



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADEMICA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADEMICA FACULTAD DE MEDICINA

**“VARIANTES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 Y
33 EN MUJERES MEXICANAS CON CITOLOGIA NORMAL,
LESIONES PRECANCEROSAS Y CANCER CERVICOUTERINO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

NOELIO ZAMUDIO LOPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2006.

Variantes del virus del papiloma humano tipo 16 y 33 en mujeres mexicanas con citología normal, lesiones precancerosas y cáncer cervicouterino



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Trabajo financiado por el Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Guerrero, clave: GUE.2002.C01-6423

AGRADECIMIENTOS

Las palabras escritas son el mínimo para expresar de manera especial mi agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Berenice Illades Aguiar por la ayuda y tiempo brindado para el desarrollo de este trabajo, pero más aun por la sabiduría con la que me ha guiado y su paciencia para soportar mi bolubilidad y decidia.

Para usted, mi estimación, mi admiración y respeto...Gracias.

Agradezco también a mis asesores, Dr. Saul López Silva, Dra. Adakatia Armenta Sólis, Dr. Alejandro Millán Vega, M en C. Gloria Fernández Tilapa y a mi asesor externo Dr. Alejandro García Carrancá, por el tiempo dedicado, las aportaciones y sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo.

A mi amigo por excelencia:

Jesús de Nazareth...

Gracias

Creo en tí

...y a mi espalda orabas...

A mi esposa

...la unión es una cadena irrompible entre nosotros

A mis padres y hermanos.

CONTENIDO

	<i>Página</i>
Abreviaturas	i
Índice de tablas	ii
Índice de figuras	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	5
III. RESULTADOS	8
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	15
V. REFERENCIAS	22

ABREVIATURAS

AA	Variante Asiática-Americana del VPH 16
AC	Adenocarcinoma
Af-1	Variante Africana-1 del VPH 16
Af-2	Variante Africana-2 del VPH 16
As	Variante Asiática del VPH 16
CaCu	Cáncer cérvico uterino
CAE	Carcinoma adenoescamoso
CCE	Carcinoma celular escamoso
CN	Citología cervical normal
CDK1	Ciclinas dependientes de cinasas 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E6AP	Proteína asociada a E6
E-P	Variante Europea-prototipo del VPH 16
HLA	Antígeno leucocitario humano
FIGO	Federación internacional de ginecología y obstetricia
LEI	Lesión escamosa intraepitelial
LEIAG	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
LEIBG	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
MAPK	Proteína cinasa mitógeno-activada
NA-1	Variante Norte Americana-1 del VPH 16
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLPs	Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción
RLC	Región larga de control
VPH	Virus del papiloma humano

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Genotipos del VPH y grupos de estudio.	5
Tabla 2. Localización, secuencia y producto esperado de los oligonucleótidos iniciadores usados en la PCR y en la reacción de secuenciación para la región E6.	6
Tabla 3. Promedio y rango de edad estratificado por el grado de lesión y tipo de VPH.	8
Tabla 4. Variación nucleotídica de las clases y subclases de la región E6 del VPH 16.	10
Tabla 5. Frecuencia de las variantes del VPH 16 en cada uno de los diferentes tipos de lesión.	11
Tabla 6. Frecuencia de las variantes del VPH 16 en cáncer cervical invasor de diferente origen histológico.	12
Tabla 7. Variación nucleotídica de la región E6 y frecuencia de variantes de VPH 33.	14

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región E6 del VPH 16 y 33.	9
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de la región E2 del VPH 16.	13

