

Las variantes moleculares de papiloma virus humanos tipo 16,18 y 45 en tumores del cuello uterino, en México

Marcela Lizano,* Alejandro García-Carrancá*

Resumen

El cáncer cérvico uterino (CaCU) representa aún la primera causa de mortalidad por neoplasias entre las mujeres mexicanas. La participación de los virus del papiloma humano (HPV) es determinante en el desarrollo del CaCU y en la actualidad sabemos que en más del 90% de todos los tumores se encuentran secuencias virales activas, principalmente de los tipos 16, 18, 31, 33 y 45. Estudios recientes en distintas partes del mundo han mostrado la existencia de variantes moleculares de los tipos 16 y 18 (HPV-16 y HPV-18). La existencia de estas variantes moleculares ha permitido establecer patrones de dispersión de estos virus durante su evolución, que se consideran antigua como la del hombre mismo. De esta manera, se han identificado cinco diferentes ramas filogenéticas para el HPV-16 y se ha podido establecer que la diversidad viral se asocia con la etnicidad de las poblaciones. En este trabajo se buscaron secuencias virales en muestras de tumores de la población mexicana y se observó la presencia de variantes de los tipos 16, 18 y 45. Con relación al HPV-16 se encontró una variante en más de la mitad de los tumores con este tipo viral que parecería tener un comportamiento más agresivo que el prototipo. En el caso del HPV-18 se encontraron en cerca de la cuarta parte de las muestras positivas para este tipo viral, dos variantes moleculares que en apariencia presentan un comportamiento biológico diferente. Por último, todas las muestras positivas para el HPV-45 mostraron la presencia de una variante aún no reportada. Algunas de estas variantes se encontraron asociadas con determinadas variedades histológicas de los tumores; lo cual sugiere que algunas de estas variantes presentan un comportamiento específico que influye en el desarrollo, o la agresividad de determinados tipos histológicos del CaCU.

Palabras clave: Virus de papiloma humano, HPV, variantes, cáncer cérvico uterino, carcinoma

Summary

Carcinomas of the uterine cervix still constitutes the first cause of death from cancer among Mexican women. Certain types of human papillomaviruses (HPV) have been implicated in cervical cancer development; active viral sequences are usually found in more than 90% of cervical tumors, their genome contains two oncogenes that immortalize human cells in culture. Recent worldwide studies have shown the existence of molecular variants of known HPV types, mainly 16 and 18, thus permitting the establishment of viral spread during evolution, which seems as ancient as humankind. Phylogenetic studies have identified five major branches for HPV-16 and indicated that viral diversity seems associated with ethnical characteristics of the populations. In this work we searched for the presence of viral sequences among cervical tumors from the Mexican population. The existence of variants of HPV types 16, 18, and 45 was observed. One variant was found in more than half of HPV-16 positive tumors, and seems to exhibit a more aggressive behavior. In HPV-18 positive tumors, in addition to the prototype, two variants were detected in near a fourth of the samples. Finally, all HPV-45 positive tumors showed a new variant not yet reported in the literature. Some of these variants were found associated with specific histological types of cervical cancer, suggesting the participation of these variants in its genesis or aggressivity.

Key words: HPV, variants, uterine cervix, carcinomas

* Laboratorio de Oncología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y División de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, SS.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Alejandro García Carrancá, Laboratorio de Oncología Molecular Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM Apartado Postal 70-228 04510, México, D.F.

Introducción

En México, la principal causa de muerte por cáncer en mujeres la constituye aún el cáncer del cuello uterino (CaCU), que representa el 30% de todas las neoplasias malignas entre las mujeres de 35 a 49 años. A pesar de las campañas de prevención que hasta hoy en día se han implementado, este tipo de cáncer sigue ocupando el primer lugar en frecuencia con respecto a todos los tipos de neoplasias, por lo que representa un serio problema de Salud Pública para nuestro país. Se piensa que la incidencia de este tipo de cáncer debería ser mucho menor si las campañas para disminuirlo fuesen eficaces, pues si las mujeres se realizaran al menos un estudio citológico (Papanicolaou) al año, y si su análisis, interpretación y entrega fuese eficiente, un buen porcentaje de las lesiones premalignas podrían ser detectadas en sus etapas tempranas y así curadas antes de convertirse en cáncer. Para ello, además de las campañas masivas deberá de contarse con un número adecuado de clínicas de displasias, cuyo fácil acceso a la mayoría de la población permita que las mujeres con lesiones premalignas sea atendida a tiempo y de manera eficiente.

