

139



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ANALISIS DE VARIANTES DE HPV-16 Y HPV-18 EN MUESTRAS CERVICALES DE MUJERES MEXICANAS MEDIANTE ENSAYOS DE PCR-SSCP"

196741

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

KARINA VIVIANA SOLIS AVILA

ASESOR: DR. ALEJANDRO M. GARCIA CARRANCA
SUPERVISOR TECNICO: BIOL. MIRIAM C. GUIDO JIMENEZ



MEXICO, D. F.

2001

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Rebecca E. Franco y Bourland
Vocal	Prof. Enrique Ortega Soto
Secretario	Prof. Alejandro M. García Carrancá
1er Suplente	Prof. Teresa de Jesús Olivera Flores
2º Suplente	Prof. Norma Trejo Medina

Tema desarrollado en

Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)

Instituto Nacional de Cancerología (SSA)



Dr. Alejandro M. García Carrancá

ASESOR



Biol. Miriam C. Guído Jiménez

SUPERVISOR TÉCNICO



Karina Viviana Solís Ávila

SUSTENTANTE

Agradecimientos

Primero que nada, mi más profundo agradecimiento a mis padres –Soledad y Juan- y a mis hermanos –Juan Carlos, Clarissa y Vero- por su infinito amor y su apoyo incondicional. A mi Tía Manana por siempre estar al pendiente de mi y en general a todos los miembros de mi familia.

Al Dr. Alejandro García por haber dirigido esta tesis y por las facilidades otorgadas para su realización.

Muchas gracias a Miriam por siempre estar dispuesta enseñarnos las técnicas y a ayudarnos cuando se ponen las cosas difíciles.

A todos los del labo de Biomédicas -Ana, Beni, Paty, Alexandra, Vero, Lety, Cristian, Jorge (y la lista sigue)- por su amistad y sus consejos.

A la Dra Marcela Lizano por su amistad, sus enseñanzas y todo el tiempo que invirtió conmigo. ¡Mil gracias Marce, sin ti estas tesis no se hubiera terminado!

A todos los miembros del laboratorio del INCAN, o sea, a Adela y Erick por aguantarme y echarme la mano en los momentos de apuro. En especial quisiera dar las gracias a Manuel Gutiérrez por su activa colaboración para el desarrollo de este trabajo. También a Graciela por ser mi amiga y amenizar los días de trabajo.

A la Dra. Dulce Ma. Hernández por su asesoría para la parte estadística

A los revisores de esta tesis por sus oportunas críticas y valiosas sugerencias, las cuales ayudaron mucho a mejorar el documento

A todos mis maestros y amigos de la Facultad y de la Universidad en General.

A Jackeline por ser mi gran amiga

Y finalmente a mi pequeña familia –Alejandro, Alex y Erick- por ser mi alegría de cada día y el mejor motivo para seguir adelante.

I. Índice General

I.	Índice General	1
II.	Índice de Tablas y Figuras	3
III.	Resumen	6
1.	Antecedentes	7
1.1	Cáncer Cervicouterino.....	7
1.1.1	Localización Anatómica	8
1.1.2	Localización Anatómica	8
1.1.3	Lesiones Escamosas Intraepiteliales.....	9
1.1.4	Tipos histológicos.....	9
1.1.5	Etiología viral	10
1.2	Los Papilomavirus	10
1.2.1	Biología de los Papilomavirus.....	10
1.2.2	Ciclo viral.....	16
1.2.3	Variantes del HPV	18
2.	Justificación del problema.....	28

3.	Objetivos.....	29
3.1	Objetivo general	29
3.2	Objetivos particulares.....	29
4.	Materiales y Métodos	30
4.1	Muestras	30
4.2	Extracción y Cuantificación de DNA	31
4.2.1	Equilibración del fenol.....	31
4.2.2	Extracción de DNA	32
4.2.3	Cuantificación de DNA.....	34
4.3	Amplificación por la técnica de PCR.....	34
4.4	Ensayo de SSCP	36
4.5	Secuenciación de DNA	40
5.	Resultados.....	42
6.	Discusión	59
7.	Conclusiones	65
8.	Referencias	66

II. Índice de Tablas y Figuras

Figuras

Figura 1.	Localización anatómica del cuello uterino o cérvix.....	8
Figura 2.	Imagen tridimensional de la estructura del virión de los papilomavirus.....	11
Figura 3.	Genoma circular del HPV-16.....	13
Figura 4.	Árbol filogenético del HPV basado en la secuencia de un segmento de la región L1	15
Figura 5.	Árbol filogenético del HPV-16 en el que se observan las cinco ramas características del virus: Af1, Af2, AA, E y As	20
Figura 6.	Árbol filogenético del HPV-18 que nos muestra las tres ramas identificadas : Af, As+Al y E	21
Figura 7.	Diferencias en las regiones E6, L1 y LCR de las diferentes variantes del HPV-16	27
Figura 8.	Metodología Experimental seguida durante la realización de este trabajo	33
Figura 9.	Esquema del ensayo de SSCP	39
Figura 10.	Esquema representativo de un gel de secuenciación	41
Figura 11.	Patrón de corrimiento electroforético por la técnica de SSCP de distintos tipos de HPV	45
Figura 12.	Identificación de variantes mediante SSCP en el segmento GP5+/GP6+	46

Figura 13. Patrones distintos a los conocidos, por lo que tuvieron que ser secuenciados para determinar el tipo47

Figura 14. Patrones electroforéticos correspondientes a los tipos 56, 58 y 5948

Figura 15. Autorradiografía del gel de secuenciación obtenida a partir de la muestra 74 con GP5+ 49

Figura 16. Distribución de los tipos de HPV dentro de cada grupo de estudio 56

Figura 17. Proporción de casos del tipo 16 y 16 AA en los tres grupos de estudio 57

Figura 18. Proporción de casos encontrados del tipo 18 y 18 Af dentro de los tres grupos de estudio57

LISTA DE ABREVIATURAS

- BLAST** Basic Local Alignment Search Tool
- CaCU** Cáncer Cervicouterino
- Cu** Curies
- DNA** Desoxirribonucleic Acid; Ácido Desoxirribonucleico
- DO** Densidad Óptica
- HPV** Human Papilloma Virus; Virus del Papiloma Humano
- LCR** Long Control Region; Región Larga de Control
- LEIAG** Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado
- LEIBG** Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado
- NIC** Neoplasia Intraepitelial Cervical
- PCR** Polimerase Chain Reaction; Reacción en Cadena de la Polimerasa
- SSCP** Single Strand Conformational Polymorphism; Polimorfismo Conformational de Cadena Sencilla
- U** Unidades

Tablas

Tabla I.	Regiones y genes del genoma del HPV.	12
Tabla II.	Clasificación de HPV de acuerdo a riesgo oncogénico.	16
Tabla III.	Condiciones de reacción utilizadas durante la amplificación por PCR	35
Tabla IV.	Oligonucleótidos utilizados durante la realización del protocolo.	35
Tabla V.	Cambios en la región de L1 amplificada por los oligonucleótidos consenso GP5+/GP6+... ..	50
Tabla VI.	Datos clínicos de las pacientes de los distintos grupos y tipo de HPV detectado.....	51
Tabla VII.	Recuento del número de casos de cada HPV por tipo de lesión	53
Tabla VIII.	Distribución de los tipos 16 , 18 y sus variantes detectadas en los grupos de estudio.....	54
Tabla IX.	Distribución por grupos de edad de los tipos de HPV en lesiones	58

III. Resumen

Actualmente en México el cáncer cervicouterino (CaCU) ocupa el primer lugar de muerte por neoplasia para la población femenina. Esto se debe en gran medida a la falta de diagnóstico oportuno de esta enfermedad, ya que en las etapas tempranas del cáncer se producen muy pocos síntomas.

Se ha demostrado la presencia del Virus del Papiloma Humano (HPV por sus siglas en inglés) en más del 99 % de los tumores de cuello uterino, principalmente de los llamados tipos de alto riesgo entre los cuales destacan los tipos 16 y 18. Mediante el análisis de las secuencias de estos tipos se han identificado distintas variantes, las cuales se presume están asociadas a determinados tipos histológicos de CaCU y a un diferente comportamiento biológico y agresividad.

En este estudio se determinaron los tipos y variantes del tipo 16 y 18 en muestras de pacientes que resultaron positivas a la detección de HPV de alto riesgo. Se incluyeron tres grupos: controles de personas que no presentaban lesión, lesiones precancerosas de bajo grado y lesiones precancerosas de alto grado. La tipificación se realizó mediante el análisis de un fragmento de la región L1 del genoma del virus mediante la técnica de SSCP. Los resultados obtenidos indican que los tipos más frecuentes son el 16 y el 18 tanto en lesiones como en controles, sin embargo, su proporción tiende a ser mayor dentro de las lesiones. La variante del tipo 16 encontrada en la población mexicana pertenece a la rama Asiático-Americana, sin embargo no se halló una diferencia significativa entre lesiones de bajo y alto grado. Tampoco se encontró diferencia entre el comportamiento de la variante Af del tipo 18 y la clona de referencia. Otros tipos frecuentes fueron el 45, 58 y 59. El resto de los tipos encontrados se presentó de manera bastante homogénea dentro de los tres grupos de estudio.

1. Antecedentes

1.1 Cáncer Cervicouterino

1.1.1 Datos Epidemiológicos

El cáncer cervicouterino ocupa el quinto lugar en neoplasias a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud su frecuencia está alrededor de 460 mil casos anuales. En América Latina ocupa el primer lugar.

En cuanto a México se refiere, este tipo de cáncer ocupa el primer lugar de muerte por neoplasia para la población femenina. De cada 100 tumores detectados, 85 son de cuello uterino y es la primera causa de muerte en general para mujeres mayores de 45 años.

Un factor importante de la alta incidencia de este padecimiento en nuestro país, y en general en países no industrializados es la falta de detección oportuna. El cáncer de cuello uterino produce pocos síntomas en su inicio, esto, aunado a la falta de información y a la ausencia de una cultura de autocuidado de la salud provocan que el diagnóstico de la enfermedad se realice en etapas muy avanzadas, cuando el pronóstico es poco alentador.

1.1.2 Localización Anatómica

El cérvix se localiza en la parte baja del útero. Se divide en el endocérvix, que está compuesto por epitelio columnar el cual conforma las llamadas glándulas, y el ectocérvix formado por epitelio escamoso que se une a la vagina. El sitio donde se lleva a cabo la unión de estos dos tipos de epitelio se conoce como unión escamocolumnar y está sujeta a variaciones durante la vida de una mujer debido a estímulos hormonales (menstruación, embarazos o partos) En esta zona el epitelio columnar se "transforma" debido al reemplazo por células de reserva que presentan metaplasia escamosa. Debido a lo anterior a esta zona se le ha llamado zona de transformación o zona T. Es precisamente en este lugar donde se origina el cáncer cervicouterino.

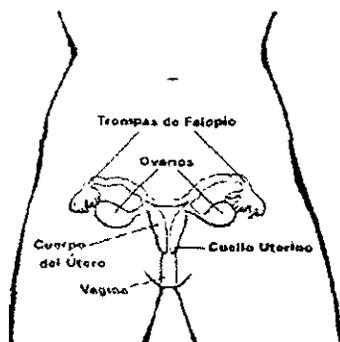


Figura 1. Localización anatómica del cuello uterino o cérvix. La zona de transformación se encuentra donde se unen el epitelio vaginal y el epitelio endocervical

1.1.3 Lesiones escamosas intraepiteliales

El CaCU evoluciona a partir de las lesiones intraepiteliales en proliferación conocidas como lesiones escamosas o epidermoides intraepiteliales, displasias o neoplasias intraepiteliales del cérvix (NIC). Se caracterizan por desorganización de la arquitectura del epitelio escamoso, atipias nucleares y mitosis anormales.

El grado de la lesión depende de la magnitud de dichas anomalías. De tal manera la lesión puede ser de bajo grado (Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado LEIBG) correspondiente a displasia leve o NIC I. Las displasias moderadas y severas corresponden a NIC II y NIC III respectivamente y se han agrupado bajo la categoría de lesiones intraepiteliales de alto grado (LEIAG).

Estos tipos de lesiones pueden revertir, persistir o progresar hacia cáncer. De acuerdo a diversos modelos matemáticos elaborados se ha calculado que son aproximadamente 5 años lo que toma a una displasia progresar a su siguiente fase (Barron y Richart, 1968) y de 1 a 30 años lo que tarda una displasia severa para progresar a cáncer (Gustafsson et al., 1989)

1.1.4 Tipos histológicos

Los distintos tipos histológicos de CaCU se definen de acuerdo a la estirpe celular de la que se originó. El carcinoma de células escamosas o epidermoide se origina, como

su nombre lo indica del epitelio escamoso, es el más común y el de mejor pronóstico. Sigue en importancia el adenocarcinoma que se confina a las glándulas endocervicales. El carcinoma adenoescamoso tiene origen mixto. Estos dos últimos tipos histológicos cuentan con un peor pronóstico que el epidermoide. Existen otras variedades menos frecuentes entre las que destacan el carcinoma de células pequeñas que se originan de las células endocervicales de reserva presenta diferenciación neuroendocrina y tiene uno de los peores pronósticos.

1.1.5 Etiología Viral

Actualmente se tiene la suficiente evidencia para relacionar la infección por HPV con la aparición de lesiones precancerosas y CaCU. Se sabe que en más del 99 % de los tumores de cuello uterino se han detectado secuencias virales de ciertos tipos del virus del papiloma humano (HPV), entre los que destacan los tipos 16, 18, 31, 33 y 45 (Walboomers et al.,1999). De igual manera este virus se encuentra presente en las lesiones intraepiteliales del cérvix y el cáncer invasor.

1.2 Los Papilomavirus

1.2.1 Biología de los Papilomavirus

Los Papilomavirus se encuentran dentro de la familia Papoviridae y son pequeños (virión de 55nm), de forma icosaédrica y sin envoltura. Su genoma es circular de doble cadena de DNA con un tamaño alrededor de 8000 pares de bases, se divide en tres regiones: la región temprana (E) que consta de seis genes que codifican para

proteínas involucradas en la replicación del DNA viral y su transcripción, la región tardía (L) que codifica para dos proteínas estructurales y la región larga de control (LCR) que tiene secuencias de control para la replicación y transcripción viral.

