



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES DE LAS VARIANTES  
ASIÁTICO-AMERICANAS DEL VIRUS DE PAPILOMA  
HUMANO (HPV) EN LA POBLACION MEXICANA

**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 :  
**ARTURO AGUILAR ROJAS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS



280034



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis.  
Estudio de casos y controles de las variantes Asiático-  
Americanas del Virus de Papiloma Humano (HPV) en la  
población mexicana  
realizado por

Arturo Aguilar Rojas

con número de cuenta 9025000-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. Jaime Berumen Campos

Propietario

M. en C. Rosa María Ordóñez Razo

Propietario

Dra. Alejandra Mainero del Paso

Suplente

Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

Suplente

M. en I.B.B. Claudia A. Segal Kischinevzky

FACULTAD DE CIENCIAS

U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*Edna María Suárez Díaz*

Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

**Estudio de casos y controles de las variantes Asiático-  
Americanas del Virus de Papiloma Humano (HPV) en  
la población mexicana**

La presente tesis se realizó en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación en el área de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, UDEFA, bajo la tutoría del Dr. Jaime Berumen Campos.

Quisiera agradecer a los miembros del Jurado por la revisión del presente trabajo. Al Dr. Jaime Berumen, por todo lo aprendido en este tiempo, a Rosy por su interminable paciencia, a Ale porque le debo mas de lo que piensa, a Lichi y Claudia por su calma y su amistad.

Quisiera dedicar este trabajo a mi ángel de la guarda,  
por cuidar siempre de mí .

Gracias Jose...

## INDICE

### - Introducción

Características del Virus de Papiloma Humano . . . . . 1

Variantes virales del HPV-16 . . . . . 6

Epidemiología del Cáncer de Cérvix . . . . . 9

- *Justificación* . . . . . 12

- *Objetivo* . . . . . 15

- *Materiales y  
Métodos* . . . . . 16

- *Resultados* . . . . . 25

- *Discusión* . . . . . 29

- *Conclusiones* . . . . . 33

- *Referencias* . . . . . 34

## INTRODUCCION

La incidencia del Cáncer cervicouterino a nivel mundial es una de las mas altas, representando el segundo cáncer mas frecuente en mujeres después del cáncer de mama (Parkin *et al*, 1993). Tiene una incidencia de 10 casos por cada 100,000 mujeres por año en países industrializados y una tasa de 40 por cada 100,000 en países en vías de desarrollo (Parkin *et al*, 1993). Se estima que el 80% del medio millón de casos que ocurren anualmente en el mundo se presentan en países en vías de desarrollo (Muñoz y Bosh, 1997). En México, la incidencia de cáncer cervical es muy elevada, con un promedio de 40 casos por cada 100,000 mujeres. y solo para el año de 1995 se reportaron 16,000 nuevos casos (Lazcano-Ponce *et al*, 1996). La alta incidencia de la enfermedad en países en vías de desarrollo está relacionada con la baja cobertura y eficiencia de los programas de detección oportuna del cáncer (Nelson, Averrete y Richard, 1984 y Wheeler, 1997).

El desarrollo de carcinomas cervicales está íntimamente relacionado con la presencia de algunos tipos de Virus de Papiloma Humano (HPV) como son el HPV tipo 16 y 18. Además, se sabe que factores de riesgo, como el fumar, la toma de anticonceptivos orales e infecciones recurrentes, podrían estar involucradas en la progresión de la enfermedad (Ylitalo *et al*, 1999). Asimismo, se ha propuesto que pudieran estar involucrados otros factores de riesgo relacionados con la capacidad transformante del Virus de Papiloma Humano

### **Características del Virus de Papiloma Humano.**

Los Virus de Papiloma son una familia marcadamente heterogénea especie específica. Son capaces de inducir lesiones benignas, premalignas y malignas en la piel, incluyendo verrugas escamosas y papilomas



en tracto respiratorio alto, conjuntiva y región anogenital. Se han identificado más de 80 genotipos diferentes de Virus del Papiloma Humano, la mitad de estos se han asociado con lesiones del tracto anogenital. Sólo ciertos tipos de HPVs participan en el desarrollo de lesiones malignas, como los carcinomas de células escamosas, incluidos el cáncer de cervix y el cáncer de cavidad oral.

Esta familia viral se ha dividido en virus de alto riesgo, de riesgo intermedio y bajo riesgo, de acuerdo a su capacidad para transformar células epiteliales. Los virus de bajo riesgo, son incapaces de interactuar con las proteínas celulares p53 y pRb, por el contrario, estas son eficientemente desreguladas por las oncoproteínas E6 Y E7 de los virus de alto grado (Myers y Androphy, 1995). Otra diferencia importante, es la capacidad de los virus de alto grado, para promover aberraciones cromosómicas en las células infectadas.

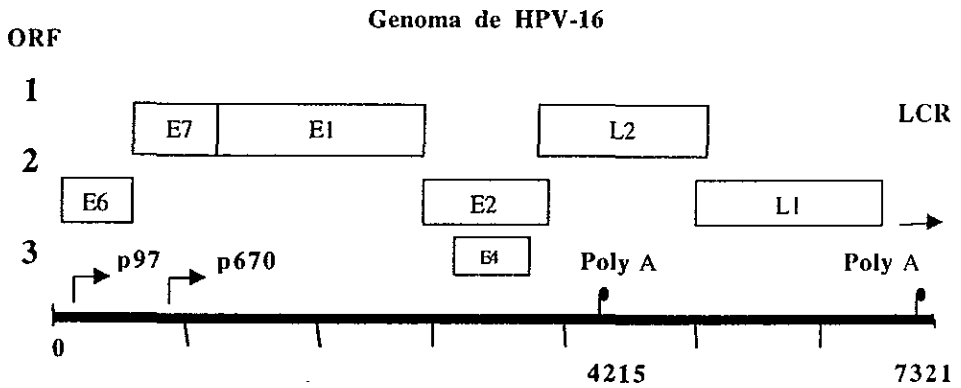


Figura 1. Esquema donde se representan los marcos de lectura (ORF), secuencias promotoras (p97, p670), regiones de poliadenilación (Poly A) y la región larga de control (LCR) presentes en el genoma de Virus de papiloma humano tipo 16.

Los miembros de esta familia son virus de DNA de doble cadena de aproximadamente 8,000 nucleótidos de extensión. Causan tumores epiteliales benignos o malignos y verrugas. La infección con estos virus es frecuente en niños y es una de las principales enfermedades de transmisión sexual en adultos, en donde es capaz de causar verrugas en pene, vulva, recto y cérvix. El ciclo de replicación de estos virus está íntimamente acoplado al de las células epiteliales que infecta. La primera infección se da en la parte basal de los epitelios. La transcripción y la replicación viral, son mantenidas a niveles bajos hasta que la célula alcanza los estratos superiores de los epitelios, momento en el que son ensamblados los viriones.

Los análisis de los RNAm sintetizados por el virus y su secuencia, han puesto de manifiesto que existen ocho marcos de lectura. Estos han sido clasificados de acuerdo a su expresión durante la infección como tempranos (E) y tardíos (L) (Tabla 1, Fig. 1). Sólo una de las cadenas de DNA funciona como templado para la transcripción.

En enfermedades pre-neoplásicas, el DNA viral se detecta como un episoma, mientras que en cánceres está frecuentemente integrado. Se cree que la integración del virus es un paso importante en la progresión del tumor, con la sobre expresión de las oncoproteínas E6 y E7, debido a la pérdida de las proteínas regulatorias E1 y E2 al momento de la integración (Jeon y Lambert, 1995 y Choo, 1987). Sin embargo, el DNA viral no se encuentra siempre integrado en carcinomas, presentándose frecuentemente también en forma episomal o en una combinación de ambas (Matsukura, 1989 y Berumen *et al*, 1994,).

La capacidad de los HPV para transformar las células epiteliales, está relacionada con la actividad de las proteínas E6 y E7. La función viral de E6 y E7 podría ser el controlar el ambiente celular para favorecer la replicación del genoma viral, por medio de la activación de la transcripción e inducción de la síntesis de

DNA promoviendo la inhibición de la diferenciación y la promoción del crecimiento celular (zur Hausen y Villiers, 1994).

