tanto de HPVs de referencia como de sus variantes.

### **Secuenciación directa de los productos de PCR**

Cuando los patrones de corrimiento de las muestras en el gel de acrilamida no se identificaron plenamente comparando con los patrones de corrimiento de los controles se hizo uso de la técnica de secuenciación directa de productos de PCR generados con el mismo juego de nucleótidos universales, utilizando el kit Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing (USB Amersham). Esta técnica nos permitió identificar otros tipos de HPV presentes. Una vez tipificados, se utilizaron como controles en subsecuentes ensayos de PCR-SSCP.

La secuenciación de ADN mediante dideoxidos terminadores de cadenas es un método estándar que se basa en la síntesis enzimática de una cadena de ADN usando una ADN polimerasa y un molde de ADN de cadena sencilla. La síntesis se inicia en el sitio donde el primer se hibridiza al molde. La elongación del extremo 3' del primer hibridado es catalizada por la ADN polimerasa en presencia de 2'-deoxinucleosido-5'- trifosfatos (dNTPs) y es finalizada por la incorporación de un 2',3'-dideoxinucleosido-5'-trifosfato análogo (ddNTP) que no permite que continúe la elongación (de aquí el nombre de "terminadores de cadenas"). En la reacción con este kit, un nucleotido radioactivo es incorporado en el extremo 3' mediante el uso de un terminador [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] ddNTP (Amersham

Life Science, 1996). Una secuencia legible se obtiene cuando los productos de la síntesis de un conjunto de 4 reacciones nucleótido-específicas (A, C, G, T) son separados por tamaño en un gel de poliacrilamida de alta resolución.

Para que la polimerasa pueda sintetizar un polinucleótido complementario, el ADN en la región a ser secuenciada debe estar en forma de hebra simple, al menos temporalmente.

### **Preparación del molde de ADN**

Para obtener una buena secuenciación se debe tener una buena calidad del ADN usado como molde. El ADN debe prepararse entonces para que otros ácidos nucleicos, proteínas y lípidos sean suficientemente removidos.

En este estudio usamos ADN obtenido de amplificación por PCR, el cual produce una buena calidad de secuenciación si se purifica previamente. El PCR se llevó a cabo como se describió previamente, pero en un volumen de 20 – 25  $\mu$ l por tubo de reacción. Después de la reacción se tomaron 5  $\mu$ l del producto para checar la amplificación del ADN en un gel de agarosa con bromuro de etidio. La purificación del ADN se hizo con la siguiente metodología:

- 1- Pasar el producto sin aceite a un tubo eppendorf de 1ml y completar a un volumen de 400  $\mu$ l con agua estéril.
- 2- Añadir a cada tubo 1 ml de alcohol etílico absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 40  $\mu$ l de acetato de amonio 7.5 M y 2  $\mu$ l de tRNA [1 mg/  $\mu$ l].
- 3- Poner los tubos a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 20-30 min.
- 4- Centrifugar a 13000 rpm durante 40 min.
- 5- Decantar el sobrenadante y lavar el pellet con 400  $\mu$ l de alcohol etílico 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$  y volver a centrifugar 30 min.
- 6- Decantar y dejar evaporar completamente.
- 7- Añadir 20  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  y tomar 5  $\mu$ l para checar su purificación en un gel de agarosa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

\_\_\_\_\_ material y métodos \_\_\_\_\_

**Reacción de secuenciación.**

Para ésta reacción se usó el kit "Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing":

*Polimerasa ADN Thermo Sequenase*

*Buffer de reacción: 260 mM Tris.HCl, pH 9.5, 65 mM MgCl<sub>2</sub>*

*dGTP Nucleotide Master Mix: 7.5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP*

*Solución stop*

Terminadores marcados con <sup>33</sup>P (<sup>33</sup>P- labeled terminators, [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]ddNTPs, Amersham Pharmacia Biotech):

*ddGTP, 0.3 mM [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]ddGTP (1500 Ci / mmol, 450 mCi / ml)*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

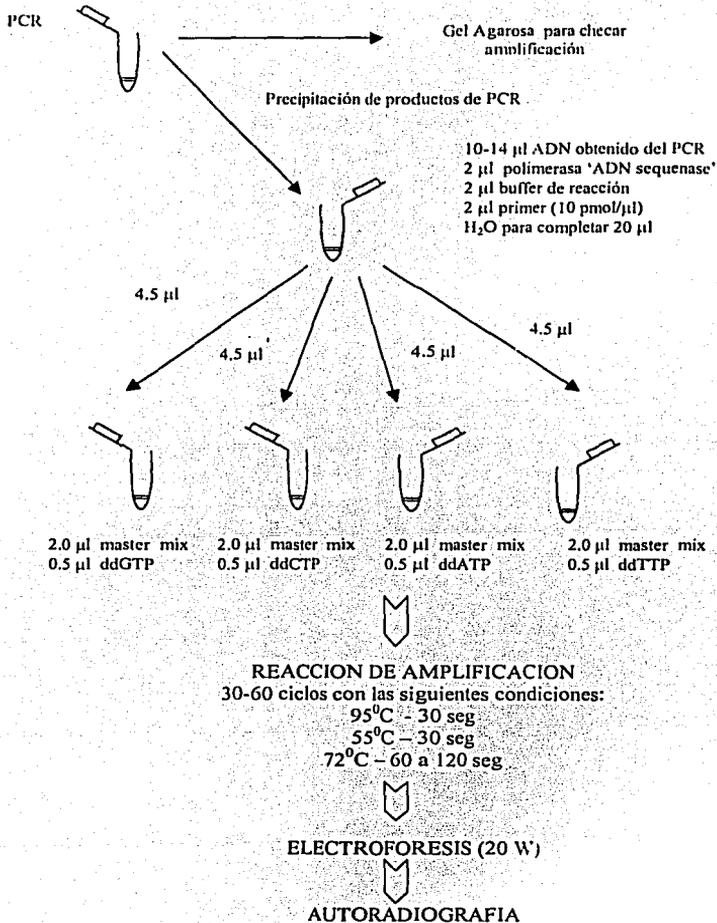


Figura 4- Técnica de SECUENCIACIÓN.

material y métodos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Identificación de sub-variantes de HPV 16

Finalmente se hizo la identificación de las sub-variantes encontradas de HPV 16. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos específicos para un fragmento de 124 pb del gen E6 de HPV 16 (5'HZ27/E6' y F6-3'), cuya secuencia se muestra a continuación:

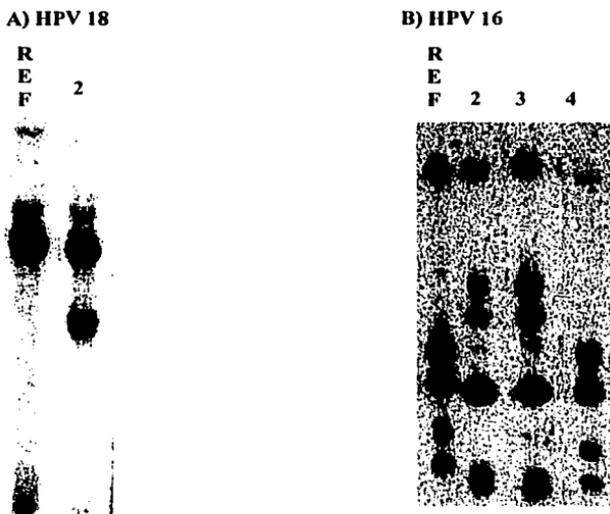
OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA
F6-3'	5'- CCT CAC GTC GCA GTA ACT GT -3'
E6 5'HZ27	5'- GGG GGA TCC ATG TTT CAG GAC CCA CAG GAG CGA -3'

Se hicieron ensayos con la técnica de PCR-SSCP y se encontraron pequeñas diferencias en los patrones de corrimiento entre las sub-variantes. No obstante, se utilizó nuevamente la técnica de secuenciación para la clasificación final.

## RESULTADOS

Con el objeto de establecer la presencia de variantes y sub-variantes de HPV 16 y HPV 18 en un grupo de muestras de lesiones de cáncer de cérvix, de lesiones premalignas del cérvix y de muestras de cérvix sin lesiones y analizar así la distribución de éstos HPV se hicieron primero ensayos de PCR-SSCP y después algunos ensayos de secuenciación para complementar los resultados.

Los ensayos de PCR-SSCP nos permitieron un primer agrupamiento de las muestras en los 2 tipos de interés principales: HPV 16 y HPV 18, referencia y variantes (figura 5).