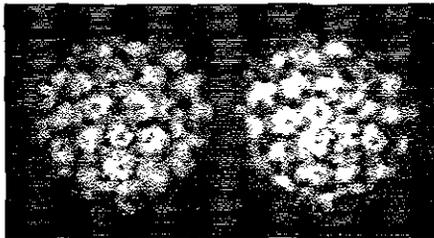


Figura 2. Imagen tridimensional de la estructura del virión de los papilomavirus reconstruida a partir del análisis de microscopía crioelectrónica. Los viriones miden aproximadamente 55 nm.

Los Papilomavirus se han asociado a neoplasias benignas y malignas de la piel y las mucosas. Se encuentran en el epitelio de distintos animales desde pájaros y reptiles hasta mamíferos y están clasificados de acuerdo a su secuencia de DNA.

Tabla I. Regiones y genes del genoma del HPV

Gen	Proteína	Función
L1	Proteína L1	Constituyente principal de la cápside
L2	Proteína L2	Proteína de la cápside, ensamblaje de viriones.
E1	Proteína E1	Inicio de la replicación viral , helicasa, ATPasa
E2	Proteína E2	Regulación transcripcional del virus, forma heterodímeros con E1 que estimulan la iniciación de la replicación.
E4	Proteína E4	Proteína tardía, maduración y liberación de las partículas virales, rompe la red de citoqueratinas citoplásmicas
E5	Proteína E5	Pequeña proteína hidrofóbica asociada a membrana, sinergiza la acción del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el estímulo para la proliferación celular del epitelio.
E6	Proteína E6	Transformante, se une a la proteína supresora de tumor p53 promoviendo su degradación, activa a la telomerasa
E7	Proteína E7	Transformante, Se une a pRB, p130y c-jun, activa la transcripción
LCR		Secuencia reguladora de la transcripción, contiene el origen de la replicación viral y elementos de respuesta a factores de transcripción tanto virales como celulares

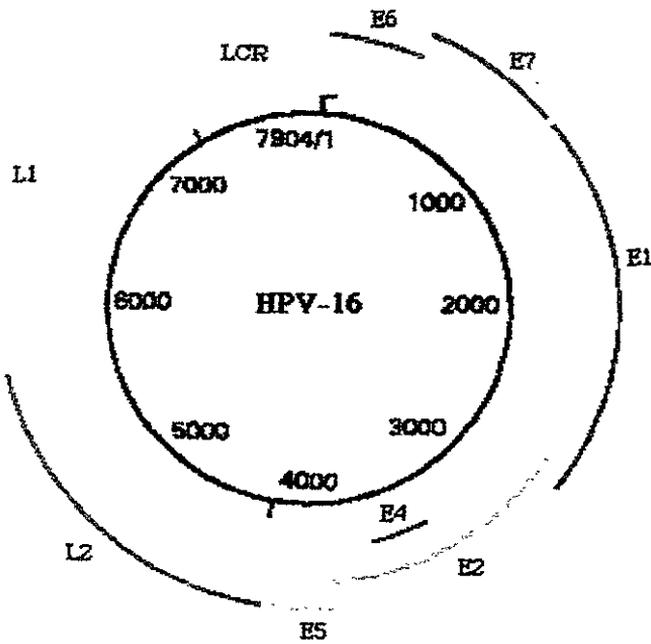


Figura 3. Genoma Circular del HPV -16. Consta de DNA de doble cadena circular de 7904 pb. Su promotor se designa P97 y se ubica en el LCR. Se observan además las regiones tempranas (E) y tardías (L).

De acuerdo a la comparación de su secuencia de nucleótidos se ha dividido a los papilomavirus en cinco grandes ramas, dos de las cuales incluyen tipos encontrados en animales y tres que contienen a los HPV's. Hay que resaltar que dicha forma de clasificación (por secuencia de DNA) correlaciona con su tropismo y potencial oncogénico. A su vez, los HPV's se dividen en dos grupos. Los cutaneotrópicos, que producen proliferaciones benignas en la piel -conocidas como verrugas- principalmente de brazos y pies (tipos 2, 3, 4, 10, etc.) y la Epidermodisplasia Veruciforme (tipos 5, 8, 9, 12, 14, 15, etc.); y los mucosotrópicos, los cuales infectan la mucosa del tracto respiratorio (tipos 6, 11), la cavidad oral (13, 32), la conjuntiva (6, 11) y el tracto genital.

Actualmente se acepta que un tipo diferente de papilomavirus es aquel que difiere del resto en un 10% o más en su genoma en regiones codificantes. Un subtipo es aquel que presenta cambios en un 2% a un 10% y una variante tiene una diferencia menor al 2%.

Los HPV genitales se han dividido en dos grupos de acuerdo a su asociación con los tumores malignos: los de bajo riesgo, asociados a lesiones benignas en su mayoría verrugas genitales y condilomas; y los de alto riesgo, asociados a distintas lesiones intraepiteliales cáncer invasor de cérvix, vulva, vagina y pene.

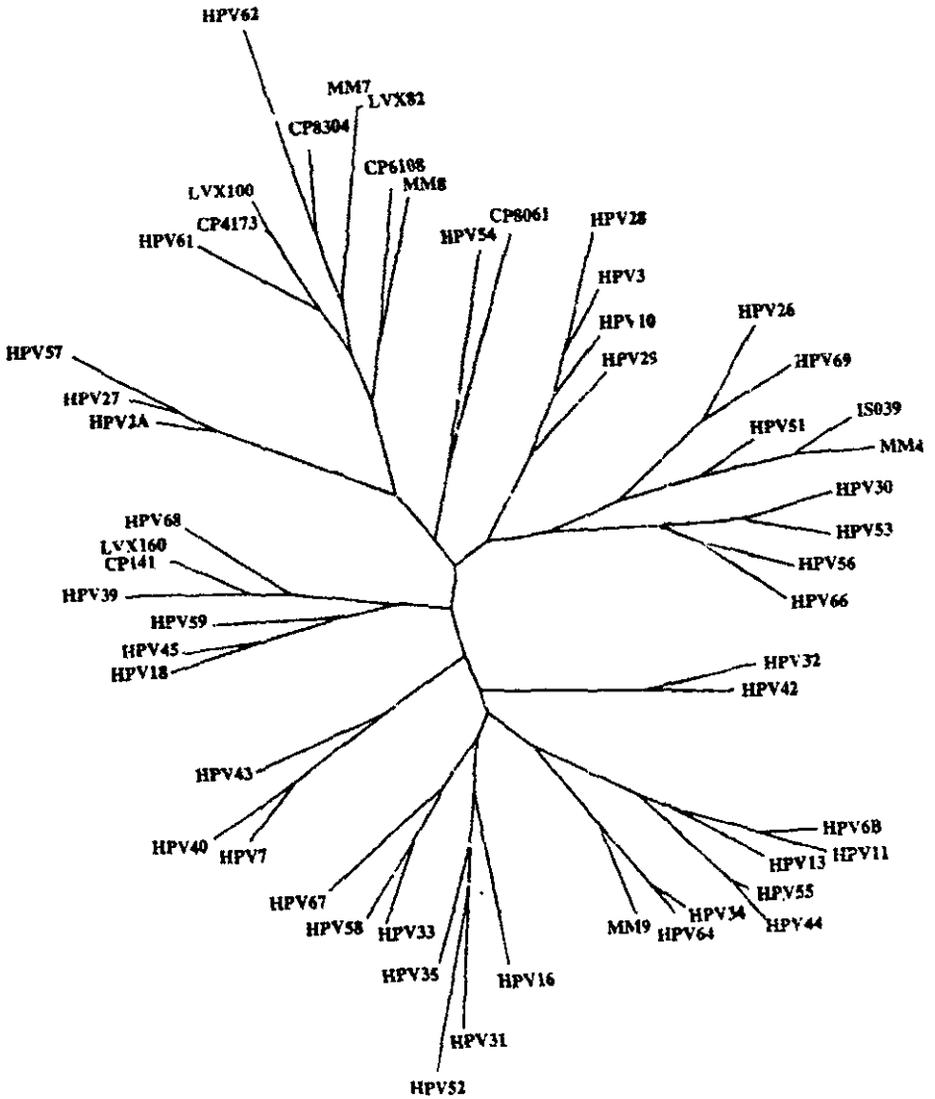


Figura 4. Árbol filogenético del HPV basado en la secuencia de un segmento de la región L1 (Myers et al., 1996)

Tabla II. Clasificación de los HPV de acuerdo a su riesgo oncogénico

Riesgo oncogénico	Tipo de HPV
Bajo riesgo	6, 11 , 26, 42, 44, 54, 70, 73
Alto riesgo	16, 18 , 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66, 68

Nota: En negritas los más frecuentes.

1.2.2 Ciclo viral.

Los virus del papiloma son específicos de su huésped y presentan tropismo por las células epiteliales escamosas produciendo proliferaciones en piel y mucosas.

La infección por HPV se transmite por contacto directo. Empieza en las células basales, las cuales son mitóticamente activas. Después el virus puede permanecer ahí, integrarse al genoma, o replicarse y producir partículas virales.

El ciclo completo de estos virus sólo se produce en queratinocitos diferenciados (Pfister, 1987). Las células basales son poco activas en la expresión de proteínas virales ya que existen factores celulares que regulan la transcripción viral. Al migrar a la capa granulosa estas células se diferencian y ya no pueden dividirse, y es entonces cuando se da la formación de partículas virales tras la transcripción de los genes tempranos y tardíos del HPV.

Actualmente se conoce que las proteínas E6 y E7 producidas por los HPV considerados de alto riesgo (y no de las de bajo riesgo) están involucrados en la immortalización y transformación de las células epiteliales. Estas proteínas son

activamente expresadas en los tumores de cérvix y las líneas celulares derivadas de ellos (Schwartz et al., 1985, Yee et al., 1985). La integración al genoma del hospedero se da en la región E1-E2 del virus provocando su rompimiento por lo que ya no se sintetiza una proteína E2 funcional. Al ser la proteína E2 un factor que regula negativamente la expresión de los genes E6 y E7 (se une a su promotor), se tiene como consecuencia un aumento en la transcripción de dichos genes (Sang & Barbosa, 1992)

Ahora se sabe que no en todos los tumores ocurre la integración del genoma viral al del hospedero. Se ha reportado en algunos casos los genes E1 y E2 se hallan intactos, lo que indica que el virus se halla en su forma episomal o que se han integrado varias copias virales en tándem. Se cree que al aumentar el número de copias virales se obtienen suficiente cantidad de proteínas E6 y E7 para transformar las células (Berumen et al., 1994).

La proteína E6 se une a la proteína supresora de tumores p53 dando lugar a su degradación, en un proceso dependiente de la ubiquitina (Scheffner et al., 1990, Crook et al., 1991). Por otro lado, la proteína E7 se asocia con la proteína del retinoblastoma pRB lo que libera al factor transcripcional E2F-1, que se halla unido a pRB (Chellapan et al., 1992). E2F1 activa la transcripción de diferentes genes celulares que promueven la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S. Todo esto lleva consigo la pérdida del control del ciclo celular y es responsable de la inestabilidad genómica que contribuyen a la transformación celular.

1.2.3 Variantes del HPV

Como se mencionó anteriormente se han definido variantes de un tipo de HPV como aquellas que presentan una diferencia menor del 2% en su secuencia genómica en las regiones codificantes y hasta un 5 % en las no codificantes (LCR) con respecto a la variante de referencia.

Las diferencias en las secuencias de DNA que codifican para proteínas de los papilomavirus nos permiten distinguir entre los tipos y analizar el proceso de especiación, ya que en la taxonomía de los papilomavirus el término tipo equivale al de especie (Chan et al., 1992). El análisis de las regiones no codificantes, las cuales son más variables nos permiten entender la evolución molecular dentro de un mismo tipo. Se considera que el virus del papiloma es un modelo muy adecuado para estudiar la evolución de los virus con relación a sus huéspedes ya que como se ha mencionado son específicos para su especie y como se ha reportado la recombinación es muy rara o inexistente (Yamada et al., 1995).

A través del estudio de las secuencias de DNA de un gran número de aislados virales de diversas partes del mundo se ha establecido la existencia de variantes para el tipo 16 (Ho et al., 1991, Ho et al., 1993), el tipo 18 (Ong et al., 1993) y otros tipos menos frecuentes (Stewart et al., 1996). Los tipos 16 y 18 han sido los más estudiados de

manera que se han construido árboles filogenéticos y establecido distintas ramas para cada uno de ellos. La evidencia apunta a que ambos tipos se originaron en África (Ong et al., 1993; Ho et al., 1993) y han coevolucionado con el ser humano dando lugar a diversas variantes que surgieron durante la especiación de su huésped. Asimismo, la diseminación de dichas variantes se ha dado con el movimiento de las masas humanas durante la historia (Chang et al., 1992 ; Ong et al., 1993). Por tanto, un tipo de variante predominan de acuerdo al grupo étnico mayoritario más que a la localización geográfica de la región.

Mediante estos estudios se han podido establecer cinco ramas principales para el tipo 16 : La europea E, la Asiática As, la Asiática-Americana AA, la Africana-1 Af-1 y la Africana-2 Af-2 (Ho et al., 1993). Recientemente se han obtenido diversos aislados que corresponden a una subclase de la variante AA que se ha nombrado Norteamericana NA1 (Yamada et al., 1995).

Para el HPV-16 se han analizado las regiones L1, L2, E2, E5, E6 y E7; los resultados obtenidos apoyan la idea de que la recombinación es rara o inexistente. (Yamada et al., 1995; Tomesello et al., 1997; Brady et al., 1999; Erikson et al., 1999).

Como se mencionó anteriormente la variante predominante depende del grupo étnico de la región. Las variantes de la rama E son comunes en Europa y Norteamérica; las variantes Af-1 y Af-2 son encontradas casi exclusivamente en África (92%); la As se halla comúnmente en el sureste de Asia; y la variante AA se encuentra en Centro y Sudamérica y sólo en España con lo que respecta a Europa (Yamada et al., 1997).