El cáncer cérvico uterino (CaCU) se presenta en la zona escamo columnar que resulta de la unión de dos epitelios: el vaginal y el endocervical y que se conoce como zona de transformación (T). Según la esteirpe celular de la cual se origina, el cáncer de cérvix puede ser de tipo epidermoide o escamoso, adenocarcinoma, mixto o adenoescamoso, así como de otras variedades histológicas menos frecuentes, como el de células pequeñas (Hopkins, 1991). El comportamiento biológico de estos tipos histológicos varía, siendo en general los adenocarcinomas y los carcinomas adenoescamosos más agresivos que los epidermoides (Izerek 1985). La zona de transformación está sujeta a estímulos y cambios hormonales constantes durante los ciclos menstruales, los embarazos y partos, así como a cambios en la acidez vaginal y a infecciones por diversos agentes entre los que destacan de manera preponderante los virus del papiloma humano (HPV). Si bien son muchas las causas que se asocian al desarrollo del cáncer cérvico uterino, cada vez son más fuertes las evidencias que indican que los HPV constituyen el factor etiológico

más importante en su desarrollo (Lorincz, 1987; Howley, 1991). Se reconoce una clara asociación de estos virus no sólo con tumores invasores del cérvix, sino también con lesiones tempranas.

Algunos aspectos en el estudio de estos virus se vieron limitados durante mucho tiempo, pues para su propagación se requiere de un epitelio en proceso de diferenciación, lo cual se ha logrado sólo hasta hace poco. Dado que las proteínas de la cápside de los HPV son antigénicamente similares, estos virus no se han clasificado mediante pruebas serológicas (serotipos) como ocurre con otros virus, sino mediante criterios de similitud de sus genomas (genotipos). Es decir, cuando el genoma de un nuevo HPV difiere en más del 10% con respecto a los demás, se establece que se trata de un tipo diferente; cuando la diferencia es del 2 al 10%, que se trata de un subtipo; y cuando la diferencia es menor al 2%, que se trata de una variante. Son más de 70 los tipos distintos de papilomavirus humanos que hasta ahora han sido reportados, y si bien presentan estructuras similares, muestran una fuerte especificidad por los epitelios que infectan y el tipo de lesiones que producen. Basados en su asociación con tumores invasores (de vulva, vagina o cérvix uterino), lesiones precursoras de alto grado, o proliferaciones epiteliales benignas, los HPV se han clasificado en dos categorías de riesgo oncogénico; bajo y alto grado (Schiffman, 1993; Stoler, 1992). Los tipos de HPV de alto grado, que incluyen los tipos 16 y 18, producen dos oncoproteínas denominadas E6 y E7, que interactúan fuertemente con proteínas celulares que regulan el ciclo celular y la transcripción de genes celulares y virales, como lo son: p53, Rb y AP-1 (Wernes et al, Dyson et al., 1989; Antinore et al, 1996). La interacción de las oncoproteínas virales con sus blancos celulares da por resultado una pérdida de la regulación normal en la progresión del ciclo celular y la expresión de un conjunto de genes; sucesos aparentemente críticos en el desarrollo del cáncer cervical. Si bien conocemos detalles moleculares de la interacción de productos celulares y virales, la historia natural de las infecciones por papilomavirus es menos clara, pues a pesar de la presencia de virus de alto riesgo oncogénico, algunas lesiones reversionen o permanecen inalterables durante toda la vida. Se ha propuesto entonces que el HPV es una condi-

ción necesaria pero no suficiente para el desarrollo de un cáncer invasor y que se requieren otros sucesos celulares que cooperen para su desarrollo.

Mediante el uso de métodos de detección de secuencias de DNA cada vez más sensibles, que incluyen la PCR, los reportes internacionales muestran que en más del 90% de todos los tumores del cuello uterino existen secuencias de algunos HPV y que no todos los tipos virales aparecen con la misma frecuencia en estas lesiones. A pesar de que la incidencia de los distintos tipos varía de acuerdo a la región geográfica, se ha observado que el HPV-16 es el más frecuente, seguido por el HPV-18 (Bosch et al., 1995).