**Figura 5-** Patrones de corrimiento de variantes de HPV 16 y HPV 18 en ensayos de PCR-SSCP. Se analizó un fragmento de la región L1 del genoma de HPV mediante la técnica de SSCP después de su amplificación por PCR con los oligonucleótidos GP5+/ GP6+. Las muestras se corrieron en un gel no desnaturante de acrilamida al 6% durante 5 hrs. a 4°C. **A) Muestras positivas a HPV 18:** carril 1- control positivo (clona de referencia), carril 2- variante de HPV 18 (muestra de carcinoma escamoso). **B) Muestras positivas a HPV 16.** Carril 1- control positivo (clona de referencia); carril 2- variante HPV 16 (muestra de cáncer escamoso); carril 3- variante HPV 16 (adenocarcinoma); carril 4- variante HPV 16 (lesión precancerosa NIC III).

\_\_\_\_\_ resultados \_\_\_\_\_

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para confirmar los resultados obtenidos por PCR-SSCP se hicieron ensayos de secuenciación directa de productos de PCR de algunas muestras tanto de HPV 16 como de HPV 18, variante y referencia (figuras 6 y 7).

**A) HPV 16 referencia**



**B) HPV 16 variante**



cambio de GxA  
nt 6721

cambio de AxC  
nt 6695

**Figura 6-** Diferencias en la secuencia de HPV 16 referencia (var E) y variante. Secuenciación directa de los productos de PCR generados de una región de 140 pb del gen L1 de HPV 16 usando los oligonucleótidos GP5+/ GP6+. **A)** Sección del fragmento secuenciado de la clona de referencia. **B)** Misma sección pero de una muestra con HPV 16 variante. Las flechas señalan las posiciones en donde hay cambios con respecto a la clona de referencia (nt 6721 y 6695).

\_\_\_\_\_ resultados \_\_\_\_\_

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

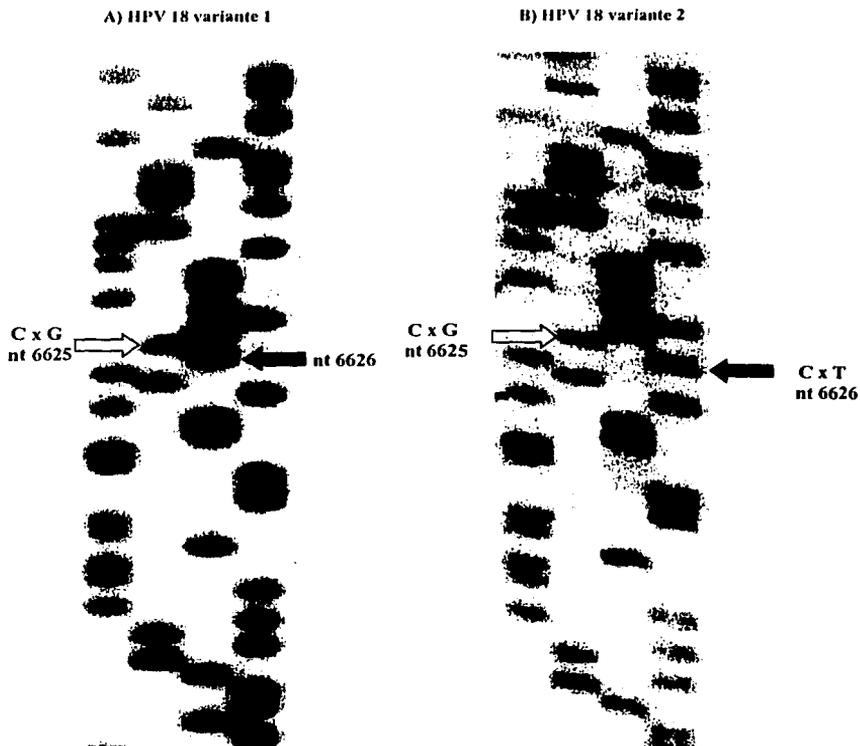


Figura 7- Diferencias en la secuencia de HPV 18 variante 1 y variante 2. Secuenciación directa de los productos de PCR generados de una región de 140 pb del gen L1 de HPV 18 usando los oligonucleótidos GP5+/GP6+. A) Sección del fragmento secuenciado de la variante 1, que difiere con respecto a la clona de referencia en el nucleótido 6625 (C x G). B) Misma sección pero de una muestra con la variante 2, que presenta el mismo cambio con respecto a la clona de referencia que la variante 1, además de un cambio extra en el nucleótido 6626 (C x T).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

\_\_\_\_\_ resultados \_\_\_\_\_

En los ensayos de PCR-SSCP de las muestras de captura de híbridos se encontraron patrones de corrimiento diferentes a HPV 16 y HPV 18 (figura 8). Cada uno de éstos patrones diferentes se tipificaron mediante secuenciación directa de productos de PCR (figura 9) y se tomaron como patrones para identificar éstos tipos en posteriores ensayos de PCR-SSCP. El más abundante de éstos otros tipos de HPV fue el HPV 59 en las muestras control (3 de 12) y el HPV 58 en las lesiones premalignas (8 de 36) (Tabla 3). En algunas no se pudo determinar el tipo de HPV debido a que ni los ensayos de PCR-SSCP ni la secuenciación directa de productos de PCR permitieron una clara identificación del HPV, pues parecía haber coinfección.

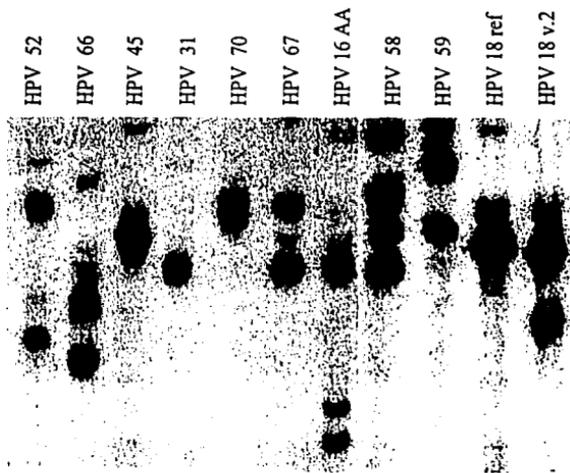


Figura 8- Patrones de corrimiento diferentes a HPV 16 y HPV 18 obtenidas de muestras control y de lesiones premalignas del cérvix. Las muestras fueron tipificadas posteriormente mediante secuenciación directa de productos de PCR con los oligonucleótidos GP5+/GP6+.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

\_\_\_\_\_ resultados \_\_\_\_\_

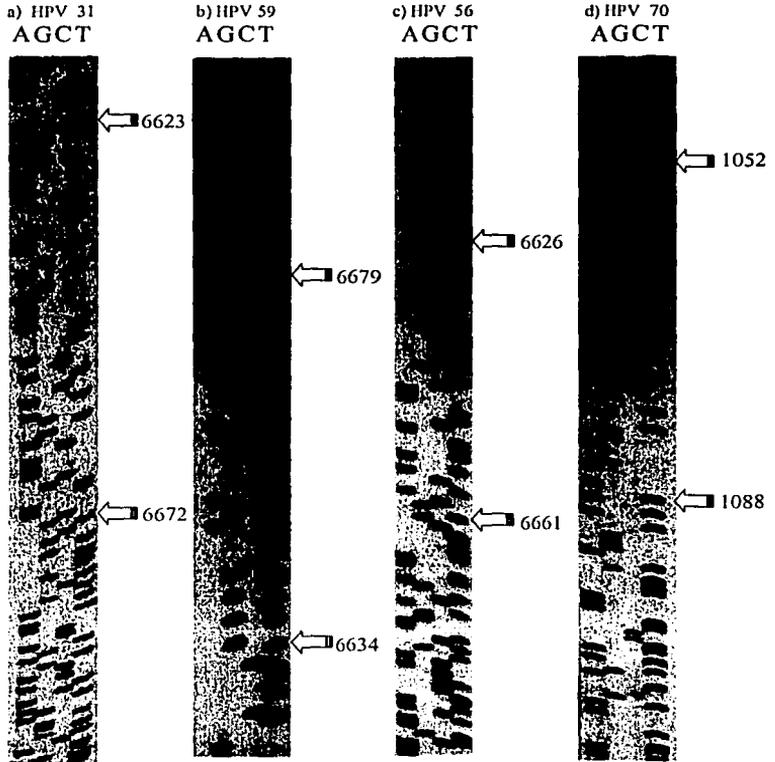
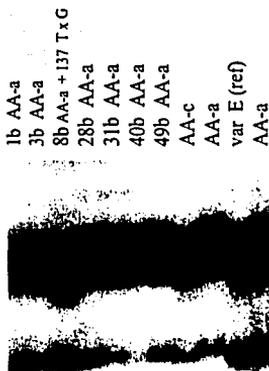


Figura 9- Secuenciación de HPVs de otros tipos, cuyos patrones de corrimiento de PCR-SSCP fueron diferentes de HPV 16 y HPV 18. Para la secuenciación se utilizaron productos de PCR generados de una región de 140 pb del gen L1 de HPV usando los oligonucleótidos GP5+/GP6+ A) HPV 31 B) HPV 59 C) HPV 56 D) HPV 70.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