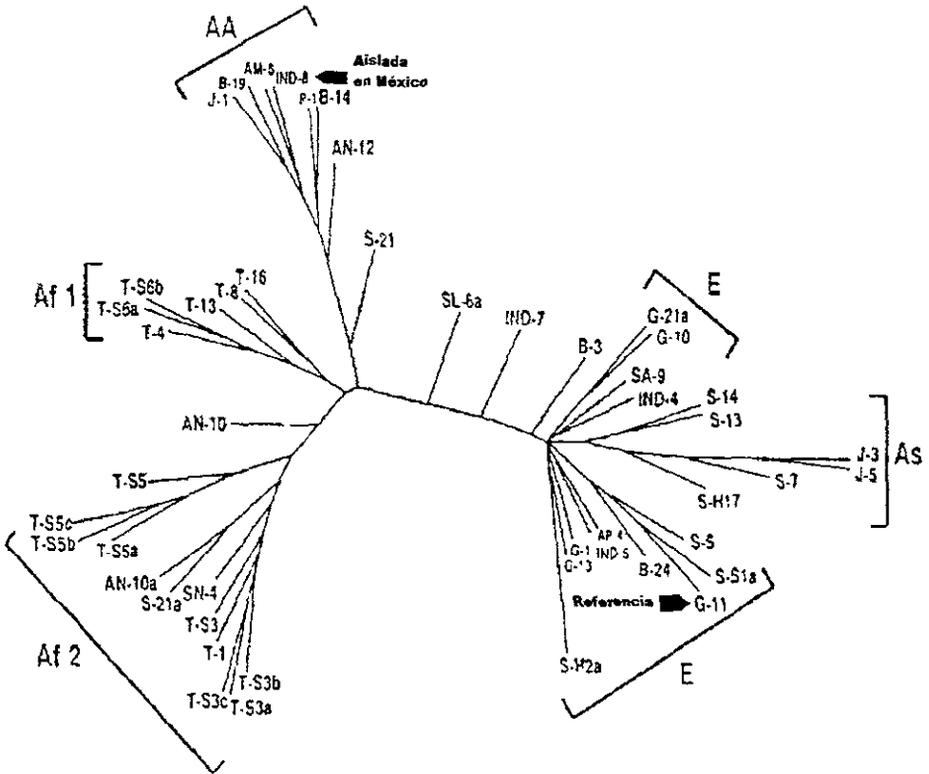


Figura 5 . Árbol filogenético del HPV-16 en el que se observan las cinco ramas encontradas: Af1, Af2, AA, E y As. Se señala con una flecha la clona tomada como referencia. La variante encontrada en México corresponde al aislado IND-8 de la rama AA (Ho et al., 1993)

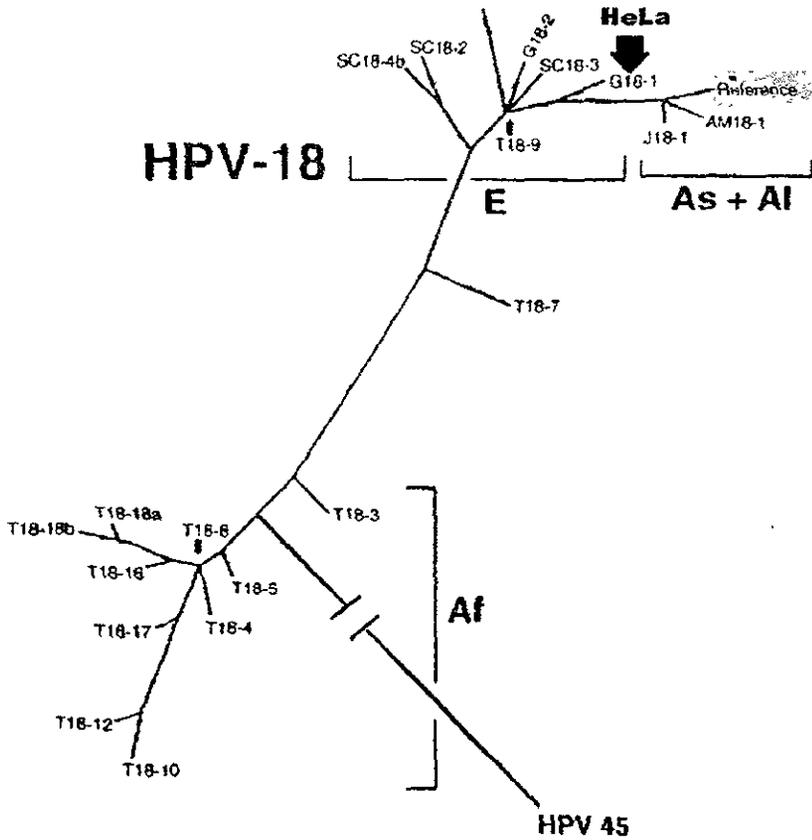


Figura 6 Árbol filogenético del HPV-18 que nos muestra las tres ramas identificadas : Af, As+Al y E (Ong et al., 1993) La clona de referencia se encuentra en la rama As+Al. Se señala la variante a la que corresponde el tipo integrado en la línea celular HeLa

Con lo que respecta al tipo 18 se han detectado tres ramas filogenéticas: Europea E, Africana Af y Asiática-Amerindia As+Am (Ong et al., 1993). De manera semejante a las variantes del tipo 16, el nombre indica en que región geográfica se hallaron predominantemente.

Como puede observarse éstos árboles tienen características similares:

- máxima diversidad entre variantes africanas y no-africanas
- mayor diversidad entre las variantes africanas y aquellas de otras regiones
- Las variantes asiáticas forman una rama con un nodo en las variantes europeas.

Es importante mencionar que para el HPV-16 la clona tomada como referencia pertenece a la rama E y para el HPV-18 pertenece a la As+AI, los cuales se hallan señalados en las figuras 5 y 6 respectivamente.

Es bien sabido que el tipo 16 se asocia principalmente con los carcinomas de células escamosas y el tipo 18 con los adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos (Bosch et al., 1995), lo que nos indica una diferencia entre estos dos tipos oncogénicos. Sin embargo, actualmente se tiene evidencia que sugiere que también sus variantes están asociadas a distintos tipos histológicos de cáncer y que tienen un distinto comportamiento biológico.

Empecemos por mencionar que el riesgo de desarrollar una lesión no es el mismo para todas las variantes del HPV-16. En un estudio en el que se detectaron variantes a través de la región LCR del tipo 16 se llegó a la conclusión que el riesgo de desarrollar una NiC II-III no es el mismo para todas las variantes, sino que aquellas no parecidas al prototipo (As, AA y Af) tienen un riesgo más elevado (Xi et al., 1997). De manera similar en tumores de cuello uterino era más predominante la presencia de las variantes diferentes al prototipo (Zehbe et al., 1998). Además, se ha reportado que una variante del HPV-16 encontrada en los tumores de mujeres mexicanas y que pertenece a la rama AA pudiera presentar un comportamiento más agresivo, ya que se encontró en un grupo de mujeres más jóvenes que la prototipo (Lizano et al., 1996). De esta manera se podría explicar la alta frecuencia de CaCU en mujeres latinoamericanas.

Con lo que respecta al HPV-18 se realizó un estudio en México que arrojó los siguientes resultados. Se determinó la presencia de una variante llamada var-2 perteneciente a la rama Af exclusivamente ligada a tumores de células escamosas, teniendo este tipo histológico un pronóstico poco más alentador que los otros tipos de cáncer. La var-1 (perteneciente a la rama E) estuvo presente en todos los tipos histológicos excepto carcinoma de células pequeñas. En comparación, en los tumores de células pequeñas analizados en este estudio se encontró la clona de referencia del HPV-18 y ninguna variante. El carcinoma de células pequeñas cuenta con uno de los peores pronósticos. Por tanto, podría ser que las variantes var-1 y var-2 del HPV-18 presenten un comportamiento menos agresivo (Lizano et al., 1996) comparado con la variante de referencia. Esto concuerda con un reporte previo en el que se describe una variante del HPV-18 con un comportamiento menos agresivo en lesiones precancerosas (Hecht et al., 1995).

Todo lo anterior indicaría que las distintas variantes tienen alguna ventaja en determinado tipo de células o que distintos factores celulares contribuyen en la transformación de las células.

En los estudios realizados sobre variantes de E6 se ha encontrado que una variante frecuente es la que reemplaza una T por una G en el nucleótido 350 lo cual resulta en el intercambio de una leucina por una valina (Yamada et al., 1995; Brady et al., 1999). Esta variante fue asociada con progresión a cáncer (Londesborough et al., 1996; Zebhe et al., 1998). Sin embargo, se han reportado otros resultados discordantes en los que no se halló asociación entre la presencia de esta variante y el riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino (Bontkes et al., 1998; Nindl et al., 1999).

Existe otra variante de la proteína E6 conocida como 131G para la cual se han encontrado también resultados contradictorios, pues mientras en un estudio de la región E6 en lesiones preinvasivas se encuentra en baja (Bontkes et al., 1998) en otro protocolo llevado a cabo en el Reino Unido se ha reportado la presencia de esta variante hasta en un 30 % (Brady et al., 1999).

Para explicar estas diferencias entre la presencia de cierta variante de E6 y el riesgo de progresión hacia el cáncer se ha planteado que la diferencia de oncogenicidad depende de la zona geográfica, posiblemente por las variaciones genéticas de la

población; entre las que destacan la distribución de los distintos alelos de HLA. (Nindl, et al., 1999; Brady, et al., 1999).

Se ha demostrado también que las diferentes variantes de E6 de los HPV-16 difieren en su capacidad de anular la diferenciación de los queratinocitos y en su capacidad de inducir la degradación de p53, *in vitro*, lo cual demuestra que las variantes tienen diferencias en sus propiedades biológicas y bioquímicas que pueden dar como resultado diferencia en su patogenicidad (Stoppler et al., 1996).

Por otro lado, se ha intentado relacionar el polimorfismo de los alelos de p53 con la capacidad de E6 para unirse a ellos. Se considera que los homocigotos para la arginina en el codón 72 del gen de p53 tienen un riesgo incrementado para el desarrollo de CaCU comparado con los homocigotos para la prolina, ya que el producto del primer alelo es más susceptible de ser degradado (Storey et al., 1998). Sin embargo este comportamiento ha demostrado ser independiente de las variantes en E6 (Zehbe et al., 2001, Brady et al., 1999).

En cuanto a E7 se ha encontrado que es una región altamente conservada, en donde hay pocas variaciones que rara vez producen un cambio de aminoácido. (Nindl et al., 1999).

Algunas mutaciones en el genoma del HPV-16 aumentan la actividad del promotor que da lugar a la transcripción de E6 y E7 (May et al., 1994). Recientemente pudo establecerse que las variantes AA y NA1 presentan una actividad mayor en el promotor P97 que las variantes Af1 y Af2, las cuales tienen actividad similar a la clona

europea de referencia. Esta actividad transcripcional elevada se atribuyó a una transición A/C en la posición 7229 (Kámer, et al., 2000).

Para la proteína E2 también se han reportado variantes tanto para el HPV-16 como para el HPV-18, sin embargo éstas no mostraron correlación con el grado de lesión. Las variantes del tipo 16 presentan un cambio de una C por T en la posición 3049 dando como resultado un cambio de aminoácido en la posición 219 de prolina a serina. Estas variantes co-segregan con la variante de E6 T350G, por lo tanto podrían considerarse marcadores adicionales de riesgo (Terry et al., 1997).

En resumen, el estudio de las variantes de HPV es importante por estas razones: a) se ha determinado que las distintas variantes se asocian a determinados tipos histológicos de CaCU y a un diferente comportamiento biológico y agresividad; b) la presencia de un tipo determinado de variante se asocia a la etnicidad de la población más que a la zona geográfica . Todo lo anterior puede ser útil para el pronóstico de la enfermedad.

	E6	L1:HPV09/11	LCR	
		66866666666666	77777777777777	
	11111111111122222223345	67888888999999	4445566666777777788888	
	0333344467788556688893503	92025666035679	88902146788123456888923334	
	912573516838567956955032	51364258418504	59671139089490324167264792	
Ref.	TAGATCGCGTTCGGCGCTATCTAA	AGACCTCAATCCAG	AGTAGATCAACTATACTCTCGGAC	
CR. 5110	-----	-----	-----	E-P
CR. 4724	-----	-----	-A-----	E-P
CR. 6311	-----T-----C-----	-----	-A-----	E-P
CR. 4997	-----AA-----C-----	-----	-A-----	E-P
IS. 645	-----G-----	-----A-----	-A-----	E-m
CR. 6170	C-----	-----	-----	E-C109T
CR. 8029	C-----	G-----	-A-----	E-C109G
CR. 9237	G-----	G-----	C-----C-----	E-G131G
CR. 0199	G-----	G-----	C-----	E-G131G
IS. 105	-----A-----	-----	-----	E-A178T
IS. 244	-----A-----	-----	-A-----	E-A176T
IS. 463	-----A-----A-----	-----	-A-----	E-A176A
IS. 489	-----A-----G-----	-----	-A-----	E-A176G
IS. 925	-----A-----T-----	-----	-A-----	E-A178T
IS. 1032	-----A-----	T-----	C-A-----	E-A178T
IS. 364	-----C-----	-----	-----	E-C188T
IS. 7	-----C-----G-----	-----	-A-----	E-C188G
CR. 7574	-----G-----T-----	-----	-A-----C-----C-----	A As
CR. 5428	-----G-----	-----	-A-----C-----	A As
CR. 7587	--C--GT-----AG-T--	-A-T-----TA	-A-A-----A-----T-T--T--	Af1-a
CR. 1905	--C--GT-----AG-T--	-A-T-----TA	-A-A-----AA-----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	--C--GT-----AG-T--	-A-T-----TA	-A-A-----A-----T-T--T--	Af1-c
IS. 398	--G--GT-----AGTG	-A-T-----TA	-A-A-----A-----T-T--T--	Af1-d
IS. 838	--G--GT-----AGTG	-A-T-----TA	-A-A-----A-----T-T-G-T--	Af1-d
IS. 347	--G--GT-----AGTG	-A-T-G-----TA	-A-A-T-A-----T-T--T--	Af1-e
CR. 7145	C-T--GT-----AG-T-G	CA-T-T-----TA	CA--A-T-----T-T--ATCG	Af2-a
CR. 3759	C-T--GT-----AG-T-G	CA-T-T-----TA	CA--A-T-A-----T-T--ATCG	Af2-a
IS. 812	C-T--GT-----AG-T-G	CC-T-T-----TA	CA--A-T-A-----T-T--A-CG	Af2-a
IS. 170	--GT-----AG-T-G	CA-T-T-C-----TA	CA--A-T-A-----T-T--ATC	Af2-b
IS. 808	--GT-----AG-T--	CA-T-T-T-----TA	CA--A-T-A-----T-T--ATC	Af2-b
IS. 846	--GT-----AG-T--	CA-T-T-----TA	CA--A-GT-A-----T-T--ATC	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-A-----T-T--ATC	Af2-b
IS. 811	--AGT-----GAG-T--	CA-T-T-----TA	CA--A-TG-A-----T-T--ATC	Af2-c
IS. 815	--AGT-----GAG-T--	CA-T-T-----TA	CA--A-TG-A-----T-T--ATC	Af2-c
CR. 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
CR. 8160	-----T-----AG-TG-G	CAT-T-T-----TA	CA--A-T--A-C-G-T-T-----	AA-a
CR. 4541	-----T-----AG-TG-G	CAT-T-T-----TA	CA--A-T--A-C-G-T-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-G-G	C-----T-T-----TA	CA--A-T--A-C-G-T-T-----	AA-b
IS. 53	-----T-----AG-TG-C	CA-TCT-----TA	CA--GA--T--A-C-----T-T-----	AA-c
IS. 111	-----T-----AG-TG-C	CA-TCT-----TA	CA--GA--T--A-C-----T-T-----	AA-c

Figura 7. Diferencias en las regiones E6, L1 y LCR de las diferentes variantes del HPV-16 (Yamada, et al., 1997).