### Proteína y secuencia regulatoria presente en los HPV

Proteína	Función	Actividad
LCR	Región larga de control	Regula la transcripción de E6 y E7
E6	Inmortaliza	Se une a p53 e induce su degradación
E7	Inmortaliza y transforma	Se une a Rb inhibiéndolo.
E2	Regula transcripción viral	Se une al DNA. Coopera con E1 en la replicación viral.
E1	Participa en la replicación viral	Inicia la replicación. Modula la función de E2.
L1 y L2	Proteínas de la cápside	
E4	Maduración viral.	

Tabla 1. Secuencias regulatorias y marcos de lectura presentes en los HPV y sus funciones.

E6 es una proteína del virus básica de un peso aproximado de 18 kDa. Es capaz de unirse a la proteína celular p53, favoreciendo su degradación (Myers y Androphy, 1995). Los HPV de bajo riesgo son incapaces de degradar a esta proteína. La oncoproteína viral E7 tiene un peso aproximado a 20 kDa y es capaz de favorecer la inmortalización celular mediante la interacción con la proteína de retinoblastoma (pRb) favoreciendo su desestabilización (Munger y Halpern, 1997).

p53 es una proteína celular que funciona como factor de transcripción, es capaz de regular el crecimiento normal de una célula, activando diversos genes a través del ciclo celular, favoreciendo el arresto del mismo en fase G1 cuando se detecta daño en el genoma y siendo capaz de promover apoptosis cuando

## Participación de p53 y pRb dentro del ciclo celular.

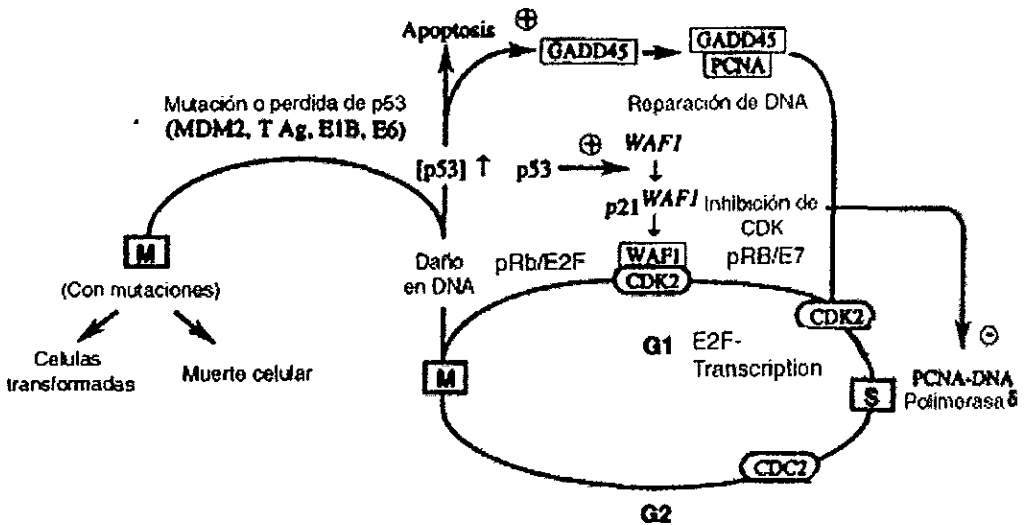


Figura 2. Esquema donde se muestra la actividad de p53 y pRb dentro del ciclo celular.

el daño es irreparable. p53 es fosforilado al detectarse daño en el genoma celular por proteínas como la ciclina B/CDC2 o ciclina A/CDK2, favoreciendo una fuerte interacción con WAF1. Esta es una proteína capaz de detener el ciclo celular en G1 al evitar la activación de ciclinas/CDKs. También p53 es capaz de activar a GADD45, una proteína que a su vez activa a PCNA, una proteína involucrada en la reparación del DNA y la inactivación de la DNApol, evitando la síntesis del material genético dañado. Por último p53 es capaz de favorecer la apoptosis en la célula si el daño no es reparable. Es por esto que cuando p53 se encuentra deletado o ausente (causado por E6 de virus del papiloma humano) la célula es incapaz de

regular su crecimiento, y se adquiere un fenotipo transformante (Fig.2) (Robin Hesketh, 1997).

pRB es una proteína que funciona como transductor de señales, regulando el ciclo celular y la expresión coordinada de algunos factores de transcripción involucrados en la replicación de genes que participan en la síntesis de DNA para pasar de G1 a S y proliferar durante el ciclo celular (Robin Hesketh, 1997).

pRB, se une a una gran cantidad de proteínas, pero una de las principales es el factor de transcripción E2F1. Al no estar fosforilado pRB, se encuentra fuertemente unida a E2F1, al fosforilarse o al desestabilizarse la unión por la presencia de oncoproteínas virales (E7), pRB es capaz de perder su unión a E2F1, lo cual lo capacita para iniciar la síntesis de proteínas involucradas en la replicación del DNA y entrar a fase S (Fig. 2) (Robin Hesketh, 1997).

E6 y E7, son regulados de manera negativa por la proteína E2. E2 es una proteína de 48 kDa, que es capaz de inhibir la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7. Otra función de E2 es regular la transcripción del virus (McBride y Myers, 1997). Además, junto con la proteína E1, E2 es capaz de unirse a sitios regulatorios de la replicación. La proteína E1 presenta actividad de helicasa, mientras que E2 se une a diversos factores regulatorios dentro del genoma del virus (McBride y Myers, 1997).

Por último, las proteínas L1 y L2 están involucradas en la formación de la cápside viral.

### **Variantes virales del HPV-16.**

Debido a la falta de sistemas de clasificación serológica, los distintos tipos de HPV se han tipificado de acuerdo a su genotipo. La identificación de un nuevo tipo de HPV se basa en la secuencia de nucleótidos de todo el virus. En base a esto, un aislado de HPV novedoso es reconocido como un nuevo tipo de HPV

si la secuencia de nucleótidos puede demostrar que tiene menos del 90% de similitud con la secuencia de nucleótidos de un tipo de Virus de Papiloma establecido. Actualmente, mas de 90 tipos de HPVs son conocidos y son usados como una medida del riesgo de desarrollar cáncer cervical invasor (Van Rast *et al.*, 1993).

En los primeros estudios, un subtipo de HPV se clasificaba como aquel que tenía hibridación cruzada bajo condiciones estrictas con un HPV prototipo, pero con un patrón de digestión distinto del patrón del HPV prototipo. Por otro lado, una variante de HPV se definía como un virus que difería del prototipo por un indefinido pero limitado número de diferencias nucleotídicas. Dependiendo de si las diferencias en nucleótidos dan como resultado diferencias en el patrón de restricción, un subtipo y una variante se pueden translapar dentro de esta nomenclatura, por lo que para mantener la definición del tipo viral, es mejor utilizar una definición cuantitativamente similar. Así, un subtipo se define como aquel que tiene entre el 90 – 98% de homología con un tipo de HPV establecido. Si un aislado tiene mas del 98% de homología puede ser considerado como una variante y si tiene menos del 90% de homología puede considerarse como un nuevo tipo de HPV (Van Rast *et al.*, 1993).

Así como se ha encontrado que la mayoría de los genotipos de HPV están asociados con enfermedades específicas, (como es el desarrollo de cáncer cervical en pacientes infectadas con virus de alto riesgo principalmente HPV-16 y 18) también se han encontrado variantes que ocurren naturalmente dentro de un número de genotipos (Ho *et al.*, 1991) y algunas tienen diferencias marcadas en sus funciones (Icenogle *et al.*, 1995).

Al iniciarse la tipificación de HPV-16 Ho *et al.*, propusieron que la acumulación de puntos mutacionales ocurrirían con mayor frecuencia en el LCR del virus, ya que esta región difiere sustancialmente entre los

diferentes tipos virales sin perder su función, además de que han sido reportadas mutaciones naturales dentro de esta región.