RESUMEN

Objetivo: Determinar la frecuencia de las variantes en E6 del VPH 16 y 33 en mujeres mexicanas con citología cervical normal (CN), lesión escamosa intraepitelial de bajo y alto grado (LEIBG y LEIAG) y cáncer cervicouterino (CaCu). **Métodos:** Se analizaron 92 muestras de DNA cervical; 79 positivas al VPH 16; 46 de CaCu, 10 de LEIAG, 18 de LEIBG y 5 de CN; 13 muestras positivas al VPH 33; una de CaCu y 4 de LEIAG, LEIBG y CN. Mediante amplificación y secuenciación de E6 se determinaron las variantes de cada tipo viral. **Resultados:** La variante E-350G del VPH 16 fue la más frecuente, identificándose en 15 casos de CaCu, 4 de LEIAG y 3 de CN, mientras que la AA-a se encontró en 13 casos de CaCu, 1 de LEIAG, 6 de LEIBG y 2 de CN. Las variantes E-350G y AA-a se encontraron en 14 y 7 casos de carcinoma celular escamoso (CCE) respectivamente, pero la AA-a fue la más frecuente en adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso. En los casos positivos al VPH 33 se identificaron las variantes P36T/I73L/V83L/K93N/A138V, K35N/N86H y K35N, siendo la primera la más frecuente, detectándose en todos los casos de LEIBG y CN. El VPH 33 prototipo se presentó en un caso de LEIAG y de CaCu. **Conclusiones:** La variante E-350G del VPH 16 fue más frecuente en CCE, LEIAG y CN, y la variante AA-a en LEIBG, en adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso. Las variantes del VPH 33 fueron más frecuentes que la cepa prototipo.

ABSTRACT

Objective: Determination of the frequency of the E6 variants of HPV 16 and 33 in Mexican women with normal cervical cytology (NC), low and high grade squamous intraepithelial lesion (LSIL and HSIL) and cervical cancer. **Methods:** Ninety two cervical DNA samples were analyzed; 79 positive for HPV 16: 46 of cervical cancer, 10 of HSIL, 18 of LSIL and 5 of NC; 13 samples positive to HPV 33: 1 of cervical cancer, 4 of HSIL, LSIL and NC. Using amplification and sequencing of the E6, variants of each viral type were determined. **Results:** The E-350G HPV 16 variant was the most frequent, being identified in 15 cases of cervical cancer, 4 of HSIL and 3 of NC. The AA-a variant was found in 13 cases of cervical cancer, 1 of HSIL, 6 of LSIL and 2 of NC. The AA-a and E-350G variants were found in 14 cases and 7 cases of cellular squamous carcinoma (CSC) respectively, but the AA-a was the most frequent in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma. In the HPV 33 positive cases the P36T/I73L/V83L/K93N/A138V, K35N/N86H and K35N variants were identified, the first one being the most frequent, as it was detected in all the cases of LSIL and NC. The HPV 33 prototype was present in one case of HSIL and one of cervical cancer. **Conclusions:** The E-350G HPV 16 variant was the most frequent in CSC, HSIL and NC and the AA-a variant in LSIL, adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma. The HPV 33 variants were more frequent than the prototype strain.

INTRODUCCIÓN

Los virus del papiloma humano (VPH) poseen DNA de doble cadena de aproximadamente 8000 pb que infectan la piel y las mucosas epiteliales de animales y humanos.¹ Su información genética está localizada en una cadena de DNA y consta al menos de ocho marcos de lectura abiertos (ORFs). El genoma viral está dividido en tres partes: una región no codificante que es la región larga de control (RLC), la región de expresión temprana (E) que codifica proteínas capaces de interactuar con proteínas celulares regulando negativamente la división celular (E6, E7, E5) y proteínas involucradas en la regulación de la replicación y transcripción del genoma viral (E1, E2) o expresadas tardíamente en el ciclo viral (E4) y finalmente la región tardía (L) que codifica las proteínas de la cápside (L1, L2).²

Los papilomavirus son ubicuos y se han detectado en una amplia variedad de animales así como en humanos y aún cuando muestran una organización genómica similar, son altamente específicos de su respectivo hospedero. Son un grupo de más de 200 tipos virales y se subdividen en genotipos y subtipos en base a la secuencia de DNA.^{3,4} Así, se establece un nuevo genotipo viral cuando este difiere en más de un 10% con la secuencia del gen L1 de los genotipos conocidos,⁵ los genomas que varían con respecto a la secuencia de DNA de la cepa de referencia entre el 2 y 10% son considerados subtipos y una variante intratípica es cuando la divergencia es menor al 2%.^{2,6} Los VPH genitales están clasificados en grupos de bajo y alto riesgo en base a que si la lesión con la que ellos están asociados presenta un riesgo significativo hacia la progresión maligna.⁷ Así, Muñoz et al clasifica a los papilomavirus humanos sobre la base de los riesgos de asociación del tipo específico de VPH y su prevalencia en casos y controles, identificando 15 tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) y tres de probable alto riesgo el 26, 53 y 66. Doce tipos se categorizaron como de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108).⁸