2. Justificación del problema

De acuerdo a los antecedentes dados podría pensarse que la alta incidencia de CaCU en nuestro país podría no sólo deberse a una falta de diagnóstico oportuno, sino que hay un factor relacionado a las variantes de los tipos 16 y 18 que infectan a la población mexicana. Estas variantes se encuentran comúnmente en las poblaciones con un componente amerindio importante y han demostrado un comportamiento más agresivo que aquellas presentes preferentemente en otros grupos étnicos.

Con anterioridad se había realizado un estudio en México donde se habían tipificado los HPV's y variantes presentes en una muestra de tumores de distintos tipos histológicos (Lizano et al, 1994). Los resultados indican diferencias en las propiedades biológicas de las variantes.

Por tanto, creemos de gran importancia analizar la distribución de los tipos y variantes del 16 y 18 en una muestra de la población que presenta lesiones precancerosas tanto de bajo grado como de alto grado y un grupo de personas con citología normal. Todas las pacientes incluidas en el estudio resultaron positivas para la infección por HPV de alto riesgo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

- Analizar los diferentes tipos y variantes de HPV presentes en las lesiones premalignas de una población femenina mexicana .

3.2. Objetivos Específicos

- Estandarizar el método de PCR-SSCP para hacer posible la diferenciación del mayor número de tipos y variantes del HPV
- Determinar la frecuencia de los tipos de HPV y las variantes específicamente del HPV-16 y del HPV-18 en la población femenina mexicana.
- Analizar la posible correlación entre el tipo y variante de HPV encontrada y el grado de lesión de la paciente.

4. Materiales y Métodos

4.1 Muestras

La toma de muestra consiste en un cepillado cervical que el Ginecólogo realiza a la paciente con el objeto de desprender unas cuantas células epiteliales de su cérvix, luego coloca el cepillo en un tubo con medio de transporte. El cepillo y el medio se incluyen en el DIGINE Cervical Sampler

En total fueron incluidas en el estudio 90 muestras que habían sido procesadas mediante el kit de Captura de Híbridos II de DIGINE y que resultaron positivas para HPV de alto riesgo. Este Kit detecta en conjunto los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68: el resultado obtenido indica positivo o negativo para HPV de alto riesgo, pero no especifica de que tipo se trata.

Para los casos de lesión las muestras se obtuvieron de pacientes que fueron referidas, por sospecha de NIC, 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) Se confirmó por diagnóstico histopatológico la presencia de NIC I a III en biopsia o cono cervical. Fueron excluidos los casos que ingresaron al estudio por sospecha de NIC y cuyo resultado histopatológico fue negativo o cáncer invasor

Los controles fueron tomados de mujeres que acudieron a una unidad de primer nivel de atención médica del IMSS y que no mostraron alteraciones de NIC o cáncer invasor en la citología. Estas pacientes acudieron por iniciativa propia o para estudio de rutina y aceptaron participar en el estudio

El periodo de estudio comprendió de octubre de 1998 a enero del año 2000

El tubo donde viene la muestra se agitó vigorosamente utilizando el vórtex y se tomaron 500 μ L del medio de transporte en donde deben ir las células epiteliales del cérvix para la extracción de DNA.

Se incluye un esquema de la metodología experimental seguida (Figura 6)

4.2 Extracción y Cuantificación de DNA

La extracción de DNA se realizó por el método del fenol-cloroformo. El fenol utilizado debe estar previamente equilibrado.

4.2.1 Equilibración del fenol.

Es necesario equilibrar el fenol a $\text{pH} > 7.8$ pues el DNA pasa a la fase orgánica a pH ácido

El fenol se guarda a -20 °C. Cuando se vaya a usar retirar del congelador y permitir que alcance temperatura ambiente. Fundirlo a 68 °C y adicionar hidroxiquinolina a una concentración de 0.1 % (como antioxidante, inhibidor de RNAsas y quelante débil de iones). El fenol toma un color amarillento que permite identificar de manera más fácil la fase orgánica. Posteriormente se adiciona un volumen igual de Tris-Cl 0.5 M $\text{pH}=8.0$ a temperatura ambiente. Agitar por 15 minutos con agitador magnético y apagar el agitador. Permitir que las dos fases se separen y eliminar la de arriba

(acuosa) con una pipeta conectada a una línea de vacío con una trampa. Repetir la extracción hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor a 7.8 (con papel pH). Después de remover la última fase acuosa adicionar 0.1 del volumen de Tris-Cl 0.1 M pH=8.0 con 0.2 % de β -mercaptoetanol. Esta solución puede ser almacenada bajo Tris-Cl 100 mM pH=8.0 en una botella ámbar a 4 °C hasta por un mes.

4.2.2 Extracción de DNA

Agregar a los 500 μ L de la muestra un volumen igual de buffer de Lisis (Tris 10 mM pH=8.0, EDTA 0.1 M pH=8.0, 0.5% SDS, 20 μ g/mL de RNAsa) y 6 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Incubar toda la noche a 55 °C.

Adicionar un volumen igual de fenol-(cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) (1:1) saturado y equilibrado con Tris, agitar invirtiendo el tubo. Centrifugar a 12 000 rpm 5 minutos a temperatura ambiente.

Transferir la fase acuosa (la de arriba) a otro tubo. Tener cuidado de no llevarse la interfase blanca de proteínas que se forma.

Agregar un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Agitar invirtiendo el tubo. Centrifugar a 12 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Recuperar la fase acuosa y transferirla a otro tubo.

Agregar 2.5 volúmenes de etanol 100 % a -20°C y 1/10 de volumen de acetato de amonio 4 M. Colocar las muestras a -70°C durante 15-30 minutos. Centrifugar a 12000 rpm durante 30 minutos a -4°C .

Lavar con etanol 70 % a -20°C . Resuspender el pellet obtenido en 20 μ L de agua.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

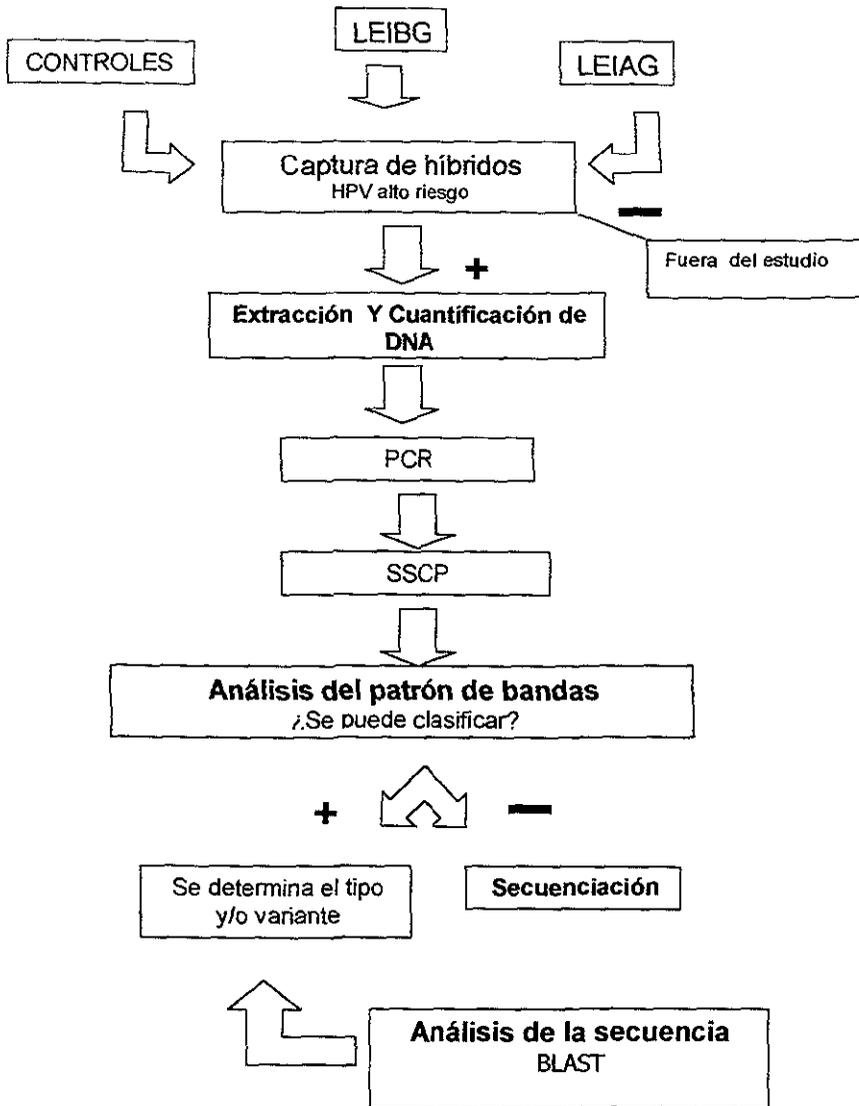


Figura 8. Metodología Experimental seguida durante la realización de este trabajo.

4.2.3 Cuantificación de DNA

Una vez extraído se procedió a cuantificar el DNA obtenido de cada muestra por espectrofotometría de UV a una longitud de onda de 260 nm. Paralelamente, se determina la cantidad de proteína presente a 280 nm. El cociente entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) nos da una idea de la pureza de los ácidos nucleicos. Un valor adecuado para este cociente se encuentra entre 1.8 y 2.0.

4.3 Amplificación por la técnica de PCR.

La amplificación mediante PCR se realizó con los oligonucleótidos consenso GP5+/GP6+ (Snijders et al., 1995), que amplifican un fragmento de 140 pares de bases de la región L1 del genoma del HPV. Este fragmento fue utilizado para tipificar mediante la técnica de SSCP. Los controles utilizados incluyen plásmidos de diferentes tipos de HPV, líneas celulares que contenían secuencias virales conocidas y tumores previamente secuenciados. Uno de los nucleótidos utilizados, en este caso dCTP, está marcado con P^{32} . Se muestran las condiciones utilizadas en la reacción de PCR en la Tabla III.

Tabla III. Condiciones de reacción utilizadas durante la amplificación por PCR.

Reactivos	CONCENTRACION STOCK	CONCENTRACION FINAL
Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25 mM	3 mM
dATP, dGTP, dTTP	2 mM	200 μM
dCTP	0.25 mM	12 μM
GP5+	50 pmol/μL	1 pmol/ μL
GP6+	50 pmol/ μL	1 pmol/ μL
AmpliTaQ Gold (Perkin Elmer)	0.5 U/ μL	0.1 U/muestra
dCTP ³²	10 μCu/ μL	1 μ Cu/ muestra

Se completa con agua hasta el volumen de reacción requerido. En este caso las reacciones se hicieron en 10 μL.

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados durante la realización del protocolo.

Fragmento amplificado			Oligonucleótido
Gen	Longitud (pb)	Nombre	Secuencia
L1	140	GP5+	5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3'
L1	140	GP6+	5'GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC3'
L1	240	L1C1	5'CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTT3'
L1	240	L1C2	5'TACCCTAAATACTCTGTATTG3'

La amplificación por PCR se realizó de acuerdo al siguiente programa:

Temperatura	Tiempo
1 ciclo	
95 °	10 minutos
38 ciclos	
95°	40 segundos
48°	40 segundos
72°	40 segundos
1 ciclo	
72°	5 minutos

4.4 Ensayo de SSCP

Esta técnica toma su nombre de sus siglas en inglés Single Strand Conformational Polimorfism, es decir, Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla. Utilizándola es posible detectar mutaciones puntuales mediante el cambio de conformación intracadena de hebras sencillas de DNA. Al cambiar la conformación el patrón de comimiento electroforético se modifica y puede detectarse fácilmente la diferencia entre los prototipos y las variantes del HPV.

La técnica consiste en desnaturalizar el DNA ,previamente amplificado, utilizando calor y formamida para luego correr las muestras en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. De esta manera se da la complementariedad entre bases dentro

de una misma cadena de DNA adquiriéndose una estructura secundaria o varias de ellas. Por tal motivo, no debe permitirse que el gel se caliente, ya que esto impide la formación de dicha estructura secundaria. Se recomienda que si el gel va a correr a temperatura ambiente no se utilicen más de 10 Watts por 12 a 24 hrs. En cambio, si la corrida va a ser a 4° C se usen máximo 20 Watts durante un período de 3 a 8 hrs

Después de realizar varios ensayos se concluyó que la mayor diferencia para los tipos de HPV se lograba en un gel de poliacrilamida al 6% corriéndolo en una cámara de secuencia a 20 Watts durante 5 hrs. El buffer de corrida fue TBE 1X.

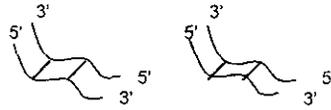
Se tomó 1 μ L de la reacción de PCR y se diluyó en 13 μ L de la solución STOP (95 % Formamida, 20 mM EDTA, 0.05% Azul de bromofenol, 0.05% Xilen Cianol). Se desnaturalizó con temperatura 15 minutos a 95° C e inmediatamente se colocaron en hielo para evitar que se forme vuelva a formar la doble cadena del DNA. Se tomaron 3 μ L para cargar en el gel.