\_\_\_\_\_ resultados \_\_\_\_\_

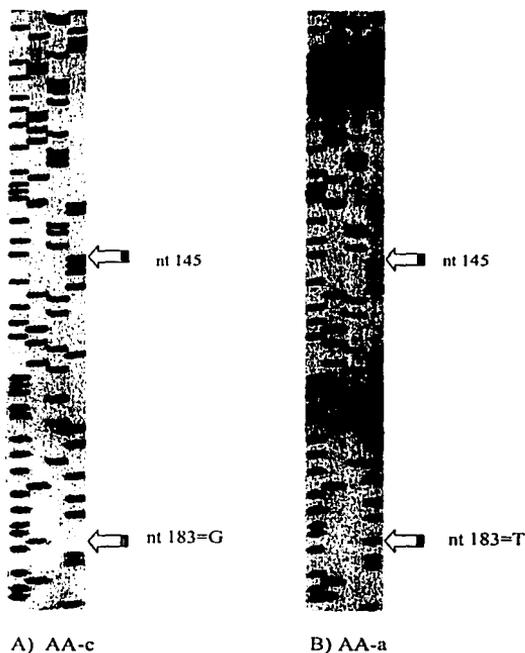
Se hicieron nuevamente ensayos de PCR-SSCP para identificar sub-variantes de HPV 16, ahora usando oligonucleótidos específicos para un fragmento de 124 pb del gen E6 de HPV 16 (5'HZ27/E6' y F6-3'). Se encontraron pequeñas diferencias de corrimiento entre las sub-variantes (figura 10).



**Figura 10- Diferentes patrones de corrimiento de variantes de HPV 16 en ensayos de PCR-SSCP.** Análisis de un fragmento de la región E6 del genoma de HPV 16 mediante la técnica de SSCP después de su amplificación por PCR con los oligonucleótidos 5'HZ27/E6' y F6-3'. La técnica resultó útil para identificar sub-variantes. El carril 3 muestra el patrón de corrimiento de una muestra con la sub-variante AA-a de HPV 16 que tiene un cambio extra TxG en el nt 137 (no reportado antes). Carriles 1-7: muestras de biopsias de cáncer, identificadas como 1b,3b, etc. Carriles 8-11: controles positivos.

Para confirmar que las diferencias encontradas mediante PCR-SSCP en variantes de HPV 16 correspondían con sub-variantes se hizo la secuenciación de algunas muestras con los mismos oligonucleótidos (figura 11).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 11- Diferencias en la secuencia entre sub-variantes de HPV 16.** Secuenciación directa de los productos de PCR generados de una región de 124 pb del gen E6 de HPV 16 usando los oligonucleótidos 5'HZ27/E6' y F6-3', para confirmar las diferentes sub-variantes de HPV 16 encontradas en los patrones de PCR-SSCP. A) sub-variante AA-c. B) sub-variante AA-a. Ambas variantes difieren de HPV 16 de referencia en el nt 145, donde se encuentra una T, y entre sí por el nt 183, donde AA-c presenta una G y AA-a una T.

La secuencia nos permitió demostrar que mediante SSCP se pueden encontrar eficientemente sub-variantes de HPV 16.

\_\_\_\_\_ resultados \_\_\_\_\_

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

En las muestras positivas para HPV 16 sólo se encontraron las variantes E (Europea) y la AA (Asiático-Americana), y dentro de ésta última las sub-variantes AA-a y la AA-c. En 2 muestras de cáncer se encontraron cambios en secuencias nucleotídicas, extras a los cambios propios de la clona AA-a, que no han sido reportados previamente en la literatura. En 1 de ellas se encontró un cambio de G x A en el nt 188 y en otra un cambio de T x G en el nt 137. Esto se confirmó por secuenciación en ambas direcciones. En la muestra que contiene este último cambio ya se había podido observar una diferencia en el patrón de corrimiento de electroforesis en los ensayos de PCR-SSCP (fig. 10, muestra 8b).

También en algunas muestras E positivas se observaron cambios adicionales: En dos de ellas, 1 de cáncer y otra de LIEAG, se observó un cambio de G x A en el nt 176 (previamente reportado por Yamada et al, 1997) y un cambio de A x T en el nt 182 respectivamente.

En las muestras positivas para HPV 18 se encontraron las variantes referencia (rama Asiática-Amerindia, As-Am), var 1 (rama Europea) y var 2 (rama Africana). En una muestra de cáncer positiva a var 1 se encontró un cambio extra de A x T en el nt 218.

En las muestras control positivas por captura de híbridos para HPV de alto riesgo (n=35), 16 fueron positivas a HPV 16 y sólo 7 positivas a HPV 18. Las restantes 12 muestras control se reparten entre HPV de otros tipos, predominando el HPV 59 (3 de 12). En las lesiones premalignas (n= 79), 36 fueron HPV 16 positivas, 7 HPV 18 positivas y 36 de otros tipos, predominando aquí el HPV 58 con 8 muestras (8 de 36) (Tabla 3).

De las 87 muestras de cáncer analizadas positivas para HPV 16 o 18, 67 fueron HPV 16 positivas (77 %) y 20 HPV 18 positivas (23 %). Estas muestras provenían de un total de 134 muestras de cáncer de cérvix en donde el 50% del total resultó positivo para HPV 16 (tabla 3) (Carrillo A., Tesis de Maestría. 2001), dato que concuerda con estudios como el de Berúmen (2001). El HPV 18 se encontró en el 15% de éstas muestras.

HPV	FRECUENCIA (%)		
	control (n=35)	pre malignas (n=79)	cáncer (n=134)
16	16 (45.7)	36 (45.56)	67 (50)
18	7 (20)	7 (8.86)	20 (15)
31	1 (2.85)	3 (3.79)	
33	0	1 (1.26)	
39	0	1 (1.26)	
45	2 (5.71)	4 (5)	
52	1 (2.85)	2 (2.53)	
56	0	3 (3.79)	
58	1 (2.85)	8 (10.12)	
59	3 (8.57)	2 (2.53)	
66	1 (2.85)	2 (2.53)	
67	0	1 (1.26)	
70	1 (2.85)	2 (2.53)	
nd	2 (5.71)	7 (8.86)	

**Tabla 3. Distribución de HPVs en muestras control, muestras de lesiones premalignas del cérvix y muestras de cáncer de cérvix determinados por ensayos de PCR-SSCP y de secuenciación directa de productos de PCR. Todas las muestras control y premalignas fueron positivas a HPV's de alto riesgo. En las muestras de cáncer se incluye el total de muestras de cáncer analizadas en el trabajo de Carrillo A. (tesis de Maestría, 2001) y quien amablemente nos permitió analizar las 87 muestras positivas a HPV 16 o HPV 18. No se reportan los otros tipos virales encontrados en éstas muestras.**

Para HPV 16 y HPV 18 se determinaron variantes en todos los estadios (Tabla 4). Para HPV 16 también se determinaron sub-variantes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

		FRECUENCIA (%)			
		control	pre malignas bajo grado	pre malignas alto grado	cáncer
HPV 16	AA-a	7 (30.4)	6 (37.5)	6 (22.22)	22 (25.28)
	AA-c	0	0	0	5 (5.74)
	E	9 (39.1)	7 (43.75)	17 (62.96)	40 (45.97)
HPV 18	var 1	***	0	0	13 (14.94)
	var 2	***	2 (12.5)	2 (7.4)	5 (5.74)
	As-Am (ref)	***	1 (6.25)	2 (7.4)	2 (2.29)
	<b>totales:</b>	<b>23</b>	<b>16</b>	<b>27</b>	<b>87</b>

Tabla 4. Frecuencia de variantes y sub-variantes de HPV 16 y HPV 18 en muestras control, con lesiones pre malignas de bajo y alto grado y en muestras con cáncer. \*\*\* Se encontraron 7 muestras control positivas a HPV 18, pero no hubo material suficiente para secuenciarlas y clasificarlas adecuadamente.

#### FRECUENCIA DE LAS VARIANTES DE HPV 16

La variante E (referencia) de HPV 16 se encontró con mayor frecuencia que la variante AA (fig. 12) en todos los casos (control, pre malignas y cancer). La mayor diferencia entre ellas se observa en lesiones pre malignas de alto grado (LIEAG), con una proporción de 1 var AA por cada 2.8 var E.

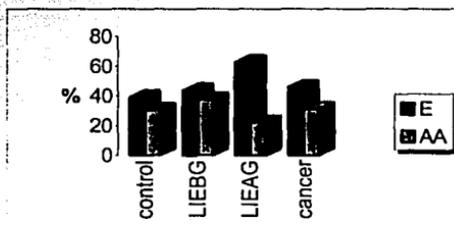


Figura 12- Presencia (% de muestras) de HPV 16 E y HPV 16 AA por estadio de la muestra, de acuerdo a los datos de la tabla 4.