El análisis de secuencias de DNA, principalmente del gen L1 y la región de control, de aislados virales de papilomavirus obtenidos de muchos países y grupos étnicos, ha permitido detectar variantes de los HPV-16 y 18 (Chan et al., 1992; Ong et al., 1993). Estas variantes se han agrupado de acuerdo a los cambios que presentan con respecto a los tipos virales de referencia. Mediante estos estudios se han establecido árboles filogenéticos que muestran la evolución molecular de los tipos virales mencionados (Chang et al., 1992a). Las variaciones que ocurren también han permitido establecer que los HPV son tan antiguos como el hombre mismo, y que estos virus se han distribuido y diseminado de acuerdo a los movimientos de las poblaciones humanas que los portan. De esta manera se han identificado cinco diferentes ramas filogenéticas para el HPV-16, denominadas: Europea, Asiática, Asiática-Americana, Africana-1 y Africana-2, según las zonas donde los aislados se han detectado preponderantemente. Sin embargo, los reportes muestran que la diversidad viral, más que asociarse con la ubicación geográfica, se asocia con la etnicidad de las poblaciones. Esto coincide, en parte, con lo que ahora se ha encontrado en el estudio de tumores invasores del cérvix, obtenidos de pacientes mexicanas.

Material y métodos

Origen de las muestras

En este trabajo se analizaron 80 muestras de tumores invasores del cuello uterino obtenidas de biopsias frescas de tumores o fijadas en parafina.

Las muestras de pacientes que no habían recibido previamente ningún tratamiento fueron obtenidas del Servicio de Ginecología o de los Archivos del Servicio de Patología, ambos del Instituto Nacional de Cancerología. Las muestras utilizadas correspondían a: 13 adenocarcinomas, 13 carcinomas adenoescamosos, 27 carcinomas escamosos y 27 carcinomas indiferenciados de células pequeñas.

Extracción de DNA y amplificación de fragmentos virales de DNA mediante ensayos de PCR

La extracción del DNA de las muestras frescas se realizó de acuerdo a lo descrito por Miller y col. (1988). El DNA de las muestras de cortes embudados en parafina se realizó de acuerdo a lo descrito por Resnick y col. (1990), utilizando n-octano.

La detección de secuencias virales se realizó mediante la amplificación por PCR de fragmentos de la región L1, utilizando los juegos de oligonucleótidos universales GP5/GP6 (van der Brule, 1990). Los fragmentos de PCR utilizados para la secuenciación directa fueron obtenidos utilizando el juego de oligonucleótidos universales MY09/MY11 (Manos y col., 1989).

Secuenciación directa de los productos de PCR

Los fragmentos de DNA de productos virales obtenidos por PCR fueron sometidos a la reacción cíclica de secuenciación utilizando el sistema AmpliTaq DNA Cycle Sequencing (Perkin Elmer) de acuerdo a lo descrito por el fabricante. Los fragmentos de DNA de la región control se obtuvieron utilizando los oligonucleótidos reportados por Ho y col. (1991), en el caso del HPV-16, y los reportados por Ong y cols. (1993), en el caso de los HPV-18 y 45 (esto último debido a la gran similitud entre ambos en esta región).

Análisis y comparación de variaciones en las secuencias del DNA viral

Para el análisis de variaciones en la secuencia del HPV-16 se utilizó la información contenida en el compendio Human Papillomavirus 1994 Database (Myers y cols., 1994). En el caso de los HPV-18 y 45, se utilizó la información reportada por Ong y cols. (1993).