Al terminar la corrida del gel éste se secó sobre papel filtro y se puso a exponer con una placa fotográfica KODAK X-Omat. Las placas fotográficas se revelaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fijador y Revelador KodakP/X -Omat) A esta técnica se le conoce como Autorradiografía

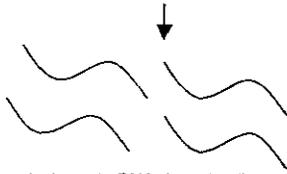
En cada corrida incluimos muestras con tipos de HPV conocidos como control del patrón electroforético para poder comparar con las muestras problema. Aquellas que presenten el mismo patrón deben contener el mismo tipo o variante del virus. Dentro de estos controles se incluyen plásmidos con el genoma de algún papilomavirus clonado, líneas celulares que contienen integrado el genoma de un tipo de HPV y muestras previamente secuenciadas. Entre las líneas celulares utilizadas se encuentran las siguientes: i) HeLa, la cual contiene la secuencia de la variante E (correspondiente a la variante E) del tipo 18 (aislado G18-1, ver Figura 6); ii) SiHa y iii) Caski, que presentan variantes de la rama E del tipo 16 (clona de referencia, ver figura 5).

Es necesario hacer la observación de que, si bien HeLa contiene una variante (E) distinta a la de referencia, no presenta cambios en la región estudiada con respecto a esta última. En consecuencia, no es posible diferenciar estas dos variantes en esta región. Por tanto, se reporta de manera independiente a la 18 Af y conjuntamente a la 18 E junto con la referencia.

Fragmentos de DNA amplificados por PCR

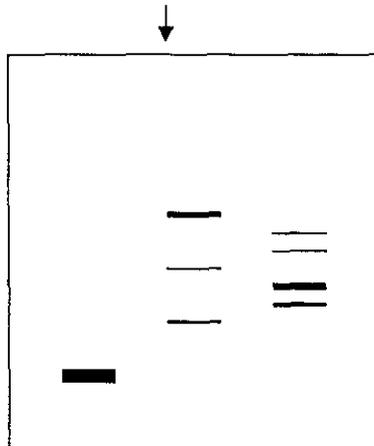


Desnaturalización con formamida y calor



Hebras de DNA desnaturalizadas

Correr en condiciones no desnaturalizantes
Poliacrilamida 6% 4°C
Se da la complementaridad entre las bases de la misma
cadena y adquieren estructura secundaria.



DNA sin
desnaturalizar

Diferentes estructuras
secundarias del DNA

Figura 9. Esquema del ensayo de SSCP

4.5 Secuenciación de DNA.

Los patrones diferentes a los controles se secuenciaron para conocer el tipo de HPV que se trataba.

Para amplificar se utilizaron los oligonucleótidos GP5+/GP6+ utilizados en la técnica de SSCP, o los oligonucleótidos L1C1/L1C2 que amplifican una región de 240 pares de bases de la región L1.

Los productos de PCR purificados se secuenciaron mediante la técnica de Sanger de los terminadores de cadena utilizando Termo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit PN 79750 (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El método de Sanger se basa en la síntesis enzimática de DNA usando el segmento a secuenciar como molde. Se realizan cuatro reacciones de amplificación distintas en cuatro tubos separados, los cuales contienen los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Cada tubo contiene un dideoxinucleótido diferente (ddNTP) que carece del OH en la posición 3' indispensable para formar el enlace fosfodiéster, por tanto, en el momento que se adiciona es imposible seguir la extensión de la cadena. Debido a esto a los dideoxinucleótidos se les conoce como terminadores de cadena. En nuestro caso los dideoxinucleótidos estaban marcados cada uno con P³³. Así, se obtienen productos de terminación de cadena de diferente longitud para cada base del DNA (A,G,C y T). Las muestras de los diferentes tubos se corren en carriles separados de geles de alta resolución. Esto incluye poliacrilamida 6% (en nuestro caso) 7 M de urea y aproximadamente 1500 V . En este caso la urea minimiza el

efecto de la estructura secundaria. Las condiciones mencionadas son desnaturalizantes por lo que las bandas sólo corren por su peso molecular permitiendo diferenciar hasta una base de longitud. De esta manera se genera un conjunto de bandas de diversos tamaños quedando abajo en el gel los más pequeños, es decir, los que adicionaron el didesoxinucleótido más cerca del extremo 5'. Por tanto, al leer el gel de abajo hacia arriba obtenemos la secuencia en dirección 5' a 3' del fragmento secuenciado.

Por último, los secuencia de bases obtenidas se introdujo al programa BLAST presente en la dirección www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST para su interpretación. En este programa es posible realizar la comparación de secuencias problema con las que se encuentran reportadas en distintos bancos de datos, como el Gene Bank.

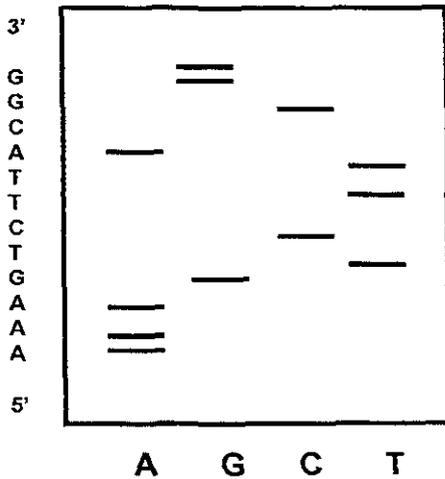


Figura 10. Esquema representativo de un gel de secuenciación. Se observan los cuatro canales correspondientes a cada uno de los tubos de reacción. Las bandas indican la base en la que se terminó la cadena con un didesoxinucleótido.

5. Resultados

Con el objeto de conocer como se distribuyen los tipos y variantes del HPV dentro de una muestra de la población femenina mexicana compuesta por mujeres que presentan lesiones (de bajo y alto grado) y mujeres que no presentan lesiones (controles), en este trabajo analizamos un conjunto de muestras todas positivas a HPV de alto riesgo.

Para hacer el análisis de las muestras utilizamos la técnica de SSCP, la cual nos permite detectar cambios puntuales en un fragmento de DNA amplificado. Esta técnica se basa en la formación de segmentos complementarios intracadena en hebras sencillas de DNA por lo que éstas adquieren una estructura secundaria determinada que produce cierto patrón de bandeo al correr en un gel de poliacrilamida (las condiciones se describen en la sección de materiales y métodos). Al haber algún cambio, incluso de una sola base, la estructura secundaria se ve modificada y esto se refleja en el patrón de corrimiento electroforético.

El SSCP es una manera eficaz de procesar un volumen grande de muestras, ya que realiza un tamizaje en el que es posible identificar las muestras que presentan el mismo patrón de corrimiento electroforético. Si incluimos muestras que contengan tipos o variantes conocidos podemos comparar los patrones que producen con aquellos obtenidos de las muestras problema y determinar a que tipo o variante

corresponden cada uno. Los amplificados que presenten un bandeo diferente deben ser secuenciados para conocer cuál HPV contienen.

Estas muestras de tipos o variantes conocidos previamente por nosotros les denominamos "controles" y no tienen nada que ver con el grupo control de pacientes.

Como puede observarse en la figura 11 que corresponde al gel de SSCP de los controles, los distintos tipos y variantes del HPV presentan un diferente patrón de corrimiento electroforético, lo cual hace posible diferenciarlos por medio de esta técnica. La utilización de los nucleótidos consenso GP5+/GP6+ nos permite la amplificación de una zona de la región L1 en la que se pueden detectar cambios para un amplio número de tipos del virus en estudio. El fragmento producido (140 pb) tiene un tamaño adecuado para la técnica descrita ya que al ser pequeño permite que el cambio en una base afecte de manera importante la movilidad electroforética de todo el fragmento.

Hay que destacar que el Kit de Captura Híbrida utilizado sólo detecta ciertos tipos de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), por lo que no se esperaría la presencia de otros tipos.

La única variante identificada para el tipo 16 en el grupo de estudio fue la Asiático-Americana, por lo que se le denominó 16 AA y a la clona de referencia simplemente 16 (la cual pertenece a la rama Europea). Éstas dos variantes presentan una diferencia evidente en su corrimiento electroforético como puede apreciarse en la figura 12. Dos

de las bandas de la 16 AA corren más que la clona de referencia lo que las hace fácilmente diferenciables.

De igual manera, es evidente la diferencia entre la variante de referencia del tipo 18 (que pertenece a la rama As+Al) denominada solamente 18, y la reportada como 18 Af (ver figuras 11, 12, 13 y 14).

Asimismo en las figuras 13 y 14 se presentan muestras con distintos tipos de patrones en comparación con los controles por lo que fueron secuenciadas dando como resultado diferentes tipos de HPV.

Un ejemplo de los geles obtenidos por la secuenciación se observa en la figura 15, en este caso con GP5+. Sin embargo, también se realizaron secuencias con L1C1 en caso de que se tuviera la duda del resultado. Para poder identificarlos además del BLAST se utilizaron los datos de las tablas V (Human Papillomavirus, 1995) los cuales nos muestran los cambios que presentan los distintos tipos de HPV en estas regiones.

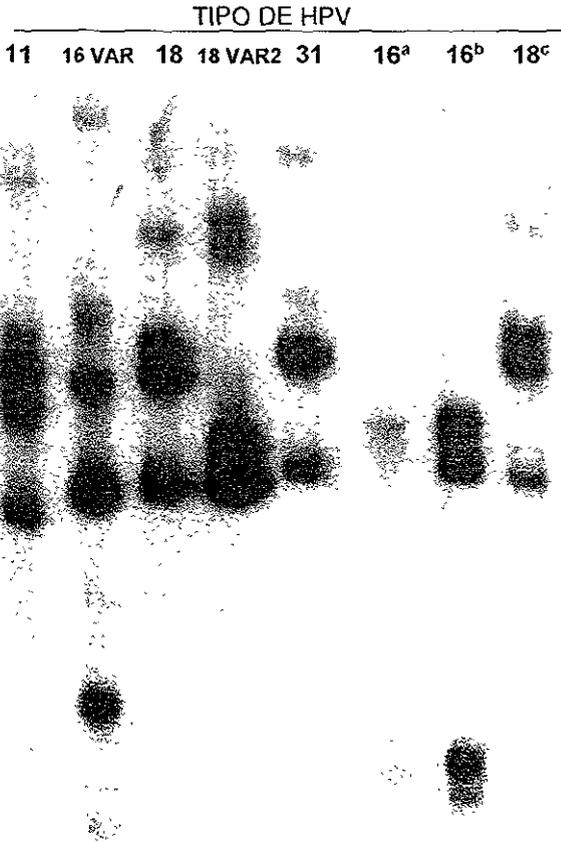


Figura 11. Patrón de corrimiento electroforético por la técnica de SSCP de distintos tipos de HPV. Cada HPV produce un patrón de bandeo característico que lo hace fácilmente diferenciable del resto. En este caso se conocía previamente el tipo presente ya sea clonado en un plásmido (11, 18 y 31), en una muestra previamente secuenciada (18 var 2 y 16 var) o en líneas celulares. Se utilizaron los primers GP5+/GP6+ para realizar la amplificación de la región L1. La variante del tipo 16 corresponde a la rama AA y la var-2 del 18 corresponde a la Af.

- ^a Línea celular Caski
- ^b Línea celular Siha
- ^c Línea celular Caló

TIPO DE HPV

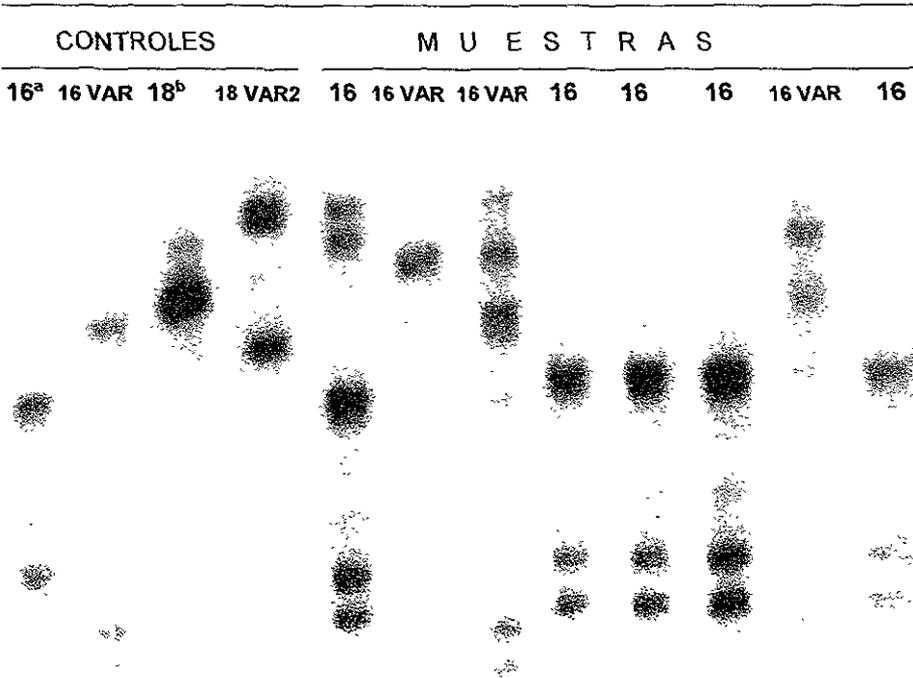


Figura 12. Puede llevarse a cabo la identificación de variantes mediante SSCP en el segmento amplificado (GP5+/GP6+). Se observa la diferencia en el corrimiento de las clonas de referencia tanto del tipo 16 como del 18 y sus respectivas variantes.