En base a lo anterior, Ho *et al* identificaron cinco ramas filogenéticas distintas analizando el LCR de 301 aislados colectados en Europa, Asia, Africa y América. Las ramas fueron designadas como Europeas (E), Asiáticas (As), Asiático-Americanas (AA), Africanas (Af1), Africanas 2 (Af2) de acuerdo a su distribución por continente. El genoma de HPV-16 de referencia es miembro del linaje E. Estas ramas se toman como clases de HPV-16 y dentro de estas también existen subclases. Después, en 1995 Yamada *et al*. lograron distinguir un número mas grande de grupos que los definidos con el LCR, al caracterizar las mutaciones puntuales presentes en las regiones codificantes E6, L2 y L1. Aquí, los autores encontraron una nueva subclase de la clase E que denominaron G131 y una nueva que llamaron NA (norteamericana), ya que la encontraron en un estudio hecho con muestras procedentes de Estados Unidos. Con esto vieron que la secuencia E6 provee mas información filogenética que la secuencia de LCR, por lo que de todas las regiones examinadas, E6 es una mejor elección para distinguir las variantes de HPV-16.

En la tabla 2 se resumen la nomenclatura y los cambios encontrados en las regiones E6, L1 y la LCR de las clases y subclases de las variantes de HPV-16 encontradas en estos estudios. Para la nomenclatura se tomaron en cuenta como secuencia de referencia al genoma de HPV-16 que originalmente fue clonado a partir de una paciente alemana y a los aislados que tienen diferencias mutacionales con respecto a esta clona se les denomina variantes. Para distinguir las subclases se toma en cuenta el cambio de nucleótidos en el gen E6 y su posición, por ejemplo, la subclase E-G131, es una subclase de la clase Europea con un cambio por una G en la posición 131 del gen E6 (Yamada *et al*, 1997)

## **Epidemiología del Cáncer de Cérvix.**

El análisis de secuencias del DNA de las regiones L1, E6, E7 y la LCR de HPV-16 ha demostrado que existen numerosas variantes de forma natural para este tipo viral (Ho *et al*, 1993A, 1991, 1993B), las cuales presentan cambios en la estructura y función de las proteínas codificadas por estos genes. En base a los cambios en la secuencia de nucleótidos, las variantes virales se han clasificado filogenéticamente (Yamada *et al*, 1997). Las variantes Asiático/Americanas (AA) se encuentran principalmente en Sur América, América Central y España, las variantes Africanas (Af) en Africa, las variantes Asiáticas (As) al Sudeste de Asia y las variantes Europeas (E) en el resto del mundo exceptuando Africa.

No ha sido posible determinar una asociación significativa entre la positividad para el HPV y la prevalencia de algunos tipos virales en países de alta y baja incidencia de cáncer cervical (Bosch *et al*, 1995 y Parkin, Pisani y Ferlay, 1985). Por otro lado, es aún controversial la relación entre tipos de HPV y su agresividad clínica (Higgins *et al*, 1991 y Yang *et al*, 1997). Sin embargo, se ha podido correlacionar que existen algunas variantes de HPV que prevalecen en lesiones de alto grado (Xi *et al*, 1997 y Londesborough *et al*, 1996), carcinomas invasores (Zehbe *et al*, 1998) o en tipos histológicos de cánceres mas agresivos (Lizano *et al* 1997).

Se ha comprobado que en la población mexicana, la prevalencia de las variantes AA del HPV-16 en muestras de cáncer cervicouterino es muy alta (23%) (Casas *et al*, 1999). De acuerdo a un reporte de Yamada estos porcentajes son menores en las poblaciones de Europa y Sudamérica (Yamada *et al*, 1997).



## Cambios en la secuencia presentes en las variantes de HPV

	E6	L1:MY09/11	LCR	
	111111111111222222223345	6666666666666666	777777777777777777777777	
	033334467788556688993503	678888889999999	4445566666667777777788888	
	912573516838567956955032	92025666035679	88902146708123456888923334	
		51364258418504	59671139089490324167264792	
Ref.	TAGATCCCGCTTCCCGCTATCTAA	AGACCTCAATCACC	ACTAGATCAACTAATFACTCTCCCGAAG	
OR. 5110	-----	-----	-----	E-P
OR. 4724	-----	-----	-----	E-P
OR. 6311	-----T-----G-----	-----	-----	E-P
OR. 4997	-----AA-----C-----	-----	-----	E-P
IS. 643	-----	-----C-----	-----A-----	E-m
OR. 6170	C-----	-----	-----	E-C109T
OR. 8329	C-----	-----G-----	-----	E-C109G
OR. 9237	G-----	-----G-----	-----C-----C-----	E-G131C
OR. 0198	G-----	-----G-----	-----C-----	E-G131G
IS. 105	-----A-----	-----	-----C-----	E-A176T
IS. 244	-----A-----	-----	-----	E-A176A
IS. 463	-----A-----	-----A-----	-----	E-A176A
IS. 489	-----A-----	-----G-----	-----	E-A176G
IS. 925	-----A-----	-----T-----	-----	E-A178T
IS. 1032	-----A-----	-----T-----	-----C-----	E-A178T
IS. 164	-----C-----	-----	-----	E-C188T
IS. 7	-----C-----	-----C-----	-----	E-C188C
OR. 7574	-----G-----	-----	-----A-----C-----C-----	As
OR. 5428	-----G-----	-----	-----A-----C-----	As
OR. 7587	--C--GT-----AG-T--	A--T-----TA	A--A-----A-----T-T--T--	Af1-a
OR. 1905	--C--GT-----AG-T--	A--T-----TA	A--A-----A-----T-T--T--	Af1-a
IS. 393	--C--GT-----AG-T--G	A--T-----C-TA	A--AG-----A-----T-T--T--	Af1-b
IS. 845	G--GT-----C-----AG-T--	A--T-----TA	A--A-----A-----T-T--T--	Af1-c
IS. 398	G--GT-----AGTIG--	A--T-----TA	A--A-----A-----T-T--T--	Af1-d
IS. 818	G--GT-----AGTIG--	A--T-----TA	A--A-----A-----T-T-G-T--	Af1-d
IS. 347	---GTG---T-----AGTIG--	A--T--G---TA	A--A--T--A-----T-T--T--	Af1-e
OR. 7145	C-T--GT-----AG-T-G	CA--T-T-----TA	CA--A--T-----T-T--ATCG--	Af2-a
OR. 3759	C-T--GT-----AG-T-G	CA--T-T-----TA	CA--A--T-----T-T--ATCG--	Af2-a
IS. 812	C-T--GT-----AG-T-G	CC--T-T-----TA	CA--A--T-----T-T--A-CO--	Af2-a
IS. 170	C-T--GT-----AG-T-G	CA--T-T-C-----TA	CA--A--T-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 808	---GT-----AG-T--	CA--T-T-----TA	CA--A--T-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 846	---GT-----AG-T--	CA--T-T-----TA	CA--A-GT-----T-T--ATCC--	Af2-b
IS. 177	---GT-----AG-T--	CA--T-T-----TA	CA--A--T-GA-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 825	---GT-----AG-T--	CA--T-T-----TA	CA--A--T-GA-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 830	--C--GT-----AG-T--	CA--T-T-----TA	CA--A-GT-----T-T--ATC--	Af2-b
IS. 811	--V-AGT-----GAG-T--	CA--T-T-----TA	CA--A-TG-A-----T-T--ATC--	Af2-c
IS. 815	---AGT-----CAG-T--	CA--T-T-----TA	CA--A-TG-A-----T-T--ATC--	Af2-c
OR. 3136	-----T-----AG-TG--	CA--T-T-----TA	CA--A--T--A-C--T-T--AT--	NA1
IS. 42	-----T-----AG-TG--	CA--T-T-----TA	CA--A--T--A-C--T-T--AT--	NA1
OR. 8160	-----T-----AG-TG-G	CAT-T-T-----TA	CA--A--T--A-C-G-T-T-----	AA-a
OR. 4541	-----T-----AG-TG-G	CAT-T-T-----TA	CA--A--T--A-C-GCT-T-----	AA-a
IS. 545	-----T-A-----AG-TG-G	CAT-T-T-----TA	CA--A--T--A-C-G-T-T-----	AA-a
IS. 21	-----T-----AG-TG-G	C-----T-T-----TA	CA--A--T--A-C-G-T-T-----	AA-b
IS. 53	-----T-G-----AG-TG-G	CA--TCT-----TA	CA-GA--T--A-C--T-T-----	AA-c
IS. 111	-----T-----AG-TG-G	CA--TCT-----TA	CA-GA--T--A-C--T-T-----	AA-c

Tabla 2. Representación de los cambios presentes en cada variante de HPV-16, dentro de los marcos de lectura de E6, L1 y del LCR (Yamada *et al*, 1997).