Resultados

En este trabajo se analizaron muestras de tumores del cuello uterino de pacientes mexicanas, pertenecientes a cuatro grupos histológicos (epidermoide, adenocarcinoma, adenoesquamoso y de células pequeñas), para detectar la presencia de secuencias de HPV. En promedio, el 75% de las muestras fue positiva para algún tipo de HPV, con valores que variaron del 63 al 85%, de acuerdo al tipo histológico (tumores escamosos y de células pequeñas, respectivamente). Los fragmentos de DNA, obtenidos del gen L1 y la región de control, mostraron variaciones en la secuencia nucleotídica que reflejan la presencia, en la población mexicana, de variantes moleculares de los HPV tipo 16, 18 y 45. El análisis de la secuencia nucleotídica de estos fragmentos nos permitió identificar los cambios que presentan estas variantes, los cuales se muestran en los Cuadros I y II. Si bien en la región L1 se observaron varios cambios en las variantes, solo algunos de ellos provocan el cambio del aminoácido correspondiente (ver Cuadro I). Algunos de estos cambios podrían repercutir en la inmunogenicidad de las partículas virales, dado que la proteína L1 constituye el principal componente de la cápside. En la región de control también se observó un número considerable de cambios en la secuencia nucleotídica en cada una de las variantes (Cuadro II). Dado que es en esta región donde se localizan los elementos que controlan la transcripción de los oncogenes E6 y E7, los cambios también podrían repercutir en la regulación de la expresión de los oncogenes virales. De hecho, observamos en la variante del HPV-16 que dos de las posiciones involucradas (nucleótidos 7484 y 7520) se sobrelapan con el sitio de unión del represor transcripcional YY1 (Bauknecht y cols, 1992). De hecho, se ha mostrado que mutaciones en estos sitios permiten que el control en la expresión de los oncogenes escape a la represión por el factor celular YY1, en tumores humanos con HPV-16 (May y cols., 1994).

Resulta además interesante el hecho que la variante del HPV-16, que se encontró en cerca de la cuarta parte de todos los tumores, corresponda con una variante previamente ubicada en la rama Asiática-Americana, y que en Brasil sólo se encuentra en individuos de origen amerindio. Esto

Cuadro I. Cambios de nucleótidos y aminoácidos encontrados en un fragmento del gen L1 de las variantes de los HPV 16, 18 y 45			
HPV-16 var aa			
nt			
6694	A < C	353	thr < pro
6720	G < A		
6802	A < T	389	thr < ser
6853	C < T		
6864	C < T		
6969	C < T		
HPV-18 var 1 aa			
nt			
6625	C < G	399	pro < arg
6626	C < T		
6719	G < A		
6749	G < A		
6842	C < G		
6917	C < A		
HPV-18 var 2 aa			
nt			
6625	C < G	399	pro < arg
6842	C < G		
	C < G. 399 C < G		
HPV-45 var aa			
nt			
6676	A < G	383	ser < gly
6687	C < T		
6705	G < C	392	gln < his
Prototipo < Variante			

sugiere que la variante del HPV-16 identificada pudiera ser más prevalente en individuos mexicanos de este origen. Por otro lado, en este estudio se encontraron dos variantes del HPV-18, una perteneciente a la rama Europea y la otra a la rama Africana. Quizás estas variantes llegaron a México durante la colonización, así como durante el intercambio de esclavos africanos que ocurrió principalmente en las costas del Golfo de México, a diferencia de la variante del HPV-16 que podría estar asociada con las poblaciones que llegaron por el estrecho de Bering.

Cuadro II. Diferencias encontradas en un fragmento de la región de control de variantes de los HPV tipo 16, 18 y 45

HPV-1 Cvar nt	HPV-18var1 nt	HPV-18var2 nt	HPV-45var nt
7484 A < C	7512 G < T	7529 C < A	7527 C < T
7488 G < A	7530 T < C	7567 A < C	7563 C < A
7520 G < A	7563 G < A	7592 T < C	7629 T < C
7668 C < T	7567 A < C	7670 A < T	7734 G < A
7688 C < A	7592 T < C		
7728 A < C	7643 T < G		
7742 T < G	7651 T < C		
7763 C < T	7658 A < C		
7785 C < T	7670 A < T		
	7704 T < C		
	7726 C < T		
	7730 C < A		

Prototipo < Variante

Ahora bien, es de notar el hecho de que algunas de estas variantes se encontraron asociadas específicamente con ciertos tipos histológicos de los tumores (Lizano et al., 1996). Lo anterior podría indicar que estas variante tengan comportamientos biológicos diferentes, que propicien el desarrollo de tumores de cierto origen histológico. En particular, el hecho de que una de las variantes del HPV-18 (var1) sólo se presentó en los tumores de origen epidermoide, en claro contraste con el HPV-18 prototipo, que no se encontró en ningún tumor de este origen, refuerza la idea anterior. Asimismo, el hecho que la variante del HPV-45 se presentó sólo en los tumores de tipo adenoescamoso, apoya el concepto de que estas variantes exhiben comportamientos biológicos diferentes. Esto podría estar reflejando el papel particular que algunas de estas variantes pudieran tener en el desarrollo de tumores de origen histológico específico.