Si observamos la variación en las frecuencias en todos los estadios, tanto para AA como para E, podemos ver que las diferencias entre los grupos para las 2 variantes se mantiene no

mayor al 15% excepto en el grupo con LIEAG, donde la diferencia llega a más del 40%. El porcentaje aumenta para ambos grupos de variantes al pasar del grupo control al grupo de LIEBG (de 30.4% a 37.5% en AA y de 39.1% a 43.7% en E), pero hay un cambio en la tendencia al pasar a LIEAG. Mientras el grupo con la variante E conserva una tendencia a aumentar (llega al 62.9%), el porcentaje para el grupo con la variante AA se comporta al contrario (alcanza sólo el 22.2%). Por el contrario, al pasar del grupo de LIEAG al grupo de cáncer, las tendencias cambian. Ahora quien disminuye en porcentaje es el grupo con la variante E (baja al 45.9%) y el grupo con la variante AA aumenta (alcanza el 31%).

Es interesante notar que la sub-variante AA-c sólo se encontró en muestras con cáncer y no se encontró en lesiones premalignas ni en muestras control (diferencias no significativas,  $\chi^2$  AA-a vs AA-c y AA-c vs E).

#### DIFERENCIAS DE EDAD DE LAS PACIENTES POSITIVAS A HPV 16

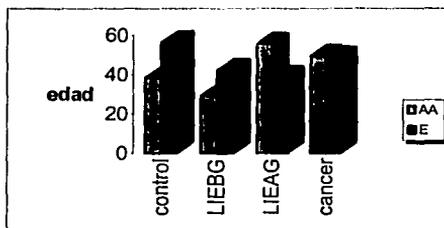
En lo referente a distribución por edades hay algunos datos interesantes (Tabla 5).

		medias (años) + D.E.	
CONTROL	AA	38.57	9.55
	E	56.5	18.13
LIEBG	AA	29.16	6.01
	E	42.42	15.2
LIEAG	AA	55.66	15.38
	E	38.47	12.1
CANCER	AA	49.42	12.28
	E	48.53	12.99

Tabla 5. Distribución de las variantes de HPV 16 por grupo de estudio y por edades. LIEBG = lesiones intraepiteliales de bajo grado, LIEAG = lesiones intraepiteliales de alto grado, D.E. = desviación estándar.

Se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de edades de los grupos con la variante AA y la variante E en todos los grupos (control, LIEBG y LIEAG) excepto en el grupo de cáncer (prueba t de student,  $p < .05$ ). El grupo control con la variante AA es en promedio 17.9 años más joven que el grupo control con la variante E (referencia).

En el grupo de LIEBG la diferencia es de 13.2 años en el mismo sentido. La diferencia en el grupo de LIEAG también es grande, pero ahora es en sentido inverso, siendo más joven el grupo con la variante E que el grupo con la variante AA (17.1 años de diferencia). En el grupo con cáncer los promedios de edades son prácticamente iguales (figura 13).



**Figura 13- Edades promedio en los grupos de muestras de HPV 16 AA y HPV 16 E de acuerdo a los datos de la tabla 5.**

La diferencia también fue estadísticamente significativa ( $t$ -student,  $p < .05$ ) al comparar la media del grupo control con la variante AA y la media del grupo de cáncer con la variante AA, observándose aquí que el grupo control es en promedio 10.8 más joven que el grupo con cáncer.

Estas diferencias en edades para las pacientes con la variante AA también se aprecia si agrupamos las muestras control (38.57 años  $\pm$  9.55) y de LIEBG (29.16 años  $\pm$  6.01) por un lado, y las muestras de LIEAG (55.66 años  $\pm$  15.38) y cáncer (49.42 años  $\pm$  12.28) por el otro. Al obtener un promedio para las edades de las pacientes del grupo control junto con el grupo de LIEBG (34.23 años  $\pm$  9.19) y compararlas con el promedio para las edades del grupo con LIEAG junto con el grupo de cáncer (50.59 años  $\pm$  12.88) se encontró una diferencia estadísticamente significativa (prueba  $t$ -student,  $p < .05$ ).

También se encontró una diferencia significativa en edades entre las pacientes con cáncer para HPV 16 sub-variantes AA-c y AA-a (prueba  $t$  de student,  $p < .05$ ). Las pacientes con la sub-variante AA-c (37.8 años  $\pm$  9.36) fueron en promedio 14.3 años más jóvenes que

\_\_\_\_\_ análisis de resultados \_\_\_\_\_

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

las pacientes con AA-a (52.19 años  $\pm$  11.36) (Tabla 6). Un dato que resalta esta diferencia es que el 0.4 (2 de 5) de las pacientes con cáncer con la sub-variante AA-c son menores de 30 años, en tanto que para el mismo grupo con la sub-variante AA-a sólo el 0.04 (1 de 21) son menores de 30 años. La diferencia entre los promedios de edades para AA-c contra E en el grupo de cáncer no fue estadísticamente significativa.

		medias (años)	+ D.E.
CONTROL	AA-a	38.57	9.55
	AA-c	—	—
LIEBG	AA-a	29.16	6.01
	AA-c	—	—
LIAG	AA-a	55.66	15.38
	AA-c	—	—
CANCER	AA-a	52.19	11.36
	AA-c	37.8	9.36

**Tabla 6. Distribución de las sub-variantes de HPV 16 AA por grupo de estudio y por edades.** LIEBG = lesiones intraepiteliales de bajo grado, LIAG = lesiones intraepiteliales de alto grado, D.E. = desviación estándar.

La diferencia en edades también fue significativa cuando se compararon las edades de las pacientes con la sub-variante AA-a para el grupo con cáncer (52.19 años  $\pm$  11.36) contra las pacientes control (38.57 años  $\pm$  9.55) (prueba t de student,  $p < .05$ ).

Cuando se agruparon las edades en menores o iguales de 40 años ( $\leq 40$ ) y en mayores de 40 años ( $> 40$ ) no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Tabla 7) (prueba t de student,  $p < .05$ ).

	Frecuencia (%)	
	$\leq 40$ años (n=46)	$> 40$ años (n=68)
<b>AA</b>		
control	3 (6.52)	4 (5.88)
pre malignas	7 (15.21)	5 (7.35)
cáncer	7 (15.21)	19 (27.94)
<b>E</b>		
control	2 (4.34)	4 (5.88)
pre malignas	14 (30.43)	10 (14.7)
cáncer	13 (28.26)	26 (38.23)
	100%	100%

**Tabla 7. Distribución de variantes de HPV 16 por grupos de edades y por grupo de estudio.**

análisis de resultados

### FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES DE HPV 18

La variante 1 de HPV 18 fue encontrada en el 14.94% de las muestras de cáncer, siendo la variante de HPV 18 de mayor presencia en éste grupo (figura 14). Esta variante no se encontró en lesiones premalignas.

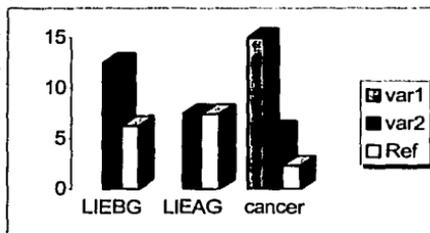


Figura 14- Frecuencias (%) de las variantes de HPV 18 por estadio de la muestra, de acuerdo a los datos de la tabla 5. var1= variante 1, var2= variante2, Ref=referencia.

La variante referencia de HPV 18 fue la que se encontró en menor número en el grupo de cáncer de entre todas las variantes, tanto de HPV 16 como HPV 18, con apenas el 2.2%. De entre las muestras positivas a HPV 18 (tabla 8), la variante 1 fue encontrada más frecuentemente en las muestras de cáncer (13 de 20 = 65%), en tanto que la variante 2 se encontró en un 25% (5 de 20) y la variante referencia en 10% (2 de 20). En las lesiones premalignas el 57% (4 de 7) de las muestras presentaron la variante 2, y la variante referencia (3 de 7) el restante 43%. Las 7 muestras positivas a HPV 18 en el grupo control no se pudieron clasificar adecuadamente dado que no hubo suficiente material para secuenciarlas.

		FRECUENCIA (%)	
		pre malignas (n=7)	cáncer (n=20)
HPV 18	var 1	0	13 (65)
	var 2	4 (57.14)	5 (25)
	ref	3 (42.86)	2 (10)

Tabla 8. Distribución de las variantes de HPV 18 en muestras con lesiones premalignas y con cáncer; var 1= variante 1, var 2= variante 2, ref = variante referencia.

análisis de resultados

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Al aplicar una prueba de  $\chi^2$  se encontró una diferencia significativa al comparar las lesiones premalignas y con cáncer tanto para var 1 como para var 2 ( $p < .05$ ). Ninguna de las otras comparaciones entre las variantes y los diferentes estadios fueron significativas.