Además, estas variantes virales han presentado un elevado número de mutaciones en el gen E2, y un mayor número de copias virales por célula (Casas *et al*, 1999).

En otro estudio, realizado en pacientes mexicanas con cáncer cervical que presentaban variantes AA, se encontró que el rango de edad en las pacientes fue de diez años menor comparado con las que presentaban las variantes Europeas (Casas *et al*. 1999). La proteína E2 de la subclase AA-c era incapaz de reprimir la expresión *in vitro* de las oncoproteínas E6/E7, mientras que la subclase AA-a reprimía de una forma menos eficiente que la variante Europea (Ordóñez *et al*, en prensa). Por otro lado, otros trabajos han demostrado que la oncoproteína E6 de las variantes AA, es capaz de degradar de forma mas eficiente a la proteína p53 (Stoppler *et al*, 1996). Con todo lo anterior, es probable que las variantes AA - principalmente la AA-c- sean mas oncogénicas (Rolighed, Bichel, Lindeberg, 1997), lo cual podría explicar la alta incidencia de la enfermedad en la población mexicana.

## JUSTIFICACION

El cáncer cervical es uno de los mayores problemas de salud pública en una gran parte de América Latina, ya que es aquí en donde se ha reportado una mayor incidencia de la enfermedad (Restrepo *et al*, 1987). De acuerdo a estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer), la tasa de incidencia de cáncer cervical invasivo en México, es una de las mas altas a nivel mundial, con una estimación anual de 40.17 por 100,000 casos anualmente (Parkin *et al*; 1993). En un estudio realizado por la Organización Panamericana de la Salud se clasificaron 20 países de acuerdo a sus tasas de mortalidad por cáncer cervical en grupos de mujeres de 35 a 64 años de edad. Los países con mayores tasas de mortalidad fueron Jamaica, México, Chile y Nicaragua (PAHO, 1994).

Se sabe que el riesgo de desarrollar cáncer cervical está fuertemente relacionado con infecciones crónicas con el virus del papiloma humano (HPV), y que estas infecciones son mas frecuentes en mujeres sexualmente activas. A pesar de que se sabe que el riesgo de infección con el Virus del Papiloma es muy elevado a través de la vida, sólo aquellos pacientes infectadas con HPVs de alto riesgo (95%) son capaces de desarrollar cáncer (Syrjanen, 1996). Tambien, se ha propuesto que pueden existir otras causas que pueden influir en el desarrollo de cáncer cervical, dentro de las que se incluyen el fumar, la administración de anticonceptivos orales, un elevado número de partos, infecciones recurrentes, y una mala detección por los estudios citológicos implantados en los programas de salud (Ylitalo *et al*, 1999). En 1974, en México fue implantado en el programa de salud pública la revisión citológica anual para detectar el cáncer cervical, pero no fue hasta 1996, que este estudio fue establecido en el programa de salud pública para todas las mujeres sexualmente activas (SS, 1996). En un estudio de casos y controles

realizado en la ciudad de Guadalajara, se detectó que a pesar de que la prueba citológica se realiza de forma adecuada, el impacto del estudio es muy bajo, y que es necesario realizar campañas para aumentar el impacto del estudio sobre la población (Jiménez-Pérez y Thomas, 1999).

Entre 1980 y 1990, la tasa de mortalidad por cáncer cervical se incrementó en México para algunos grupos de edades. La tasa de mortalidad para mujeres mayores de 15 años de edad durante 1990 fue de 16.1 por cada 100,000 casos (Lazcano-Ponce *et al*, 1996). La tasa de mortalidad para el Estado de Jalisco entre mujeres de 25 años o mas, se elevó de 22.7 por cada 100,000 casos en 1973 a 26.0 por cada 100.000 casos en 1992 (SSJ, 1996).

En trabajos previos se ha demostrado que la proteína E6 de las variantes Asiático-Americanas del HPV-16 son capaces de degradar de forma mas eficiente a la proteína p53 (Stoppler *et al*, 1996), lo cual podría favorecer una mayor oncogenicidad. También se ha demostrado que en la población mexicana, las variantes AA son mas frecuentes en comparación con otros países, asociandose ademas, a mujeres con cáncer diez años menores en comparación con pacientes que presentaban las variantes Europeas. Por último, también se demostro que la proteína E2 presentaba numerosas mutaciones en su secuencia, lo cual podría estar relacionado con una menor regulación de E6 y E7, promoviendo la transformación mas rapida de las células (Rolighed, Bichel y Linderberg, 1997).

El incremento en los últimos años en la tasa de mortalidad por cáncer cervical presente en México, no puede ser explicada de forma sencilla. La implantación de la prueba citológica no ha logrado disminuir la alta tasa de mortalidad y el aumento en la incidencia de la enfermedad en la población y, aunque es cierto que esta pudiera deberse a su baja cobertura, es probable que no sea esta la única causa. La alta

prevalencia de las variantes Asiático-Americanas en la población mexicana, pudieran explicar la alta incidencia de la enfermedad.

## **OBJETIVO**

**Determinar la frecuencia en la que se presentan las variantes AA en un estudio de casos y controles y determinar si existe alguna asociación entre esta y la incidencia de cáncer cervical en México.**

## MATERIALES Y METODOS

### Diseño General.

Se realizó la detección y tipificación de HPV por medio de la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y se secuenciaron un total de 138 muestras de raspados cervicales en pacientes control clínicamente sanas y 48 raspados de pacientes con cáncer cervicouterino (2.8 muestras controles por cada caso de cáncer cervical), procedentes de la clínica Gineco-Obstétrica No. 4 del IMSS, en la Ciudad de México.

Se obtuvo el DNA de los raspados, y se detectó el HPV mediante la técnica de PCR utilizando 3 juegos distintos de oligonucleótidos universales para HPV dentro de la región de L1 (MY 09/11, GP5+/GP6+ y L1C1/L1C2). Las muestras que fueron positivas para la PCR con cualquiera de estos oligonucleótidos, fueron tipificadas mediante secuenciación por el método de PCR utilizando nucleótidos fluorescentes. El análisis de las secuencias se realizó en un Analizador Automático de DNA. Las muestras positivas para HPV-16, fueron amplificadas nuevamente utilizando oligonucleótidos específicos para L1/MY de HPV-16 y secuenciadas como se describe arriba. La identificación de variantes se hizo utilizando la clasificación descrita por Yamada *et al*, 1997.

## **Detección y Tipificación de HPV y variantes de HPV-16.**

### **Muestras Biológicas.**

Las muestras se obtuvieron mediante raspados cervicales de endo y exocérnix, utilizando pequeños cepillos (citobrush), los cuales fueron colocados posteriormente en tubos Eppendorf con 750 µl de amortiguador de extracción (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0 y SDS 0.5%).

### **Purificación de DNA.**

De los raspados obtenidos se extrajo y purificó el DNA de cada una de las muestras por el procedimiento de dodecil sulfato de sodio-proteinasa K y extracción con fenol (Sambrook et al, 1989). Este procedimiento consiste en digerir las células cervicales con proteinasa K, al sobrenadante se le agrega LiCl 0.8 M y se precipita el DNA con NaCl 0.2 M y un volumen de isopropanol. Después de esto, se lava con etanol al 70% tres veces, se seca el precipitado y se resuspende en agua estéril (50 µl).

### **Amplificación y tipificación de las muestras por medio de la técnica de PCR.**

Una vez purificado el DNA, se identificaron las muestras positivas para HPV-16. Para verificar la integridad del DNA, en todas las muestras se amplificó el gen  $\beta$ -globina utilizando los oligonucleótidos PCO4 5'-CAACTTCATCCAACGTTACC-3' y GH20 5'- GAAGAGCCAAGGACACGGTAC-3'. Para la detección de HPV-16, se utilizaron tres juegos distintos de oligonucleótidos universales dentro de la región de L1 en todas las muestras a explorar (Tabla 3, Figura. 3).