Conclusiones

Si bien son varios los factores que intervienen en el desarrollo del cáncer cervical, el componente más importante y ubicuo lo representan las infecciones por HPV. En México, como en América Latina, la incidencia del cáncer cérvico-uterino re-

sulta aún alarmante. Si bien existen diferencias importantes en las condiciones de Salud Pública de nuestro país con respecto a los países desarrollados, este estudio podría indicar la existencia de factores intrínsecos en diferentes aislados virales que predispongan a individuos de ciertas poblaciones a un mayor riesgo para desarrollar este tipo de cáncer. Es por ello que resulta necesario el estudio epidemiológico de las variantes moleculares de HPV que participan en el desarrollo de los tumores de la población mexicana. El conocimiento de la asociación de variantes virales con tipos histológicos definidos de los tumores aporta datos sumamente valiosos en el estudio de la enfermedad y en la búsqueda de un tratamiento más eficiente de ella. Algunas de las variantes virales podría estar involucrada en la génesis o agresividad de distintos tipos histológicos del CaCU. Para abordar este punto, resultará crucial efectuar estudios *in vitro* relacionados con la eficiencia de replicación o transcripción viral de los promotores de las variantes de HPV, así como de sus genes involucrados en estos procesos.

La región larga de control transcripcional viral (LCR) es la zona menos conservada entre los distintos tipos virales. Es por ello que se puede determinar de manera eficiente la existencia de variantes virales mediante el análisis de cambios nucleotídicos que ocurren en esta región entre aislados de un mismo tipo viral. Sin embargo, nosotros hemos observado que las variantes virales también presentan cambios importantes en zonas más conservadas, como es la región que codifica para la proteína L1 de la cápside viral, o el gen E2 (Berumen y cols, en preparación). Este hecho resulta determinante para el diseño de posibles vacunas contra el HPV, dado que ahora es claro que no sólo se debe considerar la existencia de tipos virales con diferente grado de riesgo oncogénico, sino de variantes de un mismo tipo con posibles diferencias en comportamiento biológico.

Creemos que sería de enorme importancia el estudio de la prevalencia de estas variantes en la población mexicana para tratar así de establecer una posible relación entre su presencia y el riesgo a desarrollar CaCU. Si en verdad las variantes virales presentan comportamientos biológicos diferentes, el estudio de su prevalencia podría constituir la base para la identificación de grupos de

individuos, o comunidades enteras, con alto riesgo para el desarrollo de los tumores que tanto afectan aún a las mujeres mexicanas.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 1705M9209), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN212895) de la UNAM y la Fundación Miguel Alemán AC, por el apoyo económico brindado para realizar sus investigaciones.

Referencias

Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP-1 family of transcription factors. *EMBO J* 1996;15:1950-1960.

Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J* 1992;11:4607-4617.

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

Bosch FX, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah K. EBSCC Study Group: Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:796-802.

Chan SY, Ong CH, Chow V, Drescher B, Durst M, Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN, Bernard H-U. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992a; 66:2057-2066.

Chan SY, Bernard H-U, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* 1992b; 66:5714-5725.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-937.

Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard H-U. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of an epidemiological study and construct of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 1991;29:1765-1772.

Hopkins MP, Morley G. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1991;77:912-917.

Howley PM. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res (Suppl)* 1991;51:5019-5022.

Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, García Carrancá A. Association between variants of human papillomavirus types 16, 18 and 45 and histological types of cervical carcinomas. submitted 1996.

Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Bennett Jensen A, Lancaster WT. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 1987;79:671-676.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Brocker TR, Woiwinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-214.

May M, Dong XP, Beyer-Finckler 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* 1994;14:60-1466.

Milier SA, Dykes DD, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988;16:1215-1217.

Myers G, Bernard H-U, Delius H, Favre M, Icenogel J, Ranst MV, Wheeler C. (Eds.): Human Papillomaviruses 1994 Database. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA.

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

Resnick RM, Cornelissen MTE, Wright DK, Eichnigen GH, Fox HS, Shegget J, Manos MM. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:142-149.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. 1993. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:958-964.

Stoler MH, Rhodes C, Whitbeck A, Wolinsky S, Chow L, Broker T. Human Papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Human Pathol* 1992;23:117-128.

van der Brule AC, Meijer CJL, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:2739-2743.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-79.