#### DIFERENCIAS DE EDAD DE LAS PACIENTES HPV 18 POSITIVAS

No existen diferencias significativas en lo referente a edades en las muestras con HPV 18. No obstante, al agrupar las muestras (sin incluir las muestras control) por edades en menores de 40 años (<40) y mayores o iguales de 40 años ( $\geq 40$ ) se observa que sólo 6 muestras caen en el grupo de menos de 40 años (Tabla 9). De éstas, 3 de 6 presentan la variante 1 (0.5), en tanto que 2 de 6 (0.33) presentan la variante de referencia y solo 1 de 6 la variante 2 (0.16). En el grupo de mayores o iguales de 40 años, la variante que más prevalece también es var 1, con 0.45 (9 de 20), el 0.35 para var 2 (7 de 20) y el restante 0.2 para la variante referencia (4 de 20).

	FRECUENCIA (%)	
	<40 años (n=6)	$\geq 40$ años (n=20)
var 1	3 (50)	9 (45)
var 2	1 (16.66)	7 (35)
ref	2 (33.33)	4 (20)

**Tabla 9. Distribución de variantes de HPV 18 por grupos de edades.**

#### FRECUENCIAS DE VARIANTES POR TIPOS DE CANCER

Con respecto al tipo de cáncer y las variantes en HPV 16 podemos decir que predominó la variante E sobre la variante AA en cáncer epidermoide (62.5% E, 37.5% AA) y en adenocarcinoma (71.43% E, 28.57% AA). Por el contrario, las muestras con adenocarcinomas sólo presentaron la variante AA (100%) y no se encontró la variante E (Tabla 10).

	FRECUENCIA (%)		
	epidermoides (n=56)	adenocarcinomas (n=3)	adenocarcinomas (n=7)
AA	21 (37.5)	3 (100)	2 (28.57)
E	35 (62.5)	0	5 (71.43)

**Tabla 10. Frecuencias de las variantes AA y E de HPV 16 en relación al tipo de cáncer.**

Para HPV 18 también se encontraron algunas diferencias. En cáncer epidermoide y en adenocarcinomas se encontró principalmente la variante 1 (61.5% y 75% respectivamente) (Tabla 11). En adenocarcinomas se encontraron igualmente distribuidas las variantes 1 y referencia. La variante 2 sólo se encontró en cáncer epidermoide, pero no en adenocarcinomas ni en adenocarcinomas.

	FRECUENCIA (%)		
	epidermoides (n=13)	adenocarcinomas (n=4)	adenocarcinomas (n=2)
var1	8 (61.5)	3 (75)	1 (50)
var2	4 (30.7)	0	0
ref	1 (7.8)	1 (25)	1 (50)

**Tabla 11. Frecuencias de las variantes 1, 2 y referencia de HPV 18 en relación al tipo de cáncer.**

## DISCUSION

Se reconoce que el virus del papiloma humano es un factor importante en el desarrollo del cáncer de cérvix. Sin embargo, al parecer no es del todo suficiente dado que algunas lesiones con HPVs de alto riesgo nunca progresan a cáncer. Por ello se considera que ciertas variantes de estos tipos virales podrían ser responsables, en parte, de los diferentes comportamientos biológicos.

De ahí nuestro interés de analizar la distribución de HPVs de alto riesgo y sus variantes en 3 grupos de muestras: controles sin lesión, muestras de lesiones precancerosas (de bajo y alto grado) y muestras de lesiones cancerosas. En éste último grupo esencialmente se analizaron las muestras positivas a HPVs 16 y 18 con el fin de determinar la distribución de variantes de éstos tipos virales.

Para ello utilizamos las técnicas combinadas de PCR y SSCP para hacer una primera identificación de tipos virales de HPV en base a sus diferentes patrones de migración electroforética. La misma técnica resultó útil para identificar tanto variantes de HPV 16 y algunas de HPV 18, como para identificar sub-variantes de HPV 16.

Por otra parte, sabemos que el fragmento del gen L1 que amplificamos por PCR para la técnica de SSCP no es una región hipervariable. Por ello, las diferencias entre algunas variantes de HPV 18 no se aprecian en éste segmento de gen. Para poder tipificar tales variantes, se utilizó la técnica de secuenciación directa de un producto del gen E6. Esta técnica a la vez ayudó a confirmar algunos resultados dudosos obtenidos por PCR-SSCP.

Es importante resaltar que, al igual que lo reportado para CaCU, el HPV 16 también fue el mas frecuente en muestras control y de lesiones premalignas (tablas 3 y 4).

De las muestras de cáncer de cérvix analizadas positivas a HPV 16 (n=67), se encontró que el mayor porcentaje contenía la variante Europea, con un 59.7 % de las muestras. La variante AA se encontró en el restante 40.3%. Este porcentaje para la variante AA es diferente al reportado para otras regiones del mundo. En un estudio llevado a cabo a nivel mundial (Yamada et al, 1997) el mayor porcentaje para ésta variante se reportó para Centro y Sudamérica con un 20%. Hildesheim y su grupo encontraron un porcentaje (43.7%)

parecido al nuestro para muestras de cáncer de cérvix con variantes de HPV 16 en mujeres en Costa Rica, pero el dato no es exclusivo para variantes AA, sino para variantes no Europeas (Hildesheim et al, 2001).

Berumen reporta un porcentaje similar al de nuestro estudio para la variante AA en muestras de cáncer en mujeres mexicanas (45.7%) (Berumen et al, 2001). Sin embargo, en su estudio la mitad de éste porcentaje (20 de 42) representa a la sub-variante AA-c y la otra mitad (22 de 42) a la sub-variante AA-a. En nuestro caso, la sub-variante AA-c contribuye sólo en una mínima proporción (5 de 27), mientras que la sub-variante AA-a está presente en la mayor proporción (22 de 27). Como ya hemos mencionado antes, se piensa que la prevalencia de ciertas variantes es afectada por locaciones geográficas y por el origen étnico de las pacientes. Esto podría explicar las diferencias de nuestros resultados comparados con los encontrados por Berumen, pues aunque en ambos estudios se analizaron muestras de mujeres de una población mexicana, éstas provienen de lugares diferentes. Las muestras en el análisis de Berumen provienen de mujeres residentes en la ciudad de México por al menos 1 año y que además fueron canalizadas desde unidades de medicina familiar del IMSS de la misma área. Las muestras de nuestro estudio tienen un origen más heterogéneo, ya que las pacientes son canalizadas al Instituto Nacional de Cancerología desde diferentes lugares en todo el país. Esto deja abierta la posibilidad de que las pacientes tengan origen étnico diferente, además de que muy probablemente han estado sometidas a factores ambientales también diferentes.

El porcentaje que encontramos para ambas sub-variantes (AA-a y AA-c) es mayor que el encontrado en otras regiones del mundo. Para AA-a encontramos 32.8% en nuestro estudio contra 14.8% reportado en Centro y Sudamérica, 12% en Europa, 5.7% en el sureste de Asia y 0% en las otras regiones. Para AA-c encontramos 7.4% en nuestro estudio contra 4.4% para Centro y Sudamérica, 2% para Europa y 0% para las otras regiones (datos tomados de Yamada et al, 1997). Se ha sugerido (Berumen et al, 2001) que ésta mayor prevalencia de la variante AA en México, comparada con regiones de Centro y Sudamérica, puede deberse también a diferencias en los antecedentes genéticos, además de los étnicos, ya que México posee una mayor proporción de individuos con ancestros indio-americanos y una menor proporción de ancestros españoles.

Con respecto a la variante Europea, el 59.7% encontrado en nuestro estudio es parecido al 54.4% encontrado por Berumen (Berumen et al, 2001). Esto podría indicarnos que la variante Europea puede estar entonces más homogéneamente distribuida en la población mexicana que la variante AA.

El hecho de que la sub-variante AA-c sólo la hayamos encontrado en lesiones con cáncer y no en lesiones premalignas ni en muestras control nos puede indicar que el tiempo que transcurre entre la infección inicial con ésta variante y el desarrollo de cáncer es muy corto. Algo interesante también es el hecho de que 0.4 (2 de 5) de las muestras de cáncer que encontramos con esta variante fueron tomadas de mujeres menores de 30 años, una de ellas con diagnóstico de cáncer adenoescamoso, uno de los tipos de cáncer considerado más agresivo. Todas las muestras fueron de mujeres jóvenes, menores de 47 años. Todo esto apoya lo encontrado en otros estudios en el sentido de que es una de las sub-variantes más oncogénicas. Recordemos que Xi et al, (1997, 1998), demostraron un incremento en la tendencia de la progresión en infecciones con variantes no prototipo como la AA-c. Kämmer et al, (2000), encontraron un incremento en la actividad del promotor p97 3.3 veces mayor en ensayos con la variante AA-c comparados con la variante E. Este promotor p97 en el extremo proximal de E6 regula la transcripción de genes virales, especialmente E6 y E7. Veress et al, (1999), también encontraron un incremento en la actividad de p97 en variantes AA-c. Todos éstos datos sugieren que la sub-variante AA-c tiene una mayor agresividad.