Para la reacción de PCR se hicieron ensayos por separado para cada juego de oligonucleótidos dentro de cada experimento se incluyó un control negativo (500 ng de DNA de células sanguíneas agua destilada) y controles positivos (1 ng de DNA viral). Los controles negativos se utilizaron para verificar las reacciones de PCR no específicas del DNA genómico presente de las células cervicales y posibles contaminaciones. Los controles positivos se utilizaron para evaluar el nivel de sensibilidad de la PCR, siendo este de 100 fg de DNA de HPV-16.

### Características de los oligonucleótidos utilizados

Pareja de oligonucleótido	Región	Secuencia	Tm	Tamaño del fragmento amplificado
MY 09/11	5'	CGTCCMARRGGAWACTGATC	62	450
	3'	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	60	
GP5+/GP6+	5'	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC	62	150
	3'	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	60	
LIC1/LIC2	5'	CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT	62	244
	3'	GTTATGTCTCATAAATCCCAT	56	
16 MY11	5'	GCACAGGGCCACAATAATGG	62	452
16MY09	3'	CGTCCTAAAGGAAACTGATCTA	62	

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se muestran los oligonucleótidos universales (My09/11, Gp5+/Gp6+, LIC1/LIC2) y los específicos para HPV-16 (16 MY11/ 16 MY09).

Para la reacción de la PCR, se colocaron 500 ng de DNA total y se aforó a un volumen de 50  $\mu$ l con los siguientes reactivos:

En el caso de MY 09/11, la mezcla contiene, Tris-HCl 30mM pH 8.8, MgCl<sub>2</sub> 3mM, KCl 50mM, 1mM de DTT, de cada desoxinucleósido trifosfatado (dNTP) 200  $\mu$ M, de cada oligonucleótido 1 $\mu$ M y una unidad de Taq DNA polimerasa (GIBCO-BRL).

### Posición relativa de los oligonucleótidos empleados

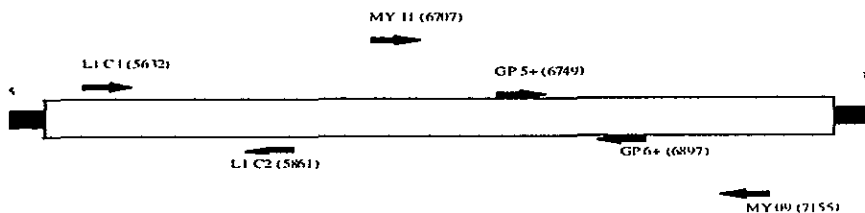


Figura 3. Localización de cada uno de los oligonucleótidos dentro del marco de lectura abierto (ORF) de L1. Se muestra una representación del ORF de L1 y la posición relativa de cada uno de los oligos dentro de la región, los primers 16 MY 09/11 presentan la misma posición que los oligos MY universales.

Con los oligos GP5+/6+ y L1C1/C2 la mezcla de reacción fue similar a la utilizada para los oligonucleótidos de MY, solo que el MgCl<sub>2</sub> se utilizó a una concentración final de 2mM.

En todos los casos se realizaron 40 ciclos de amplificación en un termociclador Gene-Amp 9600 (Perkin Elmer). Después de un ciclo de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, se llevaron a cabo los ciclajes con las condiciones de desnaturalización, alineamiento y polimerización, bajo

condiciones específicas para cada juego de oligonucleótidos (Tabla 4). Por último, se utilizó un paso de extensión a 94°C por siete minutos.

Una vez completadas las reacciones de PCR, las muestras se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados fueron visualizados por medio de un transiluminador con luz ultravioleta. Las bandas fueron cortadas y purificadas con el estuche comercial Quiaex (QUIAGENE) para su secuenciación posterior. Esto último es para evitar la introducción de falsas mutaciones en la secuencia producidas por la *Taq*Pol en la reacción de PCR.

#### Condiciones de la PCR para cada oligonucleótido

Región	Desnaturalización	Alineamiento	Polimerización
MY09/011	94°C - 30 seg	55°C - 1min 30 seg	72°C - 1 min 30 seg
GP5+/GP6+	94°C - 30 seg	40°C - 2 min	72°C - 1 min
L1C1/C2	94°C - 30 seg	48°C - 30 seg	72°C - 30 seg
16MY09/11	94°C - 30 seg	55°C - 1min 30 seg	72°C - 1 min 30 seg

Tabla 4. Condiciones del ciclaje para cada uno de los juegos de oligonucleótidos para la PCR. Se realizó un ciclo de 94°C por 3 minutos inicialmente, cuarenta ciclos con las condiciones arriba descritas, y una extensión de siete minutos a 94°C al final.

Para la detección de variantes virales, las muestras que al ser secuenciadas fueron positivas para HPV-16, se amplificaron con oligonucleótidos específicos para la región de L1/MY (16MY 09/11) de este

tipo viral, las condiciones y la posición relativa de los oligonucleótidos se presentan en la tabla 3 y Fig. 3, respectivamente.

### **Purificación de los productos de PCR.**

Una vez obtenidos los productos de PCR, fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5%, visualizadas en una lámpara de UV y cortadas. Para la purificación de estos fragmentos, se utilizó el estuche comercial de Qiaex (QUIAGEN) el cual se basa en la solubilización de la agarosa y la absorción selectiva del DNA en partículas de silica gel (QX1), en presencia de una elevada concentración de sales. El primer paso consistió en solubilizar la agarosa en el amortiguador QX2 que contiene una concentración alta de perclorato de sodio por 10 minutos a 50°C. Seguido a esto se hace un segundo lavado con este mismo amortiguador para retirar los residuos de agarosa. Después se hacen dos lavados con el amortiguador PE que presenta una alta concentración de etanol y remueve el exceso de sales. Finalmente se seca a temperatura ambiente, se resuspende en 15-20 µl de agua estéril y se deja eluyendo toda la noche a temperatura ambiente. Se centrifuga a 3000 rpm en una microcentrifuga durante tres minutos para sedimentar la resina y obtener el DNA eluido que permanece en el sobrenadante. El fragmento se verifica en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

### **Secuenciación.**

Las muestras de DNA purificadas, se preparan para su posterior secuenciación en el Analizador Genético ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer). La reacción de secuencia consiste en una mezcla de PCR mezclando en un tubo 8 µl del reactivo Ready Reaction Mix [(MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl pH 9.0, desoxinucleótidos trifosfatados (ddNTP) A-´Dye Terminator´, marcado con dicloro (R6G), C-´Dye Terminator´ marcado con dicloro (ROX), G-´Dye Terminator´ marcado con dicloro (R110) y T-´Dye Terminator´ marcado con dicloro (R110)].

Terminator' marcado con dicloro (TAMRA)]. La marca de estos reactivos es altamente sensible, contiene un colorante donador de fluoresceína ligado a un colorante aceptor de diclororodamina, además contiene a la AmpliTaq DNA polimerasa, FS (pirofosfatasa estable a la temperatura); todos estos reactivos están premezclados en un tubo. A la mezcla de PCR se le agregan de 30-90 ng de la muestra de DNA purificada, 3.2 pmol de oligonucleótidos elegidos para secuenciar y agua desionizada para completar un volumen final de 20  $\mu$ l. La excitación máxima de cada colorante marcado corresponde al donador de fluoresceína y el espectro de emisión es la del aceptor de Rodamina. El colorante donador ha sido optimizado para absorber la energía de excitación del láser de ion argón en los instrumentos del secuenciador.

Se procedió a amplificar las muestras en el termociclador Gene Amp 9600 (Perkin Elmer), con 25 ciclos bajo las siguientes condiciones, 10 seg de desnaturalización a 96°C, 5 seg de alineamiento a 50 °C y 4 min de extensión a 60 °C. Los productos de la PCR se limpian en columnas Centri-Sep (Perkin Elmer). Se ensambla la columna y se coloca 1 ml de agua desionizada, se dreña el agua y se deja empacar la resina. Sobre la parte superior se coloca toda la mezcla de reacción de la PCR, en la parte inferior de la columna se coloca un tubo Eppendorf y se centrifuga a 3000 rpm durante 2 min. se colecta la muestra y se seca al vacío. Esta es resuspendida en una solución de TE desnaturalizante. *se calienta por dos minutos en un baño a 94°C y se enfria inmediatamente en hielo por otros dos minutos como mínimo.*

Para el análisis electroforético de los fragmentos, el ABI-PRISM introduce automáticamente la muestra dentro de un capilar lleno de un polímero preformulado. Los fragmentos de DNA marcados migran a través del polímero y se separan de acuerdo a su tamaño. Cuando estos llegan a la ventana del capilar son iluminados y el marcador fluorescente unido al fragmento de DNA es excitado por un

rayo láser, emitiendo una luz de longitud de onda específica para cada marcador fluorescente. La luz es colectada y separada por un espectrógrafo de acuerdo a su longitud de onda. Al final de la corrida la computadora analiza automáticamente los datos colectados y los muestra en forma de electroferogramas en donde se incluye la secuencia de nucleótidos del fragmento. La secuencia obtenida en estas gráficas se compara con las reportadas en el Gene-Bank para los diferentes tipos de HPV y se obtiene un porcentaje de homología entre ellas.