^a Siha ^b HeLa

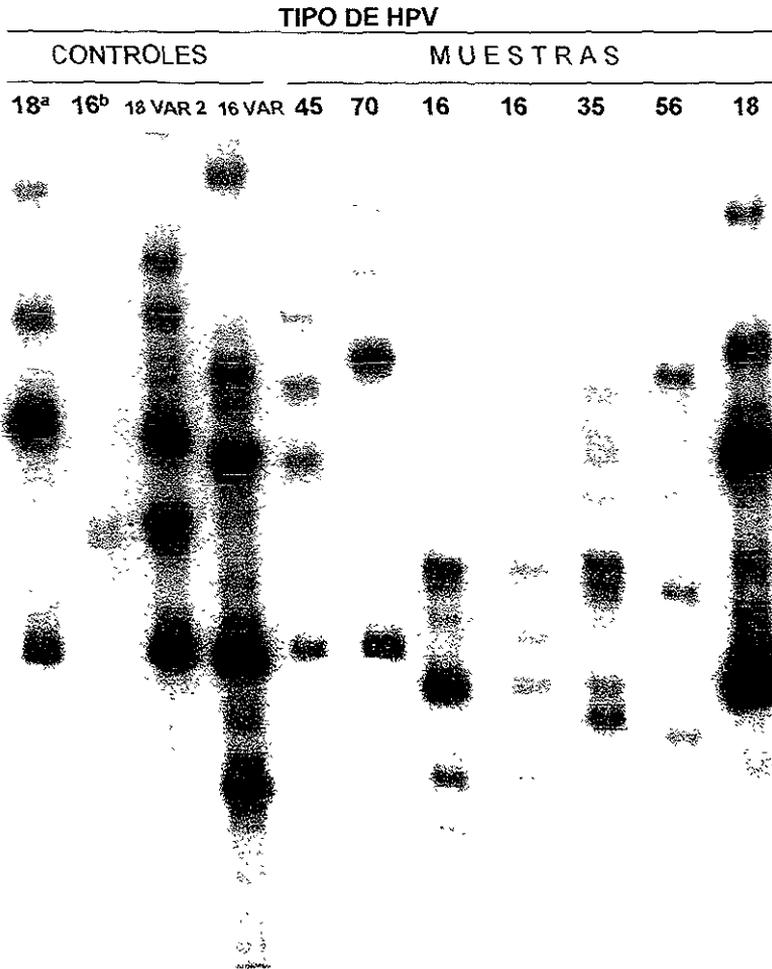


Figura 13. En las muestras se pueden apreciar patrones nuevos a los ya observados, los cuales fueron secuenciados para obtener el tipo de HPV en cuestión. Los controles se refieren a tipos previamente conocidos que se utilizan para hacer la comparación con las muestras problema. Se considera que los patrones iguales o muy similares contienen el mismo tipo o variante.

^a HeLa

^b Caski

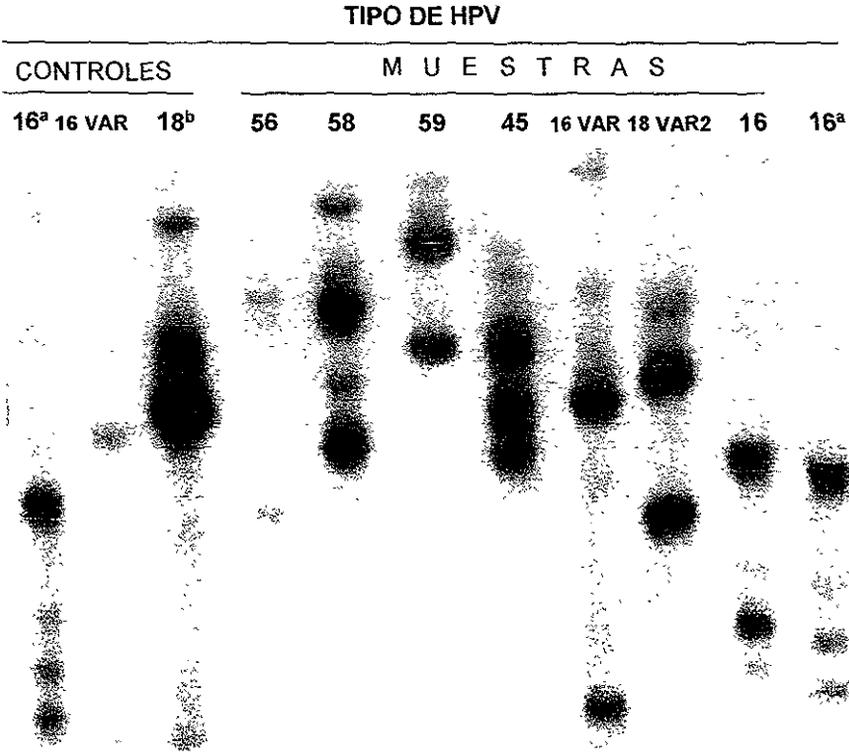


Figura 14. En este gel observamos la aparición de nuevos patrones correspondientes al tipo 56, 58 y 59, además de los ya conocidos. Estos nuevos tipos se obtuvieron por secuenciación.

^a Siha ^b HeLa

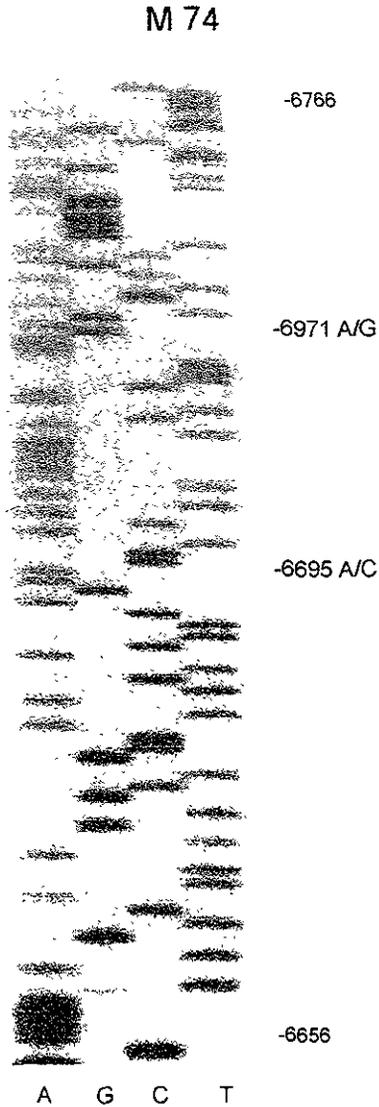


Figura 15. Autorradiografía del gel de secuenciación obtenida a partir de la muestra 74 con GP5+. Después del análisis de la secuencia de bases se determinó que se trataba de 16 AA. Se indican los cambios observados con respecto a la clona de referencia

6626

GroupA6.con	CAACGTC?CAAGG?CAATAAATGGCATTTG?TGGgg?AAcCag?TATTNGT <u>LACTGTTGtGgGATAC</u> ?AC?	998
HPV30	-----C--A-----A--C-----T-----C--C--G-----C--C--T	1032
HPV53	-----C--T-----A--C-----AAC-----T-----A-----C--C	1005
HPV56	-----C--A--C-----C-----C-----T-----AT-----A--A--T--T	1113
HPV66	-----A-----C-----A-----C-----T-----T-----T-----C	1098
GroupA7.con	CAVAAGGCcCAGGG?cacACAATGGcaTcTGTGGCAcAAcCAATTTT?T <u>LACTGTTGtGgGATAC</u>	1120
HPV18	-----A-----T-----G-----C-----G-----A-----G-----A--T--C	1194
HPV45	-----C--T-----A-----G-----G-----G-----A-----C--C	1098
HPV39	-----A-----T-----C-----G-----G-----A-----C-----C--A	1005
HPV70	-----A-----T-----C-----G-----G-----A-----C-----C--A	1005
HPV59	-----C--T-----T--T--A-----A-----C-----G-----T--A--A-----A--T--	1011
GroupA9.con	CaacgGCaCagGGcCAATAATGGcATT?GcTGGGGAATCagTcT <u>TtGTLACTGTTGtGgGATAC</u> C	1005
HPV16	-----A-----C-----T-----C--AC-----T-----T--A	1089
HPV35h	-----T-----A-----T-----A--T--C--A--G-----A-----A--C	1005
HPV31	-----T-----A--C-----T-----T-----C--A--G-----G--A--A	1014
HPV52	-----G-----C-----C-----A-----G-----C--A--T--G	1104
HPV33	-----A-----T-----T-----G-----G-----G--A	1011
HPV58	-----G-----A-----C-----C-----C-----C--G	1089
GroupA10.con	CaaAagGc?CAGGGcACaAATAATGGcATT?GcTGGGG?AAcCa?cT <u>TtGTLACTGTTGtGgGATAC</u> C	939
HPV11	-----T-----T-----C-----A--C--C-----G-----C-----	1002
GroupA6.con	AGA??ACAACATG.....ACTaTt?ctgCa?C?AcAcaaaCgtTa.....	1034
HPV30	--G-AC-----T-----A--C-----A--T-----A--C-----	1074
HPV53	--G-AT-----C--T--C--A--C-----GT-TA-G.....	1047
HPV56	--A-GT--T-----A--G--A--TG--T--G--CA-----	1155
HPV66	--A-GC--C-----AA--G--T--A--GC--A-----	1050
GroupA7.con	CgcAGTAcCAATLT.....aCatT?T?TgC?ctcAcagaaCct?Ct?TaOCt.....	1163
HPV18	--C-----A--A--G-----T-----C--G--C--G-----	1242
HPV45	--T-----T-----A-----A--G--C-----C--AA--C--G--G--A-----	1146
HPV39	--T-----T-----A-----A--C--A--C-----T-----G--T--CA-----	1056
HPV70	--T-----T-----A-----G--C--C--GC--C--A--GG--CA-----	1053
HPV59	--C-----C-----C-----T--TG--G--G-----TACT--T--A--T-----	1059
GroupA9.con	cGcAGTAcTAALcTG.....aCtTtTaTgGcTgC?gT?cCa??q??g???	1040
HPV16	--C--A--A-----T--A-----CA--T-----CTTC--AA-----	1134
HPV35h	--A-----A-----T--G--G--T-----T--GT--TCTAGT--AC-----	1050
HPV31	--C-----C-----T--G--T-----AA--TG--A--ACAGT--AT-----	1059
HPV52	--C--T--C-----A--G--TAAA--AGGA-----	1146
HPV33	--C--T-----CA--ACAA--AA--GTGAC-----	1053
HPV58	--C--T-----A--CA--AA--AA--AGGA-----	1131
GroupA10.con	CGcAGTAcAAAcATG.....ACa?TaTGTGC?CcaCaC??Tcctctc?	979
HPV11	--T-----T-----C-----A--T--TGT--TAAA-----	1044
GroupA6.con	?cLa?ATAT?AT?Ca?g?cAAATCAA?CagTA??TcaGacATGt?GAGGAAT <u>ATGAATACCA?TTTNGtGTT</u>	1095
HPV30	T--C--C--A--T--A--C-----A-----TG--A-----G-----	1146
HPV53	T--C--A--A--T--AAG-----A-----TG-----CA-----A-----	1119
HPV56	AG--A--G--G--CC--AA-----T--A--CC--C--C-----G-----	1227
HPV66	A--A--A--G--G--CC--TG--C--T--A--CC--C--C-----G-----	1122
GroupA7.con	a?TcaTATgacCtAcTaaGTTTAaghaTATac?AG?CAcGTgGAGGaaT <u>AGAAAT?CAATTAATcTtT</u>	1730
HPV18	GGCA-----G-----C--A-----C--G--GC--A-----T-----G--G--T-----	1314
HPV45	--G--C--C-----C--G-----GT--A-----A-----G-----T-----	1218
HPV39	TC--C-----T-----A-----C--G--C-----G-----A--A-----	1125
HPV70	GC--G-----AGC--A-----C--GT-----A-----G--C--A-----T-----G--G-----	1131
HPV59	--A--G-----CAcA-----C--GT-----A-----G--C--A-----T-----G--G-----	1131
GroupA9.con	agTcACaTaTAAaAaTga?AacTTTAagGaaTATc?TucGacATGgcGAGGaaT <u>AGAAAT?CAATTAATcTtT</u>	1110
HPV16	--C-----C-----C-----C--C-----G-----G-----	1206
HPV35h	--C-----C-----C-----T--A--G-----A-----A-----	1122
HPV31	--C-----T--G--AGT-----A--G--T--A-----T-----A-----A-----	1131
HPV52	--C-----A-----A-----CC--T--T-----C-----T-----A-----	1218
HPV33	-----A-----A-----A-----T--A-----T-----A-----G-----	1125
HPV58	-----T-----G-----G-----C-----T-----G-----	1203
GroupA10.con	gccACATA?AcTa?ctcagAaTATAAacAaTACATGCGaCATGTgGA?GaaT <u>AGAAAT?CAATTAATcTtT</u>	1048
HPV11	--T-----C-----A-----T-----GG-----C-----G-----G-----	1116

6766

Tabla V. Cambios en la región de L1 amplificada por los oligonucleótidos consenso GP5+/GP6+. Se muestran los principales tipos identificados en este estudio. En negritas se muestra el lugar donde alinea GP5+ y en negritas subrayado donde alinea GP6+. Los números 6626 y 6766 indican la región a que corresponde del HPV-16.

En total fueron 90 muestras las procesadas, y cuyos datos se presentan en la tabla VI aunados a los datos clínicos de las pacientes. Podemos observar que el HPV-16 (38.7% contando casos y controles) fue el más frecuente tanto en general como por tipo de lesión, le sigue el HPV-18 (10.8 %). Fueron frecuentes también el HPV-45 (7.5%), HPV58 (9.7) % y HPV 59 (5.4 %) (Tabla VII). Los otros tipos, encontrados en pocas muestras, fueron agrupados bajo la categoría de OTROS para hacer más fácil y confiable su estudio. (Figura 16).

Tabla VI. Datos clínicos de las pacientes de los distintos grupos y tipo de HPV detectado.