En cuanto a muestras control y muestras de lesiones premalignas también se encontró la variante E en mayor proporción que la variante AA pero, a diferencia del grupo con cáncer, sólo se encontró la sub-variante AA-a y no la AA-c.

En la gráfica de barras de la figura 11 podemos observar comportamientos diferentes para las variantes E y AA de HPV 16 asociados al estadio de las lesiones. El porcentaje de lesiones de alto grado (LIEAG) infectadas con la variante AA (porcentaje debido exclusivamente a AA-a, pues no hay AA-c) es menor que el porcentaje de las lesiones de bajo grado (LIEBG) infectadas con la misma variante. El comportamiento es opuesto para la variante E, con un porcentaje alto en las lesiones de alto grado y menor en las lesiones de

bajo grado. ¿Podríamos pensar entonces que la lesión de bajo grado tiene mayor oportunidad de regresión y no pasar a una lesión de alto grado si está infectada con la variante AA (sub-variante AA-a) que si lo está con la variante E? Por el contrario, en la misma gráfica se observa que el porcentaje de muestras infectadas con la variante AA es mayor en muestras con cáncer (incremento debido a la presencia de AA-c además de AA-a) que en muestras con lesiones de alto grado, y nuevamente el comportamiento para la variante E es opuesto. Aquí pareciera entonces que en el paso de una lesión de alto grado (LIEAG) a cáncer quien tiene mayor oportunidad de regresión y no pasar a una lesión de cáncer es la lesión de alto grado infectada con la variante E y no la lesión de alto grado infectada con la variante AA. Este comportamiento más agresivo se podría explicar por la presencia de la sub-variante AA-c en las lesiones de cáncer.

Es importante mencionar que la gráfica no refleja un seguimiento de las lesiones de las pacientes de un estadio al otro, por lo que la interpretación de sus comportamientos no es exacta.

Hildesheim y su grupo (2001) también analizaron muestras con diferentes grados de lesión, aunque sus variantes no Europeas no pertenecen a AA. Si analizamos sus datos para lesiones de alto grado (HSIL) con relación a lesiones con cáncer, podemos observar un comportamiento similar al de nuestro estudio. En sus datos la frecuencia para muestras con variantes Europeas (European + European-like) se reduce del 86.2% en lesiones de alto grado al 56.3% en muestras de cáncer, en tanto que las variantes no Europeas (Non-European) tienen una tendencia inversa, aumentando del 14.3% en lesiones de alto grado al 43.7% en muestras de cáncer. No podemos saber con exactitud lo que encontraron en muestras control y lesiones de bajo grado (LSIL), puesto que ambas las agruparon dentro del grupo control.

Las edades promedio de los diferentes grupos de muestras positivas a HPV 16 también nos proporcionan información interesante. Podemos observar que la variante AA es capaz de infectar mujeres jóvenes más frecuentemente de lo que lo hace la variante Europea dado que ya encontramos lesiones, aunque de bajo grado, en mujeres con edades menores de 30 años asociadas a ésta variante. En muestras de mujeres

control positivas a la variante AA, el promedio de edad que encontramos ( $38.57 \text{ años} \pm 9.55$ ) es parecido al encontrado por Berumen ( $34.5 \pm 12.0$ ) (Berumen et al, 2001). Esta capacidad de infección temprana podría apoyar la tesis de su mayor agresividad. Sin embargo, la edad promedio para el grupo con lesiones de alto grado (LIEAG) con la variante AA es alta comparada con la de lesiones de bajo grado para la misma variante. Quizá haya un lapso considerable de años entre el paso de una lesión de bajo grado a una de alto grado en presencia de la variante AA, lo que podría dar mas oportunidad a una regresión de la lesión en éste período. En el grupo con cáncer y la misma variante AA el promedio que encontramos es también parecido al encontrado por Berumen y su grupo. Sin embargo, nosotros no encontramos diferencia significativa en los promedios de edades para las variantes AA y E en el grupo de cáncer. De hecho, las edades fueron muy semejantes. Sin embargo, el promedio de edad para cáncer con la variante AA-c es mucho menor que el de la variante AA-a.

Para la variante E los promedios de edades nos indican que la infección inicial con ésta variante de HPV 16 se da en mujeres menos jóvenes comparando los grupos con la variante AA control y con lesiones de bajo grado. En éste sentido, ésta variante parece menos agresiva que la AA. La edad promedio para el grupo control con la variante E (56.5 años) es incluso mayor que la reportada por Berumen (47.2 años).

Por otro lado, encontramos una asociación exclusiva de la variante AA (AA-a específicamente) con adenocarcinomas, que es un cáncer con pronóstico relativo pobre. Esta misma asociación fue encontrada en el trabajo realizado por Berumen. En cáncer epidermoide, considerado como de mejor pronóstico relativo, la variante que prevalece es la E.

La asociación de la variante AA con mujeres jóvenes (AA-a en casos control y de lesiones de bajo grado, AA-c en el grupo con cáncer) y su asociación con adenocarcinomas, parece sugerir una mayor agresividad de la variante AA sobre la variante E. Los datos sugieren que la sub-variante AA-c es la más agresiva, pues sólo se encuentra en muestras de cáncer. Sin embargo, AA-a se encuentra en el 100% de los adenocarcinomas. La mayor agresividad de AA pudiera agudizarse en ciertas etapas de la infección, como es el paso de una lesión de alto grado a cáncer.

Varios estudios previos señalan a la hipótesis de la mayor oncogenicidad de AA: Berumen y su grupo (2001) afirman que hay una fuerte asociación de la variante AA con mujeres jóvenes y con adenocarcinomas, además de asociarlas con un riesgo mayor de desarrollo de cáncer cervical; Stoppler y su grupo concluyen que la proteína E6 de la variante AA estimula la degradación de p53 mejor de lo que lo hace la misma proteína de la variante E (Stoppler et al, 1996); Casas et al, (1999), sugieren que las variantes AA replican mejor que las variantes E, pues el número de copias de AA por célula es mayor que el de E; Lizano et al, (1997), observaron que en carcinomas de células escamosas la variante AA estuvo presente sólo en un grupo de muestras de mujeres de 28 a 40 años de edad, mientras que la E estuvo presente en una alta proporción en el grupo de 40 a 55 años.

El mayor porcentaje de muestras con cáncer HPV 16 positivas (84.8%) presentó cáncer epidermoide, lo que confirma lo encontrado por Bosch en el sentido de que HPV 16 se asocia predominantemente con éste tipo de cáncer (Bosch et al, 1995). En ese mismo trabajo se menciona que HPV 18 se asocia predominantemente con adenocarcinomas y cáncer adenoescamoso. Nosotros encontramos el 31.5% de las muestras con cáncer positivas a HPV 18 asociadas a éstos tipos histológicos, porcentaje que ciertamente es mayor que el encontrado en HPV 16.

La variante 2 de HPV 18 se encontró exclusivamente en cáncer epidermoide, que es también lo que encontraron Lizano y su grupo (1997). Esto apoya la idea de que ésta variante se asocia con un comportamiento menos agresivo, pues recordemos que éste tipo de cáncer tiene un mejor pronóstico relativo. Hecht también sugiere la existencia de un subtipo de HPV 18 con menor agresividad, pues lo encuentra exclusivamente en lesiones premalignas y no en cáncer (Hecht et al, 1995). Esta variante 2 también la encontramos en lesiones premalignas, pero su menor agresividad parece reflejarse también en el hecho de que su presencia es menor en lesiones de alto grado respecto a las de bajo grado y todavía menor en las lesiones de cáncer (fig. 14). Cabe mencionar que en el grupo control encontramos un mayor porcentaje de muestras positivas a HPV 18 (20%) en relación al grupo de cáncer (15%). Esta disminución podría explicarse si las muestras en el grupo control que contuvieran la variante 2 no progresaran hacia una lesión y no contribuyeran entonces al porcentaje del grupo de cáncer.

La variante referencia de HPV 18 también se encuentra en porcentajes bajos, siendo la variante con menos representación en lesiones de cáncer, tanto de HPV 16 como de HPV 18.