La prevalencia del cáncer cervicouterino (CaCu) entre los diferentes países difiere en magnitud. En general, los países desarrollados tienen incidencias de cáncer cervical más bajas en comparación con los países en vías de desarrollo. Aún es poco entendido si esta disparidad es el resultado del acceso a mejores sistemas de salud pública en las naciones desarrolladas o si los diversos factores de riesgo producen estos diferentes resultados. Los factores de riesgo ambientales para el desarrollo de una lesión precancerosa y el cáncer de cérvix que sinergizan con la infección por el VPH, incluyen el hábito de fumar, uso de hormonas, posiblemente la

nutrición, y más notablemente la multiparidad y el número de parejas sexuales, condiciones que difieren marcadamente entre los países desarrollados y subdesarrollados.^{7,8} Otra posibilidad es que las diferentes poblaciones están expuestas a VPH con diferentes propiedades patogénicas, a infección persistente con tipos específicos de VPH genitales de alto riesgo como principal factor de riesgo etiológico para el desarrollo de esta enfermedad y sus lesiones precursoras, lo que se ha logrado corroborar con los datos combinados obtenidos por Bosh et al en 1995 y Walbomers et al en 1999 con más de 1000 muestras de cáncer cervical. El DNA del VPH se encontró en el 99.7% y más del 50% fue tipificado como VPH tipo 16.^{7,9,10,11}

El CaCu es considerado a nivel mundial el segundo cáncer más común en la mujer y el principal en muchos países en vías de desarrollo⁸ donde la incidencia de esta enfermedad es de más de 40 por cada 100,000 mujeres de 25 años y más.¹²

México tiene una de las incidencias más altas de cáncer cervical (50 casos por cada 100,000 mujeres de 25 años y más) y 16,000 nuevos casos son detectados cada año. La alta incidencia de esta enfermedad puede reflejar un pobre programa de detección oportuna de CaCu y estar asociada con la distribución de tipos y variantes específicas del papilomavirus en diferentes regiones geográficas.¹²

Las variantes del VPH 16 se dividen en 5 ramas mayores: la Europea (E), Asiática (As), Asiática-Americana (AA), Africana-1 (Af-1), Africana-2 (Af-2) y una rama menor que es la Norte Americana-1 (NA-1).^{12,13,14} El genoma de referencia del VPH 16 fue aislado de una paciente Alemana y pertenece a la rama Europea.^{7,15} y se puede referir a esta como variante Europea prototipo o de referencia (EP, E-P, E-P350T).^{11,15} El análisis de la variación nucleotídica en la región E6 ha permitido clasificar además a las ramas mayores en clases y subclases.¹⁵

La variación en la secuencia o mutaciones posteriores a la infección pueden modificar la función de las proteínas codificadas como las mutaciones en L1 que afectan el ensamblaje viral y algunas variantes en E6 que difieren en su capacidad para inmortalizar células y degradar a p53.¹²

La oncoproteína E6 es una proteína de 151 aminoácidos que tiene dos dominios en dedos de zinc. Esta proteína tiene afinidad por p53 y la conduce a su degradación por la vía de la ubiquitina, la cual es mediada por la proteína asociada a E6 (E6AP). La inactivación de p53

conduce a la desregulación de la ciclina B, esta última forma un complejo con cinasas dependientes de ciclinas 1 (CDK1) y forman un factor que regula la transición de G2 a la fase M promoviendo la mitosis. Este factor promotor de la mitosis es traslocado posteriormente del citoplasma al interior del núcleo en la fase S.¹³

Muchos estudios han sugerido que las variantes del VPH 16 muestran grados diferentes de asociación con neoplasia cervical. Esto podría explicar parcialmente porqué algunas infecciones por VPH 16 progresan a lesiones de alto grado o cáncer invasor.¹⁴