Muestra	Edad	Diagnóstico Histopatológico	Tipo de HPV
1	35	CONTROL	59
2	40	CONTROL	58
3	38	CONTROL	52
4	42	CONTROL	59
5	47	CONTROL	11+ 16
6	29	CONTROL	45 + 16
7	30	CONTROL	59
8	37	CONTROL	70
9	25	CONTROL	16 AA
10	26	CONTROL	16
11	64	CONTROL	16
12	60	CONTROL	18
13	61	CONTROL	45
14	127	CONTROL	45
15	44	CONTROL	66
16	60	CONTROL	70
17	47	CONTROL	16 AA + 11
18	*	CONTROL	58
19	*	CONTROL	58
20	63	LEIBG+ HPV	67
21	36	LEIBG + HPV	45
22	48	NIC I + HPV	16
23	20	LEIBG+HPV	16
24	32	LEIBG + HPV	58
25	35	LEIBG + HPV	70
26	45	LEIBG	16 AA
27	24	NIC I + HPV	18 Af
28	29	LEIBG + HPV	16
29	39	LIEBG+HPV	16 AA
30	24	LEIBG + HPV	16 AA
31	33	NIC I	16
32	51	LEIBG + HPV	35

33	39	LEIBG	16
34	49	ENDOCERVICITIS	18 Af
35	51	LEIBG + HPV	18
36	46	LEIBG	16 AA
37	66	LEIBG	16
38	29	LEIBG	16 AA
39	72	NIC I +HPV	59
40	41	LEIBG + HPV	16 AA
41	47	LEIBG	58
42	41	LEIBG	45
43	27	LEIBG+HPV	16 AA
44	45	NIC1 +HPV	59
45	30	LEIBG	56
46	41	LEIBG+HPV	45
47	41	LEIBG	16 AA
48	74	NIC I + HPV	70
49	32	LEIBG	16
50	24	LEIBG+HPV	31
51	36	NIC I +HPV	11
52	75	ENDOCERVICITIS + IHPV	16
53	40	LEIBG + HPV	18 Af
54	42	NIC I + ENDOCERVICITIS CRÓNICA	16
55	43	LEIBG + HPV	52
56		BAJO GRADO HPV	16
57	50	LEIAG + HPV	18 Af
58	28	LEIAG+HPV	31
59	32	LEIAG+HPV	66
60	40	CARCINOMA IN SITU CON EXTENSIÓN GLANDULAR NIC III + HPV	58
61	39	LEIAG + HPV	45
62	41	LEIAG+ HPV	16
63	32	LEIAG + HPV	67
64	46	NIC III	58
65	46	LEIAG + HPV	52
66	27	LEIAG + HPV	16
67	47	LEIAG + HPV CON EXTENSIÓN GLANDULAR	18 Af
68	36	CA IN SITU + EXTENSIÓN GLANDULAR	16
69	34	LEIAG + HPV	56
70	40	LEIAG	52
71	44	LEIAG + HPV	16
72	40	LEIAG + HPV	16 AA
73	20	NIC III	56
74	39	LEIAG	16 AA
75	43	LEIAG	58
76	63	FRAGMENTOS DE CARCINOMA PB INVASOR	18
77	45	LEIAG + HPV	58
78	55	NIC III CON EXTENSIÓN GLANDULAR	16
79	50	NIC III	16
80	51	NIC III + HPV	16 AA
81	42	NIC III CON EXTENSIÓN GLANDULAR	16
82	37	NIC III	16
83	46	LEIAG + HPV	11
84	43	LEIAG + HPV	39
85	*	ALTO GRADO HPV	18
86	*	ALTO GRADO HPV	16

87	*	ALTO GRADO	11
88	*	ALTO GRADO	18 Af
89	*	ALTO GRADO	53
90	36	NIC III	33

* Datos no disponibles. LEIBG= Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, correspondiente a NIC I; LEIAG= Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado correspondiente a NIC II y NIC III
16 VAR corresponde a la variante AA, única identificada en nuestro conjunto de muestras. Los tipos de referencia se denominan sólo 16 y 18

Hay que señalar que se encontraron tipos distintos a los que detecta el Kit de Captura Híbrida, como son el HPV- 53, 66, 67 y el 70 considerados como de riesgo intermedio y el HPV-11 considerado como de bajo riesgo. Este último fue encontrado como coinfección con el HPV-16 en dos de los cinco casos que se le atribuyen.

Tabla VII. Recuento del número de casos de cada HPV por tipo de lesión.

TIPO DE HPV	DIAGNOSTICO			TOTAL
	CONTROL	LEIBG	LEIAG	
11	2	1	2	5
16	6	18	12	36
18	1	4	5	10
31		1	1	2
33			1	1
35		1		1
39			1	1
45	3	3	1	7
52	1	1	2	4
53			1	1
56		1	2	3
58	3	2	4	9
59	3	2		5
66	1		1	2
67		1	1	2
70	2	2		4
TOTAL	22	37	34	93

En total son 90 muestras de las cuales 19 son controles, sin embargo, las coinfecciones se consideraron independientemente por lo que el total en controles aumentó a 22. Las coinfecciones se detectaron en los CONTROLES siendo éstas: 11+16 REF, 11+16 AA AA y 16 REF + 45. Contando casos y controles el tipo más común resultó el 16 (38.7%), siguiéndole el 18 (10.8%). También fueron frecuentes el 58 (9.7%), el 45 (7.5%) y el 59 (5.4%). Todos los demás representaron un 28 % de los casos.

Sólo contando las lesiones (LEIBG y LEIAG) el HPV-16 (incluyendo la var AA) se presentó en un 32% que es diferente del 49.9% reportado para CaCU (Bosch et al., 1995). En el caso del HPV-18 en este tipo de lesiones se presentó en un 9.6 % (incluyendo Af) diferente del 13.7% reportado para los tumores (Bosch et al., 1995). Con lo que respecta al grupo CONTROL, el 16 (incluyendo var AA) sólo se presentó en un 6.4 % y el 18 (incluyendo 18 Af) en un 1.1%.

El único caso donde observamos una disminución de infección asociada a la presencia del virus conforme aumenta el grado de lesión es en el tipo 59 (Tabla VI).

Podemos observar una menor proporción de los tipos oncogénicos como el 16 y el 18 en los controles con respecto a las lesiones. Para el grupo OTROS, los tipos incluidos en esta categoría se distribuyen más uniformemente entre los tres grupos de estudio (Figura 16) .

HPV	DIAGNOSTICO			TOTAL
	CONTROL	LEIBG	LEIAG	
16	4	10	9	23
16 AA	2	8	3	13
18	1	1	2	4
18 Af		3	3	6

Tabla VIII. Distribución de los tipos 16 , 18 y sus variantes detectadas en los grupos de estudio.

Estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre el HPV 16 prototipo y el HPV 16 AA dentro de las lesiones de alto y bajo grado ($p=0.44$, prueba exacta de Fischer) De hecho se encontraron más casos de este tipo de papilomavirus y de la variante en las lesiones de bajo grado que en las de alto. Para el HPV 18 prototipo y el HPV 18 Af no se encuentra diferencia estadísticamente significativa para LEIBG y LEIAG ($p=1.0$, Fischer) ; Sin embargo la variante no se encontró en los controles (Tabla VIII, figuras 17 y 18) y la clona de referencia fue más abundante en las lesiones de alto grado.

En la región de L1 amplificada por GP5/GP6+ para HPV-16 (posiciones 6626-6726) hay dos cambios: una A cambia por C en la posición 6695 lo que da como resultado que una serina reemplace a una treonina (aa 379) , y un cambio silencioso de una A por G en el 6721

Con respecto al HPV-18 amplificado con los mismos primers (posiciones 6600-6740) ocurren tres cambios de la 18 Af con respecto a la referencia, dos de ellos silenciosos; T por C 6626 y A por G6719; y uno de ellos , G por C 6625, hace que una arginina reemplace a una prolina (aa 399).

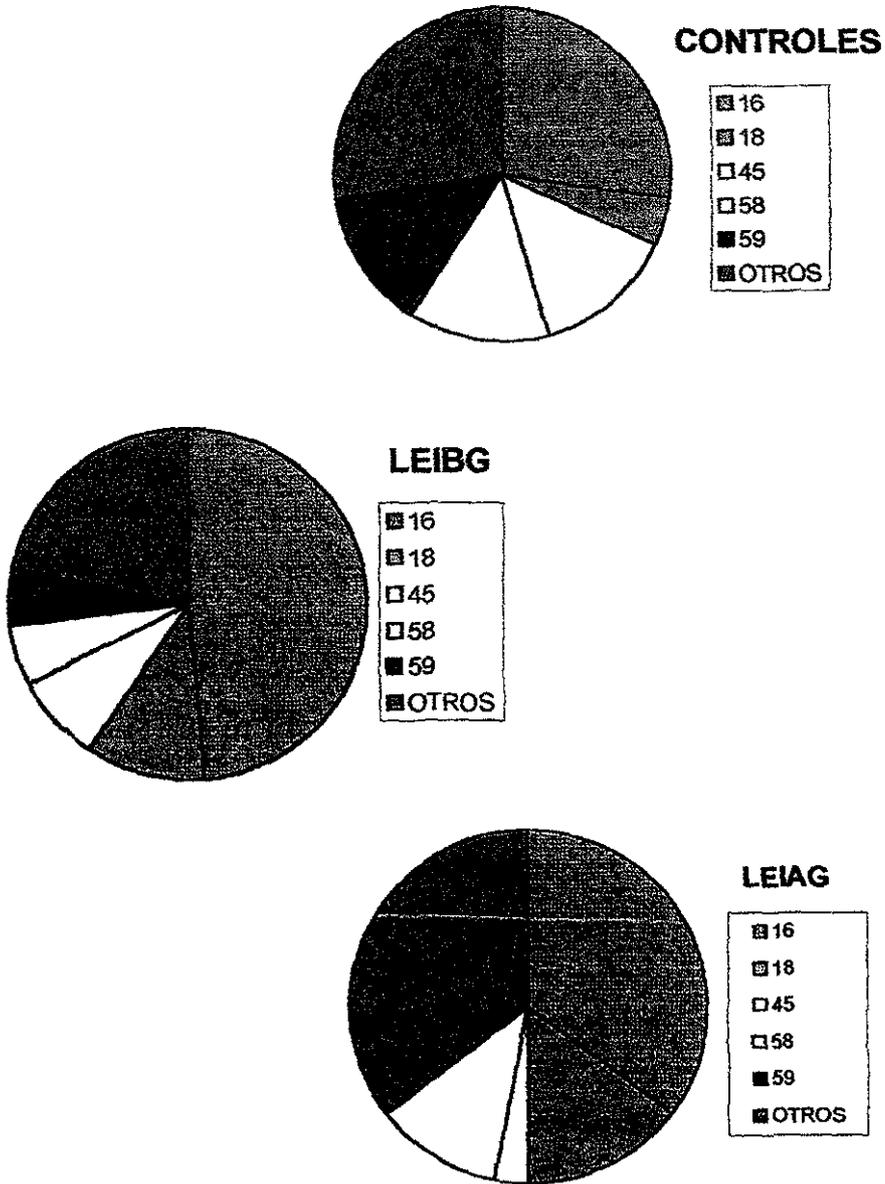


Figura 16. Distribución de los tipos de HPV dentro de cada grupo de estudio. Los tipos 16 y 18 incluyen los casos encontrados de variantes. Dentro de la categoría OTROS se incluyeron los tipos menos frecuentes (31, 33, 35, 39, 52, 53, 56, 66, 67 y 70).

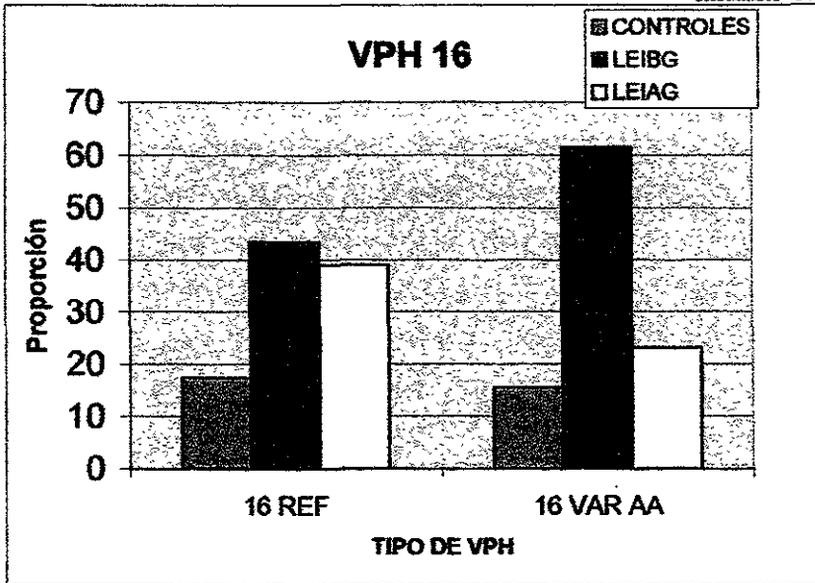


Figura 17. Proporción de casos del tipo 16 y 16 AA en los tres grupos de estudio. Se incluyen los casos encontrados como co-infección.

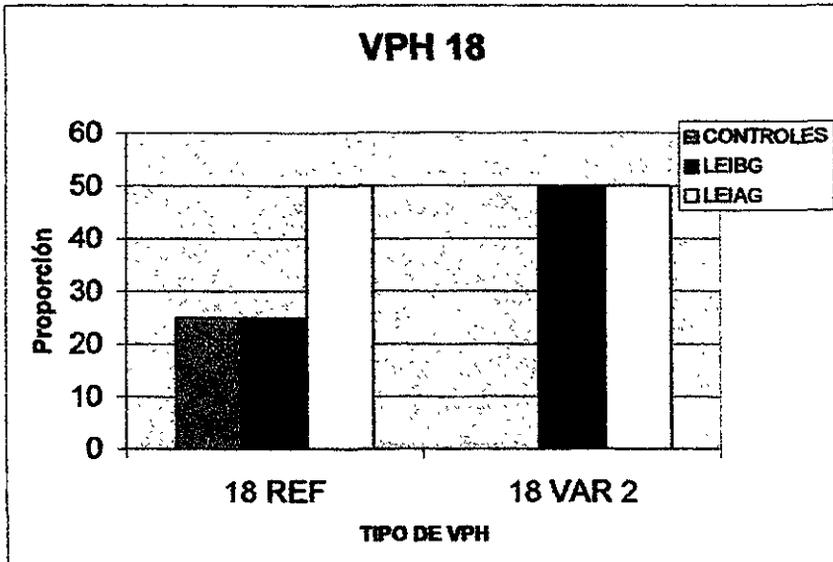


Figura 18. Proporción de casos encontrados del tipo 18 y 18 A1 dentro de los tres grupos de estudio.

EDAD	TIPO DE HPV							TOTAL	
	16	16 AA	18	18 Af	45	58	59		OTROS
<=30	3	3		1				4	11
31-40	5	2		1	2	2		7	19
41-50	4	5		3	2	4	1	4	24
>=51	4	1	2				1	3	11
TOTAL	17	11	2	5	4	6	2	18	65

Tabla IX. Distribución por grupos de edad de los tipos de HPV en lesiones. Sólo se incluyen los casos para los que se conocía la edad (Intervalo 20-75 años, media 41.9 +/- 12.3 años).

En cuanto a la distribución por grupos de edad no se observa ninguna tendencia clara, como se puede apreciar en la tabla VIII. Al parecer los casos de lesión se tienden a distribuirse en los grupos de 31 a 50 años. Sin embargo en el caso del tipo 18 sólo se encontraron casos en el grupo de mayor edad, mientras que para la 18 Af de este mismo tipo los casos sólo se encontraron en los grupos restantes.

Por último, cabe mencionar que las dobles infecciones se observaban en el SSCP como un patrón de bandas mezclado. Por tal razón es difícil determinar si se trata de un tipo diferente de HPV o una infección de dos tipos, por lo que se procedió a secuenciar las muestras. Mediante secuencia sólo detectamos uno de los tipos que se amplificó preferentemente. Sin embargo, pudimos confirmar la presencia del otro tipo amplificando una región de E7 específica para el tipo 16.