En el otro extremo, encontramos la variante 1 de HPV 18 en la mayoría de las muestras de cáncer HPV 18 positivas (13 de 20) y no la encontramos en lesiones premalignas. Los trabajos de Boshart (Boshart et al, 1984) y de Kurman (Kurman et al, 1988) señalan una ausencia de HPV 18 en lesiones precancerosas planteando que, de todos los HPVs, el tipo 18 se asocia más fuertemente con carcinomas invasivos y es muy poco encontrado en lesiones premalignas. Las lesiones con la variante 1 de HPV 18 pueden ser entonces, como las de AA-c en HPV 16, de las que evolucionan rápidamente de lesiones precursoras a carcinomas invasores. Una gran parte de las mujeres jóvenes ( $\leq 40$  años) con cáncer positivas a HPV 18 están infectadas con ésta variante, lo que contribuye a considerarla más agresiva.

Aunque no son concluyentes, nuestros datos sugieren que existen diferencias en el potencial oncogénico entre variantes de HPVs. El análisis de un mayor número de casos debe arrojar resultados más confiables y estadísticamente importantes para apoyar la hipótesis. El medir la frecuencia de variantes es importante, pero la verdad acerca del riesgo aumentado de ciertas variantes se obtendrá mediante el seguimiento de pacientes con lesiones premalignas. Es entonces cuando podremos pensar en el diseño de vacunas dirigidas a una población determinada. Por el momento no sería indicado un tratamiento prematuro.

Aún existe mucho trabajo por hacer para encontrar resultados definitivos y así poder dirigir los esfuerzos hacia la solución del problema de una manera más certera.

## CONCLUSIONES

- El método de PCR-SSCP es útil para detectar variantes e incluso sub-variantes de HPV. No obstante, el método de secuenciación sigue siendo fundamental en casos específicos donde los oligonucleótidos utilizados no permiten discernir algunas variantes.
- La variante AA de HPV 16 se detecta en mujeres jóvenes, aún sin lesión cervical.
- La sub-variante AA-c de HPV 16 infecta mujeres jóvenes y se asocia con cáncer invasor.
- El comportamiento biológico de AA podría inducir un progreso más rápido de una lesión premaligna a cáncer.
- La variante 1 de HPV 18 también la encontramos asociada a cáncer invasor.
- AA de HPV 16 (especialmente AA-c) y var 1 de HPV 18 muestran tener un comportamiento más agresivo que sus respectivos aislados de referencia.
- La variante 2 de HPV 18 es más frecuente en lesiones premalignas que en cáncer invasor. A su vez, se asocia con tumores epidermoides, que tienen un mejor pronóstico relativo que los cánceres de cérvix de otros tipos histológicos. Estos datos sugieren que esta variante pudiera tener un comportamiento biológico menos agresivo que la variante 1 o la clona de referencia.
- La presencia de ciertas variantes y sub-variantes en lesiones premalignas podría llegar a ser un indicador pronóstico de la lesión.
- El análisis de un mayor número de muestras, y que incluya el seguimiento de pacientes, ayudará a definir con certeza a las variantes virales de mayor riesgo oncogénico.

## REFERENCIAS

- Alcalá F., Herrera A. & Granados M. (1999). Cáncer cervicouterino invasor. En: Manual de Oncología. McGraw-Hill Interamericana. pp 369-385.
- Alonso P., Lazcano E. & Hernández M. (2000). Cáncer del Cuello y Virus del Papiloma Humano: Evidencia Epidemiológica y Perspectivas para su prevención. En: Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, Prevención y Control. Panamericana.
- Amershan Life Science (1996). Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit. Manual del kit. Amershan Life Science, Inc., USA.
- Band V., Zaychowski D., Kulesa V. & Sager R. (1990). Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(1): 463-467.
- Bedell M.A., Jones K.H., Grossman S.R. & Laimins L.A. (1989). Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J Virol.* 63(3): 1247-1255.
- Bernard H.U., Chan S.-Y. & Delius H. (1994a). Evolution of papillomaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 186: 33-53.
- Bernard H.U., Chan S.Y., Manos M.M., Ong C.K., Villa L.L., Delius H., Peyton C.L., Bauer H.M., Wheeler C.M. (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 170: 1077-1085.
- Berumen J., Casas L., Segura E., Amezcua J.L. & García-Carrancá A. (1994). 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.
- Berumen J., Ordóñez R.M., Lazcano E., Salmeron J., Galván S.C., Estrada R.A., Yunes E., García-Carrancá A., González-Lira G., Madrigal de la Carpa A. (2001). Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study. *Journal of the National Cancer Institute.* 93(17): 1325-1329.
- Bible J.M., Mant C., Best J.M., Kell B., Starkey W.G., Raju K.S., Seed P., Biswas C., Muir P., Banatvala J.E. & Cason J. (2000). Cervical lesions are associated with human papillomavirus type 16 intratypic variants that have high transcriptional activity and increased usage of common mammalian codons. *J Gen Virol.* 81: 1517-1527.

Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A. M., Peto J., Schiffman M. H., Moreno V., Kurman R. & Shah K.V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*. 87, 796-802.

Boshart M., Gissmann L., Ikenberg H., Klinheinz A., zur Hausen H. (1984). 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.

Bouvard V., Storey A., Pim D. & Banks L. (1994). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* 13(22): 5451-5459.

Carrillo A. (2001). Infección por virus del Papiloma Humano en mujeres mexicanas sanas, con lesión premaligna y maligna del cérvix. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina, División de Estudios de Posgrado, UNAM.

Casas L., Galván S.C., Ordóñez R.M., López N., Guido M. & Berumen J. (1999). Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 83: 449-455.

Cavalli-Sforza L.L., Minch E. & Mountain J.L. (1992). Coevolution of genes and languages revisited. *Proc Natl Acad Sci*. 89: 5620-5624.

Chapellapan S., Kraus V.B., Kroger B., Munger K., Howley P.M., Phelps W.C. & Nevins J. R. (1992). 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.

Chong T., Chan W.K. & Brenard H.U. (1990). 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.

Choo K.-B., Pan C.-C. & Han S.-H. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region end the E6/E7 open reading frames. *Virology*. 161: 259-261.

Crum C.P., Mitao M., Levine R.U., Silverstein S. (1984). Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J Virol*. 54: 675-681.

Cullen A.P., Reid R., Champion M. & Lorincz A.T. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol*. 65: 606-612.

Das B.C., Sharma J.K., Gopalakrishna V. & Luthra U.K. (1992). Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J. Gen. Virol.* 73: 2327-2336.

Demers G.W., Foster S.A., Halbert C.L. & Galloway D.A. (1994). Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 91(10): 4382- 4386.

Dostatni N., Lambert P.F., Sousa R., Ham J., Howley P.M. & Yaniv M. (1991). The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes & Development.* 5: 1657-1671.

Dürst M., Gissmann L., Ikenberg H., zur Hausen H. (1983). 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.

Dürst M., Dzarlieva-Petrusevska R.T., Boukamp P., Fusenig N.E. & Gissmann L. (1987). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene.* 1(3): 251-256.

Dyson N., Howley P.M., Münger K. & Harlow E. (1989). The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science.* 243: 934-937.

El Awady M.K., Kaplan J.B., O'Brien S.J. & Burk R.D. (1987). Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology.* 159: 389-398.

Eliyahu D., Michalovitz D., Eliyahu S., Pinhasi-Kimhi O. & Oren M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(22): 8763-8767.

Ellis J.R.M., Keating P.J., Baird J., Hounsell E.F., Renouf D.V., Rowe M., Hopkins D., Duggan-Keen M.F., Bartholomew J.S., Ypung L.S., Stern P.L. (1995). The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Med.* 4: 464-470.

Finlay C. A., Hinds P. W. & Levine A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 57(7): 1083-1093.

Glavac D. & Dean M. (1993). Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat.* 2(5):404-414.