En mujeres inglesas con anormalidades citológicas cervicales menores se ha identificado una variante del VPH 16 asociada con persistencia viral y progresión a NIC II y III y presenta una sustitución de timina por guanina en el nucleótido 350 (T350G) de la región E6 que resulta en el cambio de aminoácido de leucina por valina en el residuo 83 (L83V). Esta variante, conocida también como E-350G se asoció más frecuentemente con carcinoma invasor que con NIC en una población sueca. Sin embargo, no se observó el mismo comportamiento en mujeres italianas y holandesas, donde se encontró en NIC pero no en CaCu. En mujeres alemanas con diagnóstico de NIC y carcinoma invasor se detectó una distribución igual de la variante L83V, sugiriendo que la variación en la secuencia de E6 no es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en esta población.¹⁵ Un estudio realizado en mujeres indias Quechuas de Jujuy Argentina reveló una marcada predominancia de variantes europeas, de las que, la variante E-350G (L83V) fue la más frecuente.¹⁴

En un estudio de casos y controles realizado en la Ciudad de México, las variantes con mayor frecuencia fueron de la clase E-350G y la clase AA, esta última fuertemente asociada con la presencia de adenocarcinoma, un cáncer biológicamente más agresivo y de peor pronóstico que el carcinoma celular escamoso.¹²

Más recientemente, González et al¹¹ reportó que en mujeres de Mérida, Yucatán con lesión de grado alto, una mayor frecuencia de la variante Europea prototipo, seguida por la clase E-350G, y en mujeres con CaCu la variante más común fue de la rama AA seguida por la variante prototipo, la clase E-350G y Af-2.^{11,16}

La diferencia en la distribución geográfica también se ha notado en otros tipos de papilomavirus humanos diferentes al VPH 16 que pueden ser agentes causales de lesiones precancerosas y CaCu, por ejemplo, el VPH 45 es muy frecuente en casos de cáncer de cérvix en África,⁶ los VPH 52, 58 y 33 en China y Japón.¹⁷ Recientemente, los genotipos virales 58 y

33 también fueron identificados en mujeres mexicanas de Yucatán y sorprendentemente el VPH 58 fue más frecuente en CaCu que el VPH 16.¹¹ Además de los VPH 16 y 18, también se han identificado variantes de los papilomavirus tipo 45, 52, 58, 33, 31, entre otros.^{6,17,18} Las variantes del VPH 58, 31, 35, 45 y 18 se han reportado en mujeres mexicanas y las variantes de los tipos 45 y 18 se han asociado con tumores de tipo adenoescamoso.^{6,7, 18,19}

Analizando las variaciones en E6 del VPH 33, Xin et al, reportó que el VPH 33 prototipo puede presentar un mayor riesgo de desarrollar NIC III y cáncer cervical que las variantes, las cuales se encontraron con más frecuencia en NIC I y II. Ellos encontraron 14 variaciones nucleotídicas, 5 fueron silenciosas y las 9 restantes repercutieron en el cambio de aminoácido y están identificadas como: K8N, K35N, N86H, K93N, Q113R, P36T, 136L, A138V y V83L.¹⁷

En el Estado de Guerrero, de acuerdo a datos del INEGI, en el año 2000 se registró una tasa de mortalidad por CaCu de 22.45 por cada 100,000 mujeres de 25 años y más. Illades et al, en mujeres mestizas de Acapulco, Chilpancingo e Iguala, Gro. reclutadas entre 1997 y 2000, reporta una prevalencia de lesiones escamosas intraepiteliales del 14%, así mismo se determinó por PCR la presencia de infección por virus del papiloma humano en 43%. En casos de lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG), los VPH 16 y 33 se encontraron en un 27.5% y 22.5% respectivamente, en lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), el VPH 33 fue el más común en 17.6% seguido por el VPH 16 con un 5.8%. En CaCu, el VPH se encontró en 97.7% de las muestras y de estas, el 50.6% fueron positivas al VPH 16 y el 1.2% al VPH 33.²⁰

Considerando que el estado de Guerrero presenta gran diversidad étnica con amplia distribución geográfica, los cuales pueden representar factores determinantes para la distribución de las diferentes variantes del VPH, es importante identificar las variantes circulantes de los VPH 16 y 33 que con mayor frecuencia se encuentran en casos de CaCu, LEIAG, LEIBG y mujeres con diagnóstico de citología cervical normal, secuenciando la región E6 con oligonucleótidos iniciadores específicos para cada tipo viral.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras y grupos de estudio. Se realizó un estudio de tipo observacional descriptivo en el período de noviembre de 2002 a agosto de 2004. Se analizaron muestras de DNA cervical con diagnóstico citológico normal, (CN), de LEIBG, LEIAG y CaCu colectadas desde 1997, y que forman parte del banco de DNA del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Las muestras provinieron de mujeres que se reclutaron en el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” en Acapulco, Gro., en los centros de salud de Chilpancingo e Iguala, Gro., así como en el Servicio de Detección Oportuna de Cáncer Cérvico Uterino de la misma Facultad.