### **Cálculo de la Razón de Momios (RM).**

La Razón de Momios (RM), es una comparación entre la frecuencia con que ocurre un daño en los individuos que tienen el factor de riesgo y la frecuencia con que acontece en aquellos que no tienen el factor de riesgo.

Los estudios analíticos están diseñados para determinar si existe una asociación entre la exposición a un factor y el desarrollo de la enfermedad.

En caso de que exista una asociación, la Razón de Momios indicará que tan fuerte es esta.

Para calcularla se utilizará la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de Momios (RM)} = \frac{a/n_i}{c/n_o}$$

Donde :

a = número de enfermos expuestos

n<sub>i</sub> = controles no expuestos

c = número de controles expuestos

n<sub>o</sub> = casos no expuestos

Cuando la RM es igual a 1, indica que el numerador es igual al denominador, y por lo tanto que la *incidencia o la mortalidad en los expuestos es igual a la de los no expuestos.*

Una RM mayor de 1 indica que los individuos expuestos tienen un riesgo mayor de desarrollar la enfermedad, comparados con los no expuestos.

Por último, una RM menor a 1, indica que los individuos expuestos tienen un riesgo menor de desarrollar la enfermedad comparados con los no expuestos. (La exposición puede ser un efecto *protector*).

## RESULTADOS

### Detección del DNA de HPV en las muestras.

De cientotrenta y ocho muestras controles obtenidas de pacientes clínicamente sanas, diecisiete (12.3%) fueron positivas para HPV-16 y cientoveintiuno (87.7%) fueron negativas para Virus del Papiloma tipo 16 (Tabla 3). Para los casos de cáncer cervical, se exploraron cuarenta y ocho muestras, de estas, veintitrés (47.9%) fueron positivas para HPV-16 y veinticinco (52.1%) fueron negativas para este tipo viral (Tabla 5).

**Tabla 5. Frecuencia de HPV-16 en los casos clínicos y grupo control.**

	Frecuencia (%)	
	Control n=138	Cáncer n=48
Positivos HPV-16	17 (12.3)	23 (47.9)
Negativos HPV-16	121 (87.7)	25 (52.1)

La tipificación de cada muestra positiva para HPV (Fig. 4) de cada muestra positiva se hizo mediante PCR/secuenciación de la región MY 09/11 preferentemente, en un Analizador genético automático (Fig. 5). La posición de las variaciones presentes en las variantes Asiático-Americanas, se muestran en la

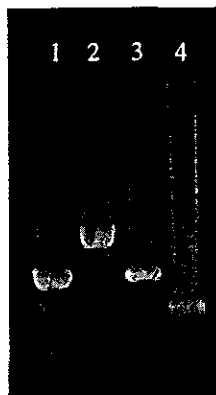


figura 5. Las diferencias presentes en las regiones secuenciadas son las siguientes, en el nt 6695 A/C, 6721 G/A, 6803 A/T, 6826 C/T, 6854 C/T, 6862 T/C y 6865 C/T (Yamada *et al.*, 1997).

### Tipificación de las muestras

Figura 4. Gel de agarosa donde se muestra los tres productos amplificados a partir de la PCR.

Carril 1,  $\beta$ -globina, carril 2, oligonucleótido MY09/11, carril 3, L1C1/L1C2 y carril 4 GP5+/GP6+



### Variantes virales.

De las muestras positivas para HPV-16, tanto para los casos de cáncer cervicouterino como para los controles, se tipificó la presencia de las variantes Asiático-Americanas o Europeas (Fig 5). En las muestras controles, se determinó que de las diecisiete muestras positivas para HPV-16, dieciseis presentan la variante Europea (94.1%), mientras que solamente una presenta una variante Asiático-Americana (5.9%) (Tabla 6 y Fig 5). Para el caso de las muestras con cáncer cervicouterino, se determinó, que de las veintitres muestras positivas para HPV-16, trece presentaban la variante Europea (56.5%) y diez presentaban variante Asiático-Americana (43.5%) (Tabla 6 y Fig 5).

**Tabla 6. Frecuencia de HPV-16, variantes Europeas (E) y Asiático-Americanas (AA) y riesgo relativo (RR) en los casos clínicos y grupo control.**

Grupo	n	HPV-16			HPV-16 (E)			HPV-16 (AA)		
		% (n)	RM	IC 95%	% (n)	RM	IC 95%	% (n)	RM	IC 95%
Control	138	12.3 (17)	1.0	-	94.1 (16)	1.0	-	5.9 (1)	1.0	-
Cáncer	48	47.9 (23)	6.5	0.055-0.142	56.5 (13)	2.8	0.053- 0.127	43.5 (10)	36.0	0.014-0.116

E = Variante Europea, AA = Variante Asiático-Americanas

RM = Razón de Momios, IC = Intervalos de Confianza

Por otro lado, al calcular la razón de momios (RM) en las pacientes con cáncer, para las variantes AA (RM = 36), este fue 12.8 veces mayor al calculado para las variantes Europeas (RM = 2.8) y se sabe que de acuerdo a criterios estadísticos, un RM mayor a 1, implica que los individuos expuestos a las variantes AA presentan una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad . Es por esto que estos datos indican claramente que la infección con las clases AA de HPV-16, presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical, en comparación con pacientes infectadas con las clases Europeas de HPV-16.

## Secuencia de HPV con MY

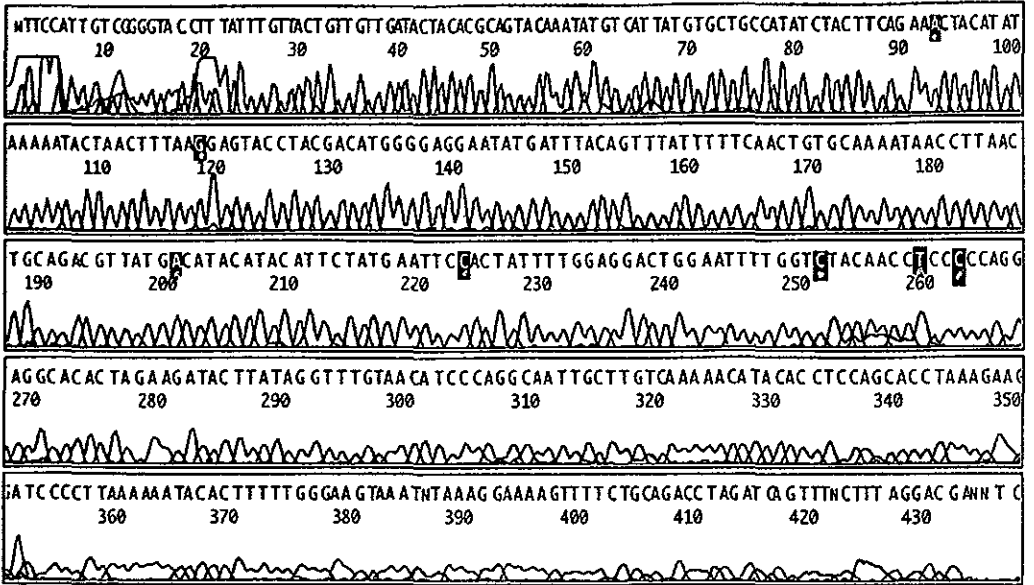


Figura 5. Secuencia obtenida a partir de una muestra amplificada con los oligonucleótidos MY09/11. Se marcan las regiones donde hay variaciones en el caso de ser una variante AA (Yamada *et al*, 1997).