Gu Z., Pim D., Labrecque S., Banks L. & Matlashewski G. (1994). DNA damage induced

- p53 mediated transcription is inhibited by human papillomavirus type 18 E6. *Oncogene*. 9(2): 629- 633.
- Ham J.D., Gauthier J. & Yaniv M. (1991). The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *Trend Biol Sci*. 16:440-444.
- Hecht J.L., Kadish A.S., Jiang G. & Burk R.D. (1995). Genetic characterization of 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.
- Herrera A., Granados M. & de la Garza J.G. (1999). Cáncer: un problema de salud clínico y de salud pública. En: Manual de Oncología. McGraw-Hill Interamericana. pp. 3-8.
- Hickman E.S., Picksley S.M. & Vousden K.H. (1994). Cells expressing HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation. *Oncogene*. 9(8): 2177- 2181.
- Hildesheim A., Schiffman M., Bromley C., Wacholder S., Herrero R., Rodríguez A.C., Bratti M.C., Sherman M.E., Scarpidis U., Lin Q-Q., Terai M., Bromley R.L., Buetow K., Apple R.J. & Burk R.D. (2001). Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 93(4):315-318.
- Hinojosa L.M. & López J.L. (1999). Lesiones preinvasoras de cuello uterino. En: Manual de Oncología. McGraw-Hill Interamericana. pp 361-368.
- Ho L., Chan S.Y., Chow V., Chong T., Tay S.-K., Villa L.L. & Bernard H.-U. (1991). 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.
- Ho L., Chan S.Y., Burk R.D., Das B.C., Fujinaga K., Icenogle J.P., Kahn T., Kiviat N., Lancaster W., Mavromara N.P., Mitrani-Rosenbaum S., Norrild B., Pillai M.R., Stoerker J., Syrjänen K., Syrjänen S., Tay S.-K., Villa L.L., Wheeler C.M., Williamson A.-L. & Bernard H.-U. (1993). 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.
- Hu Q., Dyson N. & Harlow E. (1990). The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J*. 9(4): 1147-1155.
- Huang S., Wang N.-P., Tseng B.Y., Lee W.-H. & Lee E.H. (1990). Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. *EMBO J*. 9(6):1815-1822.

referencias

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- Huibregtse J.M., Scheffner M., Romanczuk H., Munger K., Miettinen J.A. & Howley P.M. (1994). Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 186: 83-99.
- Hwang E.-S., Riese D.J., Settleman J., Nilson L., Hong J., Flynn S. & DiMaio D. (1993). Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J. Virol.* 67: 3720-3729.
- Kämmer C., Warthorst U., Torrez-Martinez N., Wheeler C.M. & Pfister H. (2000). Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol.* 81: 1975-1981.
- Kanda T., Watanabe S. & Yoshiike K. (1988). immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic DNA fragments controlled by the SV40 promoter. *Virology.* 165(1):321-325.
- Kaye F.J., Kratzke R.A., Gerster J.L. & Horowitz J.M. (1990). A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(17):6922-6926.
- Kern S.E., Kinzler K.W., Bruskin A., Jarosz D., Friedman P., Prives C. & Vogelstein B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science.* 252(5013): 1708- 1711.
- Kessis T.D., Slebos R.J., Nelson W.G., Kastan B.S., Plunkett M.B., Hau S.M., Lörincz A.T., Hedrick L. & Cho K.R. (1993). Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 90 (9): 3988- 3992.
- Kuerbitz T.D., Plunkett B.S., Walsh W.V. & Kastan M.B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 89 (16): 7491- 7495.
- Kurman R.J., Schiffman M.H., Lancaster W.D., Reid R., Jensen A.B., Temple G.F. & Lorincz A.T. (1988). Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159: 293-296.
- Lin D., Shields M.T., Ullrich S.J., Apella E. & Mercer W.E. (1992). Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G1 phase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 89(19): 9210- 9214.
- Lizano M., Berumen J., Guido M.C., Casas L. & García-Carrancá A. (1997). Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 89: 1227-1231.

- Londesborough P., Ho L., Terry G., Cuzick J., Wheeler C. & Singer A. (1996). Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *International Journal of Cancer*. 69:364-368.
- Luxton J., Mant C., Greenwood B., Derias N., Nath R., Shepherd P. & Cason J. (2000). HPV 16 E6 oncogene variants in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J of Medical Virology*. 60: 337-341.
- Matsukura T., Koi S. & Sugase M. (1989). Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology*. 172: 63-72.
- McBride A.A., Romanczuk H. & Howley P.M. (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem*. 266: 18411-18414.
- Münger K., Phelps W.C., Bubb V., Howley P.M. & Schlegel R. (1989). 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(19): 4417-4423.
- Ong C.K., Chan S.Y., Campo M.S., Fijunaga K., Mavromara N.P., Labropoulou V., Psfister H., Tay S.K., Meulen J., Villa L.L. & Bernard H.-U. (1993). 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.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. & Sekiya T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86(8): 2766-2770.
- Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. & Hayashi K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 5: 874-879.
- Phelps W.C., Yee C.L., Münger K. & Howley P.M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*. 53(4):539-547.
- Pirisi L., Yasumoto S., Fellery M., Doninger J.K. & DiPaolo J.A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol*. 61(4): 1061- 1066.
- Roman A. & Fife K.H. (1989). Human papillomaviruses: are we ready to type? *Clinical Microbiology Reviews*. 2 (2): 66-190.
- Sarkar G., Yoon H.S. & Sommer S.S. (1992). Screening for mutations by RNA single-

strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res.* 20(4): 871-878.

Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine J.M. & Howley P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63(6): 1129-1136.

Scheffner M., Münger K., Byrne C. & Howley P.M. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:5523-5527.

Schiffman M.H., Bauer H.M., Hoover R.N., Glass A.G., Cadell D.M., Rush B.B., Scott D.R., Sherman M.E., Kurman R.J. & Wacholder S. (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.*, 85: 958-964.

Seedorf K., Krämmer G., Dürst M., Suhai S. & Röwenkamp W.G. (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology.* 145: 181-185.

Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstrom D.W. & Stone E.M. (1993). The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics.* 16: 325-332.

Slebos R.J.C., Lee M.H., Plunkett B.S., Kessis T.D., Williams B.O., Jacks T., Hedrick L., Kastan M.B. & Cho K.R. (1994). p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 91(12): 5320-5324.

Song Y.S., Kee S.H., Kim J.W., Park N.H., Kang S.B., Chang W.H. & Lee H.P. (1997). Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and non-cancerous lesions of Korean women. *Gynaecologic Oncology.* 66: 275-281.

Steger G. & Corbach S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *Journal of Virology.* 71: 50-58.

Stoler M.H., Rhodes C., Whitbesk A., Wolinsky S., Chow L.T. & Broker T.R. (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Human Pathol.* 23: 117-128.

Stöppler C.M., Ching K., Stöppler H., Clancy K., Schlegel R. & Icenogle J. (1996). 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(10): 6987-6993.

- Sousa R., Dostatni N. & Yaniv, M. (1990). Control of papillomavirus gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1032: 19-37.
- Tan S.-H., Leong L.E.-C., Walker P.A. & Bernard H.-U. (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *Journal of Virology*. 68: 6411-6420.
- Tanaka A., Noda T., Yajima H., Hatanaka M. & Ito Y. (1989). Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 63(3): 1465-1469.
- Terry G., Ho L. & Cuzick J. (1997). Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *Int J Cancer*. 73: 651-655.
- Van Ranst M., Kaplan J.B. & Burk R.D. (1992). Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol*. 73: 2653-2660.
- Veress G., Szarka K., Dong X.P., Gergely L. & Pfister H. (1999). Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*. 80: 1035- 1043.
- Villa L.L., Sichero L., Rahal P., Caballero O., Ferenczy A., Rohan T. & Franco E.L. (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 81: 2959-2968.
- Von Knebel Doeberitz M., Oltersdorf T., Schwarz E. & Glissmann L. (1988). Correlation of modified human papillomavirus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res*. 48:3780-3786.
- Von Knebel Doeberitz M., Rittmüller C., Aengeneyndt F., Jansen-Dürr P. & Spitkovski D. (1994). Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRb interactions. *J Virol*. 68: 2811-2821.
- Vousden K.H., Doniger J., DiPaolo J.A. & Lowy D. (1988). The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res*. 3(2):167-175.
- Watanabe S. & Yoshiike K. (1988). Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus type-18 DNA. *Int J Cancer*. 41(6): 896-900.
- Wazer D.E., Liu X.L., Chu Q., Gao Q. & Band V. (1995). immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*: 92(9): 3687- 3691.

Werness B. A., Levine A. & Howley P. A. (1990). Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 248: 76-79.

White A.E., Livanos E.M. & Tlsty T.D. (1994). Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev*. 8(6): 666-677.

Xi L.F., Koutski L.A., Galloway D.A., Kuypers J., Hughes J.P., Wheeler C.M., Holmes C. & Kiviat N.B. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 89: 796-802.

Xi L.F., Critchlow C.W., Koutski L.A., Galloway D.A., Kuypers J., Hughes J.P., Hawes S.E., Surawicz C., Wheeler C.M., Goldbaum G., Holmes C. & Kiviat N.B. (1998). Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Research*. 58: 3839-3844.

Yamada T., Wheeler C.M., Halpern A.L., Stewart A-C.M., Hildesheim A. & Jenison S.A. (1995). 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*. 69(12): 7743-7753.

Yamada T., Manos M.M., Peto J., Greer C.E., Muñoz N., Bosch F.X. & Wheeler C.M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 71(3): 2463-2472.

Zehbe I., Wilander E., Delius H. & Tommasino M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Research*. 58: 829-833.

zur Hausen H. (1986). *Viruses and Cancer*. En: Genital Papillomavirus infections. Cambridge University Press, pp. 83-90.

zur Hausen H. (1996). Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta BBA*. 1288:F55-F78.