Se consideraron mujeres de cualquier edad, sexualmente activas y sin tratamiento para LEI o CaCu y que no estuvieran histerectomizadas. Se obtuvieron dos biopsias dirigidas por colposcopia para el caso de las mujeres con LEI de cualquier grado y con CaCu, para realizar el diagnóstico histopatológico y estudio molecular. Se obtuvieron dos muestras de raspado cervical de las mujeres que asistieron al estudio de rutina de citología cervical exfoliativa, una se utilizó para el diagnóstico citológico y la otra para el estudio molecular.

El número de muestras se seleccionó por conveniencia, tomando en cuenta sólo aquellas positivas a VPH 16 y 33. Se incluyeron un total de 91 muestras que se dividieron en cuatro grupos de acuerdo al diagnóstico citológico o histopatológico (Tabla 1).

Tabla 1. Genotipos del VPH y grupos de estudio.

Genotipo viral	Número de muestras por grupo			
	CaCu	LEIAG	LEIBG	CN ^a
VPH 16	46	10	18	5
VPH 33	1 ^b	4	4	4
Total	46	14	22	9

^a Citología cervical normal.

^b Muestra CC07 correspondiente a una de las 46 de CaCu con infección doble (VPH 16 y 33).

Detección del DNA del VPH y tipificación. La extracción y purificación del DNA de las muestras de células exfoliadas y de tejido se realizó por extracción fenólica, previa digestión con proteinasa K.²¹ La detección del DNA de VPH se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores degenerados MY09 y MY11 para la región altamente conservada del gen L1 de acuerdo a lo descrito por Bauer et al;²² amplificando un fragmento de 450 pb aproximadamente. Los genotipos de VPH fueron identificados en base a los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) utilizando 7 enzimas de restricción: *Bam* HI, *Dde* I, *Hae* III, *Inf*. I, *Pst* I, *Rsa* I y *Sau3* AI (GIBCO BRL). Este método identifica hasta 44 tipos virales e incluye los genotipos oncogénicos de interés (VPH 16 y 33).²³ Los productos de PCR y las restricciones fueron resueltos en gel de agarosa (Invitrogen) al 1.5 y 2.5% respectivamente, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/µl) y visualizados bajo luz UV.

PCR y secuenciación de la región E6 del VPH 16 y 33. A partir del DNA obtenido de las muestras cervicales, el gen E6 del VPH 16 y 33 se amplificó por PCR independientes para cada genotipo utilizando iniciadores tipo-específicos (Tabla 2).

Tabla 2. Localización, secuencia y producto esperado de los oligonucleótidos iniciadores usados en la PCR y la reacción de secuenciación para la región E6.^{17,24}

Tipo viral	Posición en el gen E6	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño del Producto
VPH 16	83-559	GAACCGAAACCGGTTAGTAT CAGTTGTCTCTGGTTGCAA	523 pb
VPH 33	109-558	GGCAGTAAGGTACTGCACGACTATG CCTCTCATGGCGTTTTTACACG	492 pb

La mezcla de PCR y las condiciones de amplificación se adaptaron de las descritas en Casas et al.²⁴ Brevemente, se utilizaron 2.5 µl de DNA adicionados para una reacción de un volumen final de 50 µl conteniendo 1 µM de cada iniciador, 1X del amortiguador de PCR, MgCl₂ 4 mM, 200 µM de cada dNTP y 1.25 U de Ampli *Taq* Gold™ (Applied Biosystems).