## DISCUSION

En el presente trabajo se determinó la prevalencia de las variantes Asiático-Americanas en la población mexicana en un estudio de casos y controles. Para esto, se evaluaron 138 muestras de raspados cervicales de pacientes control clínicamente sanas y 48 raspados de pacientes con cáncer cervicouterino

La proporción de HPV-16 en las muestras de cáncer (47.9%), detectadas en este trabajo es similar a las reportadas por otros trabajos (50.8%) (Ferrera *et al*, 1999) La frecuencia de muestras con HPV-16 en los raspados control, (12.3%, Tabla 5) correlaciona al reportado en un trabajo previo de casos y controles en México (Hernández-Avila *et al* 1997) y Honduras (Ferrera *et al*, 1999), donde la prevalencia en las muestras control positivas para HPV-16 es de 13.2% y 17.3% respectivamente, lo cual pudiera deberse a que los países en vías de desarrollo son zonas de alto riesgo, o bien al incremento de la sensibilidad en la tipificación por PCR debido a la utilización de los tres juegos de oligonucleótidos (Tabla 3 y Fig. 4).

De acuerdo a los resultados anteriores se puede observar que existe una asociación entre los Virus de Papiloma Humano (HPV) de alto riesgo y el desarrollo de cáncer cervical (zur Hausen *et al*, 1994).

Se ha reportado que algunas variantes son mas prevalentes en ciertas regiones geográficas (Stewart *et al*, 1996), y que la distribución de las variantes AA, se da únicamente en Sudamérica y América Central con una proporción del 20% y en Europa únicamente en España, con una proporción del 14% (Yamada *et al*, 1997).

En tanto que, en la población mexicana la prevalencia de las variantes AA es mucho mas alta (43.5 %) en los casos de cáncer, lo cual, podría contribuir de forma importante al desarrollo de cáncer en la población.

Para el grupo control, la prevalencia de las variantes es mucho menor con tan solo una paciente (5.9%, Tabla 6).

Nindl *et al* en 1999, al analizar muestras con diferentes grados de transformación, no encuentra una correlación entre la presencia de variantes Europeas y el grado de la enfermedad y, aunque solo reporta un caso con la variante AA de 112 muestras analizadas, esta se presenta en una paciente con cáncer cervical. Por otro lado, de acuerdo a trabajos realizados por Conrad *et al*, 1996, la oncoproteína E6 de las variantes AA, tienen mayor capacidad oncogénica, ya que esta es capaz de degradar de forma mas eficiente a la proteína p53.

En otros estudios realizados en México, se ha podido comprobar que la secuencia del gen E2 de las variantes AA, presenta un gran número de mutaciones (Casa *et al*, 1999), lo cual pudiera estar asociado a una regulación menos eficiente de las oncoproteínas E6 y E7, ya que algunos de estos cambios se encuentran en dominios activos de E2, lo cual favorecería la expresión de los oncogenes. Además, se determino que existe una relacion entre la presencia de los genes E1/E2 y el número de copias virales. Este número alto de copias, aunado a la posible deficiencia en la función represora de E2 en las variantes AA, podría provocar que el desarrollo tumoral fuera mas rápido, por lo que las variantes AA tendrían una mayor capacidad oncogénica.

Las variantes AA se detectaron en pacientes con cáncer cervical con una media de edad de 35 años, en tanto, que las variantes Europeas se presentaron en pacientes mayores a 35 años.(Ordóñez *et al*).De acuerdo a lo anterior es, probable que las variantes AA sean mas oncogénicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, al calcular la razón de momios se observa que para el caso de los pacientes infectados con las variantes Europeas existe una fuerte probabilidad de desarrollar cáncer (RM=2.8) sabiendo que un valor mayor a 1 indica un alto riesgo de desarrollar la enfermedad. Por otro lado al calcular este valor para las variantes AA, se observa que este es mucho mayor (RM=36) al obtenido para las variantes Europeas (12.8 veces mayor), lo cual incrementa de forma significativa la probabilidad de desarrollar la enfermedad de acuerdo a criterios estadísticos, con lo que podemos suponer que las pacientes infectadas con las variantes Asiático-Americanas tienen una mayor probabilidad de desarrollar cáncer cervical en un tiempo menor.

La alta incidencia de estas variantes no es fácil de explicar en la población mexicana. De acuerdo a su distribución mundial (Yamada *et al*, 1997), se puede suponer que esta pudo haber sido introducida a América Latina, a través de las migraciones provenientes de España. Otra posibilidad es que su prevalencia esté asociada al fondo genético de la población mexicana (Casas *et al*, 1999), dentro de estos pudieran incluirse, variaciones en el grado de oncogenicidad de las variantes a nivel mundial debido a características de las poblaciones como son, distribución de diferentes alelos en las moléculas presentadoras de antígenos del HLA, sabiendo que la proteína E6 es blanco de respuestas inmunológicas humorales y celulares, lo cual promovería respuestas diferentes contra el virus (Nindl *et al*, 1999 y Yamada *et al*, 1995 ), otros factores como son las variantes alélicas de proteínas blanco para las oncoproteínas E6 y E7, como p53 (Storey, 1998), pudieran tal vez afectar de alguna forma la capacidad de las variantes virales para desarrollar cáncer cervical en las poblaciones. Sin embargo, a pesar de esto, es difícil determinar las presiones de selección que mantienen a las variantes dentro de la población, en México.

En conclusión, de acuerdo al presente estudio de casos y controles realizado en una muestra de la población mexicana y al cálculo de la razón de momios para las variantes Asiático-Americanas, existe una mayor probabilidad de que las pacientes infectadas con las variantes AA de desarrollar cáncer cervical, en un periodo de tiempo menor, al que es necesario en aquellas pacientes infectadas con las variantes Europeas.

A pesar de que el desarrollo de cáncer cervical es un proceso multifactorial, la alta frecuencia de las variantes AA en la población mexicana podría explicar de alguna forma la alta incidencia de cáncer cervicouterino en México, es por esto que es necesario desarrollar mejores programas de detección viral, así como aumentar la cobertura de dichos programas a nivel nacional. Por otro lado, es también necesario considerar la existencia de las variantes AA para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra cáncer cervical en México, ya que muy probablemente, las vacunas desarrolladas en otros países en donde se toma a la variante Europea como modelo, pudieran no ser lo suficientemente efectivas en México.

## CONCLUSIONES

El proceso para desarrollar cáncer cervical es multifactorial. Sin embargo, se sabe que en la población mexicana hay una mayor prevalencia de las variantes AA de HPV-16 comparado con otros países, y que es además, una variante con una mayor capacidad transformante, por lo cual en el presente trabajo, al calcular la razón de momios ( $RM=36$ ) se puede predecir que las pacientes expuestas a éstas variantes, al compararse con pacientes expuestas a las variantes Europeas ( $RM=2.8$ ), tienen una mayor probabilidad de desarrollar cáncer cervical. Estos datos sugieren que la alta incidencia de cáncer cervical en México se debe no sólo a problemas de carencia de recursos y educación para su detección oportuna, sino también, a que las pacientes están expuestas a variantes de HPV-16 más oncogénicas.



## REFERENCIAS

- 1.- Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua J, y García-Carrancá A. (1994). Genome amplification of human papillomavirus type 16 and 18 in cervical carcinomas is related to retention of E1/E2 genes. *Int J. Cancer*. **56**: 640-645.
- 2.- Bosch, Manos, Muñoz, Sherman, Hansen, Peto. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl Cancer. Inst.* **87**:796-802.
- 3.- Casas, Galván, Ordoñez, López, Guido y Berumen (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.
- 4.- Choo KB, Pan CC yHan SH. (1987) Integration of Human Papilloma virus Type 16 into cellular DNA of cervical carcinomas: Preferential Deletion of the E2 gene and invariable Retention of the Long Control Region and the E6/E7 open reading frame. *Virology*. **161**:259-261.
- 5.- De Villiers (1989). Heterogeneity of the Human Papillomavirus Group *J. Virol.* **63** (11), 4898-4903.
- 6.- Ferrera, Velema, Figueroa, Bulnes, Toro, Claros, Barahona y Melchers (1999). Human Papillomavirus infection, cervical dysplasia and invasive cervical cancer in Honduras: a case-control study. *Int. J. Cancer*. **82**: 799-803.