Las pruebas estadísticas se realizaron en los paquetes EpiInfo Versión 6.0 de la OMS y SPSS (Statistical Package of Social Sciences) Versión 8.0.

6. Discusión

El SSCP es una técnica relativamente económica y accesible, en cuanto a que no se necesita de un equipo especial para realizarla. Sin embargo, al encontrar tantos tipos diferentes a los patrones control fue necesario secuenciar muchas muestras. Por tanto sugerimos combinar técnicas para un mejor y más rápido análisis. Por ejemplo, se pueden detectar específicamente el tipo 16 y el tipo 18 (con primers específicos para cada uno) en todo el conjunto de muestras, y luego correr las positivas para dichos tipos mediante SSCP para determinar a qué variante pertenecen. Las muestras restantes se corren aparte con un conjunto adecuado de controles (muestras de tipos conocidos). De esta manera es más fácil analizar el patrón de bandas obtenido

Por otro lado, sabemos que el estudio de los tipos y variantes del HPV es importante ya que al parecer tienen propiedades biológicas distintas lo que repercute en un mejor o peor pronóstico para las pacientes. Previamente se habían realizado estudios en tumores en donde pudo asociarse la presencia de cierto HPV con el tipo histológico de CaCU. Sin embargo en lesiones precancerosas los estudios a nivel internacional son mínimos, y en México no hay ninguno. Por tanto, creemos de interés contar con una referencia en nuestro país.

Sin embargo, el presente estudio fue realizado en una muestra muy pequeña, cuyo tamaño fue elegido por conveniencia. Para poder resultados significativos sería

necesario calcular un tamaño de muestra en base a la prevalencia de casos por tipo de virus.

Además, es necesario tomar en cuenta el siguiente aspecto. Las mujeres del grupo control sólo manifiestan infección por el virus, lo cual no indica que vayan a desarrollar una lesión. Se sabe que la gran mayoría de las infecciones no persiste sino que puede ser controlada y eliminada por el sistema inmune. Con lo que respecta a las lesiones sólo un pequeño porcentaje progresa hacia el cáncer, la mayoría de ellas revierte.

Estando conscientes de lo anterior a continuación se discuten los aspectos más relevantes encontrados en el estudio.

Pudimos observar en este estudio diferencias para los tipos más oncogénicos entre los porcentajes obtenidos en tumores y los reportados. Para CaCU se tenía reportado que la proporción de HPV-16 era de un 49.9 % (Bosch et al., 1995) mientras que nosotros encontramos un 32.2 % en las lesiones. Para el HPV-18 en tumores se reportaba un 13.7 % y nuestro dato es de 9.6%. Pudieramos pensar que la diferencia radica en que el estudio de Bosch et al. fue realizado en tumores y el presente en lesiones pre-cancerosas. Sin embargo Zehbe y col., reportan para el HPV-16 un 44 % en lesiones de bajo grado y un 53% en lesiones de alto grado (Zehbe et al., 1996).

En los controles hubo un 6.5% del tipo 16 y un 1% para el 18, valores semejantes a los obtenidos en Paraguay donde se reportan 5.5 % y 0% respectivamente (Rolón et al., 2000).

Como ya se había mencionado el HPV-18 es más frecuente en los tumores adenoescamosos y los adenocarcinomas y el HPV-16 predomina en los carcinomas escamosos (Bosch et al., 1995). La variante encontrada en la población mexicana y que pertenece a la rama AA (Asiático–Americana) aislada principalmente en poblaciones con un componente amerindio importante ha demostrado un comportamiento más agresivo que el prototipo. Se han obtenido las siguientes evidencias al respecto: 1) presencia de la variante AA en mujeres con CaCU menores de 40 años mientras que la clona de referencia se halla en las pacientes mayores de 40 años (Lizano et al., 1994), 2) Mayor riesgo de desarrollar lesiones de alto grado para mujeres infectadas por una variante del HPV-16 no parecida al prototipo, entre las que se encuentra la encontrada en la población mexicana (Xi et al., 1997) .

Dado lo anterior, en nuestro estudio esperábamos encontrar una mayor proporción de la var AA en los grupos de menor edad, así como una mayor frecuencia en las lesiones de alto grado (LEIAG). Sin embargo esto no resultó cierto y no hay diferencia estadísticamente significativa entre la clona de referencia y la variante. De igual manera, no se observa una tendencia por parte de la var AA a presentarse en mujeres más jóvenes (Tabla IX).

Mediante el uso de los primers GP5+/GP6+ con la técnica de SSCP no nos es posible detectar las diferencias entre las variantes del tipo 16 AA-a, AA-b y AA-c (ver figura 7)

De igual manera ya se había demostrado que la variante Af del HPV-18 se encontraba exclusivamente en carcinomas adenoescamosos, mientras que la clona de referencia (As+Al) se asociaba a todos los tipos de carcinoma excepto el mencionado. Esta última clona se encontró en en tumores de células pequeñas el cual presenta uno de los peores pronósticos. Con lo que respecta a la variante 18 E en el único tipo histológico de CaCU donde no se encontró fue en el de células pequeñas. (Lizano et al., 1994). Lo anterior sugiere diferencias en el comportamiento biológico de las variantes del tipo 18.

En nuestro estudio sólo fue posible detectar 18 Af de la clona de referencia del HPV-18, ya que por SSCP con el fragmento utilizado no es posible detectar la variante Europea. Para poder tener este dato sería necesario secuenciar parte del LCR del virus en cuestión.

Para el HPV-18, como se mencionó anteriormente, la 18 Af pudiera tratarse de un grupo menos agresivo, por lo que pensábamos encontrarla preferentemente en las lesiones de bajo grado y a la clona de referencia en las de alto grado, sin embargo esta diferencia no es tan clara. No es posible dar ninguna conclusión pues se trata de muy pocas muestras que dieron resultado positivo para el HPV 18

El porcentaje de co-infecciones resultó del 3.3 % y se presentaron sólo en los controles. Este dato se asemeja bastante al reportado por Hildesheim que es de 3.3 % también para los controles (Rolón et al., 2000)

Con lo que respecta al HPV-11, dos de los cinco casos encontrados fueron hallados en co-infecciones y los casos restantes en las lesiones. Este tipo es de los llamados de bajo riesgo para cáncer cervicouterino y se halla asociado a verrugas genitales y lesiones benignas. De cualquier manera no debería haber sido detectado por el Kit de Captura Híbrida por lo que pensamos que había otro HPV de alto riesgo pero en muy pequeña cantidad por lo que no pudo ser amplificado.

Los cambios de aminoácidos observados en las variantes (379 para AA del 16 y 399 para 18 Af del 18) forman parte de epitopes lineales previamente identificados (Pushko et al., 1994). Estos cambios podrían a su vez producir cambios en los epitopes conformacionales. De tal manera, pudiera ser que estos cambios de aminoácidos pudieran repercutir en la antigenicidad de los epitopes sobre todo en el caso de la proteína L1 que es el constituyente principal de la cápside y el blanco de anticuerpos neutralizantes (Yamada et al., 1995).

Un importante esfuerzo en el desarrollo de vacunas profilácticas es la inmunización con VLPs (Virus-Like Particles) ensambladas con la proteína L1 del HPV. Con ellas se pretende neutralizar al virus e impedir que se establezca la infección. Touze y colaboradores reportaron que cambios en los aminoácidos 83 al 97 de la proteína L1 afectan su nivel de expresión, pero no su capacidad de ensamblarse en VLPs. Estos

cambios fueron encontrados en distintos aislados provenientes de distintos países. También se probó la seroreactividad observándose que las clonas investigadas cruzaban serológicamente. Como conclusión sugieren que VLPs provenientes de una sola clona de HPV-16 sería suficiente para el desarrollo de una vacuna (Touze et al., 1998)

El último trabajo indica que el utilizar una sola variante para la inmunización es suficiente para proteger contra todas las variantes del tipo 16 ya que estas pertenecen a un único serotipo (Pastrana et al., 2001).

2

De cualquier manera el estudio de las variantes es muy importante en cuanto al pronóstico de las lesiones y la persistencia de la enfermedad, ya que se ha establecido que la persistencia se da cuando se presenta la misma variante en visitas consecutivas al Ginecólogo y no sólo el mismo tipo. De igual manera, la distribución de las variantes del HPV es una importante herramienta en los estudios de evolución molecular de los virus.

Por último, es necesario destacar que si bien la infección por HPV es necesaria para el desarrollo de lesiones y su posterior progresión a cáncer, no es un factor suficiente, sino que se ve apoyado por distintos factores desde los inherentes al huésped ; como son los factores genéticos, hábito de fumar, uso de anticonceptivos, número de parejas sexuales, etc.: como los que dependen del virus (tipo de HPV, variantes).

7. Conclusiones

- La técnica de SSCP es muy útil para identificar los diferentes tipos de HPV así como muchas de las variantes en una cantidad grande de muestras.
- El tipo 16 fue el más frecuente con un 32.2% en las lesiones, que contrasta con un 49.9% reportado para CaCU. Le sigue el tipo 18 con 9.6 % en lesiones, comparado con un 13.7% en tumores.
- Los tipos 16 y 18 tuvieron una tendencia a presentarse más en las lesiones que en los controles, lo cual era esperado pues son los tipos más oncogénicos.
- Los tipos menos frecuentes tuvieron un comportamiento similar dentro de los tres grupos, distribuyéndose de manera bastante uniforme.
- No se encontró diferencia entre la clona de referencia del HPV-16 y la variante AA dentro de las lesiones de alto y bajo grado. Tampoco fue evidente la diferencia para el tipo 18 de referencia y la 18 Af

8. Referencias

Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT: In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among HPVs of different oncogenic potential. *J Virol* **65**: 292-298, 1991.

Barron BA, Richart RM: A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst* **41**: 1343-1353, 1968.

Berumen J, Unger E, Casas L, Figueroa P: Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum Pathol* **26**: 676-681, 1995

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

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

Brady C, Duggan-Keen M, Davidson J, Varley J, Stern P: Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol* **80**: 3233-3240, 1999.

Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J: 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(4)**:449-55, 1999.

Chellapan S, Kraus VB, Kroger B, Münger K, Howly PM, Phelps WC, Nevins JR: Adenovirus HA simian virus 40 tumor antigen and human papillomavirus E7 protein share the capacity of disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4549-4553, 1992.

Coppelson LW, Brown B: Observations on a model of the biology of carcinoma of the cervix *Am J Obstet Gynaecol* **122**: 127-136, 1995

Crook T, Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L: Human papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in the hormone-dependet transformation of primary mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8820-8824, 1998.

De Roda Husman AM, Walboomers J, van den Brule A, Meijer C, Snijders P. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76** 1057-1062, 1995.

De Villiers EM : Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top. Microbio. Inmunol* **186**:1-12, 1994.

Erkson A, Herron J, Yamada T, Wheeler C: Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol* **80**: 595-600, 1999.

Ho L., Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Mitrani-Rosenbaum S, Norrild B, Pillai MR, Stoerker J, Syrjaenen K, Syrjaenen S, Tay SK, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU: The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 67(11):6413-6423, 1993.

Kämer C, Warthorst U, Torrez-Martínez N, Wheeler CM, Pfister H: 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, 2000.

Koutsky LA, Galloway DA, Hommes KK: Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 10 122-163, 1988.

Layde PM: Smoking and cervical cancer. Cause or coincidence. *JAMA* 261 1631-1632, 1989.

Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, García-Carrancá A: Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 89(16): 1227-1231, 1997.

Lizano M, García-Carrancá A: Las variantes moleculares de papiloma virus humanos tipo 16, 18 y 45 en tumores de cuello uterino, en México. *Gac Méd Méx* 133: 43-48.

May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H: The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV-16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by

mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* **13**: 1460-1466, 1994.

Myers G, Baker C, Wheeler C, Hlpern A, McBride A, Doorbar J: A Compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences. Los Alamos (NM): Theoretical Biology and Biophysics Group, 1996.

Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M: Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* **82**:203-207, 1999.

Ong CK, Chan SY, Campo S, Fijinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, Meulen J, Villa LL, Bernard HU: Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* **67**(11): 6424-6431, 1993.

Pastrana DV, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT: NHPV 16 VLP Vaccine induces human antibodies that neutralize divergent variants of HPV 16. *Virology* **279**: 361- 369, 2001.

Pfister H: Human papillomaviruses and genital cancer. *Adv Cancer Res* **48**: 113-147, 1987.

Pushko P, Sasagawa T, Cuzick J, Crawford L: Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **75**: 911-916, 1994.

Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Husain M, Willett J, Daoud Y, Temple G, Stanhope CR, Sherman AI, Phibbs GD, Lorinez AT: Sexually transmitted papillomaviral infection. I. The anatomic distribution and pathological grade of neoplastic lesions associated with different

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

viral types. *Am J Obstet Gynaecol* **156**: 212-227, 1987.

Sang BC, Barbosa MS. *Virology* **189**: 448-455, 1992.

Rolón PA, Smith JS, Muñoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, Llamas F, Meijer CJLM, Walboomers JMM: Human Papillomavirus infection and invasive Cervical Cancer in Paraguay. *Int J Cancer* **85**: 486-491, 2000.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a. ed., Cold Spring Harbor Press, 1989, USA.

Snijders P, van den Brule A, Schrijnemakers H, Snow G, Meijer C, Walboomers J: The use of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* **71**: 173-181, 1990.

Stewart AC, Erikson AM, Manos MM, Muñoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM: Intratype variation in 12 human papillomavirus types: A worldwide perspective. *J Virol* **70**(5): 3127-3136, 1996.

Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J: Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* **70**: 6987-6993, 1996.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovent F, Breuer J, Leigh IM, Matlaschewski G y Banks L: Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature* **235**: 229-234, 1998.

Terry G, Ho L, Cuzick J : 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, 1997

Touze A, Mehdaoui SE, Sizaret PY, Mougín C, Muñoz N, Coursaget P. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of Virus-Like Particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol* **36**(7): 2046-2051, 1998.

Villa LL: Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. *Adv Cancer Res*, 321-341, 1997.

Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB: Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**(11): 796-802, 1997.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer A, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**: 12-19, 1999.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Muñoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: A worldwide perspective. *J Virol* **71**(3): 2463-2472, 1997.

Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in united states populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2 and L1 coding segments. *J Virol* **69**(12):7743-7753, 1995

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M: Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* **58**(4): 829-833, 1998.

Zehbe I, Wilander E: Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: A study of sensitivity. *Hum Pathol* **27**:812-815, 1996.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M: p53 Codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res* **61**: 608-611, 2001.