7.- Hernández-Avila, Lazcano-Ponce, Berumen-Campos, Cruz-Valdez, Alonso de Ruiz y González-Lira. (1997). Human Papilloma Virus 16-18 Infection and Cervical Cancer in Mexico: A Case-Control Study. *Archives of Medical Research*. **28** (2): 265-271.

8.- Higgins, Davy, Roder, Uzelin, Phyllips y Burrell (1991). Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. *Lancet*. **338**: 910-913.

9.- Ho, Chan, Chow, Chong, Tay, Villa y Bernard (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.

10.- Ho, Chan, Burk, Das, Fujinaga, *et al* (1993A). 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.

11.- Ho, Tay, Chan y Bernard (1993B). Sequence variants of human papillomavirus type 16 from couples suggest sexual transmission with low infectivity and polyclonality in genital neoplasias. *J. Infect. Dis.* **168**: 803-809.

12.- Icenogle JP, Clancy KA, y Lyn SY. (1995). Sequence Variation in the Capsid Protein genes of the Human Papillomavirus Type 16 and Type 31. *Virology*. **214**: 664-669.

- 13.- Jeon S y Lambert PF. (1995). Integration of the human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increase stability of E6 and E7 mRNAs: Implication for cervical carcinogenesis. *Proc Natl. Acad Sci.* **92**:1654-1658.
- 14.- Jiménez-Pérez y Thomas (1999). Has the use of Pap smears reduced the risk of invasive cervical cancer in Guadalajara, México?. *Int. J. Cancer.* **82**: 804-809.
- 15.- Lazcano-Ponce, Rascón-Pacheco, Lozano-Ascencio y Velasco-Mondragón (1996A). Mortality from cervical carcinoma in México. Impact of screening 1980-1990. *Acta cytol.* **40**: 506-512.
- 16.- Lazcano-Ponce, Alonso, Buiatti y Hernández. (1996B). Programa de detección oportuna de cáncer cervical en México. Diagnóstico Situacional. *Rev. Inst. Nac. Cancerología.* **42**: 123-140.
- 17.- Lizano, Berumen, Guido, Casas, y Garcia-Carranca (1997). Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 1-4.
- 18.- Lombard, Vincent-Salomon, Validire, Zafrani, *et al* ((1998). Human Papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J. Clin. Oncol.* **16** (26): 2613-2619.
- 19.- Londesborough, Ho, Terry, Cuzick, Wheeler y Singer (1996). Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int. J. Cancer.* **69** :364-368.

- 20.- Manos, Ting, Wright, Lawis, Broker y Wolinski (1989). The use of Polimerase Chain Reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In *Molecular Diagnostics of Human Cancer*. Int Furth M, Greaves MF, Editors. Cancer Cell. New York: Cold Spring Harbor, 1989:209-214.
- 21.- Matsukura T, Koi S y Sugase M. (1989) Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology*. 172: 63-72.
- 22.- McBride y Myers (1997). The E2 Protein. Human Papillomavirus Compendium. National Institute of Allergy and Infections Diseases, Los Alamos E.U.A. III-54 / III-74
- 23.- Munger y Halpern (1997). HPV 16 E7: Primary Structure and Biological Properties. Human Papillomavirus Compendium. National Institute of Allergy and Infections Diseases, Los Alamos E U.A.III-17 / III-36
- 24.- Muñoz y Bosh (1997).Cáncer del cervix y virus del papiloma humano: evidencia epidemiológica y persepectivas para su prevención. *Salud Pública Mex*. 39: 274-282.
- 25.- Myers y Androphy (1995). The E6 Protein. Human Papillomavirus Compendium. National Institute of Allergy and Infections Diseases, Los Alamos E.U.A.III-47 / III-58.
- 26.- Nelson, Averette, Richard (1984). Dysplasia, carcinoma in situ and early invasive cervical carcinoma. *CA-Cancer J. Clin*. 34: 306-327.

- 27.- Nindl, Rindfleisch, Lotz, Schneider y Durst. (1999). Uniform distribution of HPV 16 E6 y E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int. J. Cancer*. **82**: 203-207.
- 28.- Ordóñez, López, Galvan, Casas, García-Carrancá, Gonzáles-Lira y Berumen (1999). Association Between Human Papillomavirus 16 Variants, E6/E7 Transcription Regulation by E2 and Patient age in Cervical Cancer. En prensa.
- 29.- PAHO (Pan-American Health Organization) (1994). Health conditions in the Americas, Vol I. Scientific Publication, PAHO, Washington. **549**.
- 30.- Parkin, Pisani y Ferlay (1993). Estimates or the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer*. **54**: 594-606.
- 31.- Restrepo, Gonzáles, Roberts, Litvak. (1987). Epidemiología y control del cáncer del cuello uterino en América Latina y el Caribe. *Bol. Of. Sanit. Panam*. **102**:578-593.
- 32.- Robin Hesketh. 1997. The Oncogene and tumor suppressor gene. Facts book. Academic Press, London, UK. 549 pp.
- 33.- Rolighed-J, Bichel-P, Lindeberg-H. (1997). The presence of HPV in cervical biopsies, determined by histology and PCR with two different pairs of consensus primers. *Eur-J-Gynecol-Oncol*. **18** (5):365-7.

- 34.- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory Manual 2<sup>nd</sup>. Ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press NY. USA.
- 35.- SS (Secretaría de Salud), Norma Oficial Mexicana NOM-014assa2-1996. Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico-uterino. SS, México (1996).
- 36.- SSJ (Secretaría de Salud Jalisco), Registro estatal de cáncer Jalisco 1996, SSJ, Jalisco (1996).
- 37.- Stewart, Eriksson, Manos, Muñoz, Bosch, Peto y Wheeler (1996). Intratype Variation in 12 Human Papillomaviruses Type: a Worldwide Perspective. *Journal of Virology*. 70 (5) : 3127-3136.
- 38.- Stoppler, Ching, Stoppler, Clancy, Scchlegel y Icenogle (1996). Natural Variants of the Human Papillomaviruses Type 16 E6 Protein Differ in their Abilities to Alter Keratinocyte Differentiation and to Induce p53 Degradation. *Journal of Virology*. 70 (10) : 6987-6993.
- 39.- Storey, Thomas, Kalita, Harwood, Gardiol, Mantovani, Breuers, Leigh, Matlashewski y Banks. (1998). Role of a 953 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*.393: 229-234.
- 40.- Syrjanen, K. (1996). Natural history of genital human papillomavirus infections. En Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses, pp.189-206.

ESTA TESIS NO  
SE ENCUENTRA EN LA BIBLIOTECA

- 41.- Van Rast MA, Tachezy R, Delvis, Burk R.D. (1993). Taxonomy of the human Papillomaviruses. *Papillomavirus Rep.* 4: 61-65.
- 42.- Wheeler (1997). Preventive Vaccines for cervical cancer. *Salud Pública Mex.* 39: 283-288.
- 43.- Xi, Koutsky, Galloway, Kuypers, Hughes, Wheeler, *et al* (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 796-802.
- 44.- Yamada, Wheeler, Halpern, Stewart, Hildesheim y Jenison. (1995). Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages in United States Populations Characterized by Nucleotide Sequence Analysis of the E6.L2 y L1 Coding Segments. *Journal of Virology.* 69 (12): 7743-7753.
- 45.- Yamada, Manos, Peto, Greer, Muñoz, Bosch y Wheeler (1997). Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worldwide Perspective. *Journal of Virology.* 71 (3): 2463-2472.
- 46.- Yang, Shen, Tate, Wang, Su, Wang, *et al* (1997). Cervical cancer in young women in Taiwan: prognosis in independent of papillomavirus or tumor cell type. *Gynecol. Oncol.* 64: 59-63.
- 47.- Ylitalo, Sorensen, Josefsson, Frisch, Sparén, Pontén, Gyllensten, Melbye y Adami. (1999). Smoking and oral Contraceptive as risk factors for cervical carcinoma *in situ*. *Int. J. Cancer.* 81: 357-365.

48.- Zehbe, Wilander, Delius y Tommasino (1998). Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* **58**: 829-833.

49.- zur Hausen y Villiers (1994). Human Papillomaviruse. *Annual Reviews of Microbiology.* **48**: 427-447.