El programa de amplificación se realizó en un termociclador GenAmp PCR System 2400 de Applied Biosystems, con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min y 40 ciclos de: 94°C por 45 seg, 58°C por 45 seg y 72°C por 1min 30 seg, seguidos por un paso final de extensión a 72°C por 7 min. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2% y teñidas con bromuro de etidio (0.5 µg/µl) para visualizar el fragmento esperado para cada genotipo viral (Tabla 2). El gel se observó bajo luz ultravioleta utilizando el fotodocumentador de geles GeneGenius SYNGENE, Synoptic Ltd.

El fragmento esperado para cada VPH se purificó por el método del isopropanol al 75% en tubo (protocolo 2-34 del User's Manual) para eliminar los componentes sobrantes de la mezcla de PCR. Los productos fueron secuenciados usando el método fluorescente de secuenciación en ciclo (Big Dye Terminator Ready Reaction Kit, Applied Biosystems) usando los mismos iniciadores específicos. La mezcla de PCR para el marcaje y las condiciones del ciclo fueron usadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante a excepción de la temperatura de alineamiento (54°C) y el tiempo de extensión (5 minutos). Posterior al marcaje se utilizaron las columnas Centri-Sep™ (Applied Biosystems) con las condiciones especificadas por el fabricante para eliminar los dideoxinucleótidos no incorporados. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático de DNA ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El análisis de la secuencia se comparó utilizando el BLAST vía internet y el programa ALING del servidor de la red GENESTREAM para comparar la secuencia de las variantes con la secuencia de referencia. La secuencia y la posición de las bases del VPH 16 están numeradas de acuerdo a la base de datos de secuencias de 1997 (Los Alamos National Laboratory, NM). La secuencia de referencia del VPH 33 prototipo están numeradas de acuerdo a lo descrito por Cole et al y se obtuvo del NCBI-GenBank.²⁵

Los resultados obtenidos de las variantes de los VPH 16 y 33 en los diferentes grupos de estudio se expresaron en figuras y tablas de frecuencia.

I. RESULTADOS

Con la finalidad de conocer las variantes de los VPH 16 y 33 se analizó la región E6 de cada tipo viral. Se emplearon muestras de CaCu, LEIAG, LEIBG y CN (Tabla 1). El promedio de edad y el rango mínimo y máximo en cada uno de los grupos estudiados y ordenados de acuerdo al grado cito-histológico se muestran en la tabla 3. Se observa que las mujeres con CaCu son de mayor edad en comparación con los demás grupos.

Tabla 3. Promedio y rango de edad estratificado por el grado de lesión y tipo de VPH.

Grado de lesión	VPH 16			VPH 33		
	n	Media años	Rango de edad	n	Media años	Rango de edad
CaCu	46	48.5	24-82	1	50	-
LEIAG	10	36.3	22-50	4	49.3	38-70
LEIBG	18	30.3	17-43	4	34.8	27-41
CN	5	44.0	23-62	4	33.8	23-40

La región E6 del VPH 16 y 33 de las muestras consideradas fueron sometidas a PCR con iniciadores tipo-específicos (tabla 2), y las electroforesis son mostradas en la figura 1. En el panel A de la figura 1 se observan muestras positivas del VPH 16, cuyo producto de PCR es de 523 pb y en el panel B se observan muestras positivas del VPH 33, cuyo producto de PCR es de 492 pb, los amplicones fueron resueltos en geles de agarosa al 2%.

Variantes del VPH 16

La designación de las variantes se basa en los criterios propuestos por Yamada et al,^{15,16} las primeras letras y números corresponden a la rama mayor: Europea prototipo (EP, E-P o E-350T), otras variantes Europeas (E), Asiática (As), Africana 1 y 2 (Af-1 y Af-2), Asiática-Americana (AA) y Norte-Americana-1 (NA-1); en seguida, se indica la posición y el nucleótido de la región E6 sustituto. Así, por ejemplo, la rama Europea tiene una variante que presenta una sustitución de timina por guanina en el nucleótido 350 de la región E6 (T350G) denominada E-350G. Esta variante es considerada como un clase porque es un cambio muy

frecuente, en cambio, E-C188G denota una variante Europea con una citosina en el nucleótido 188 de E6 más el cambio del nucleótido 350 indicado por la letra final G. Esta es denominada como una subclase.



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región E6 del VPH 16 y 33. A) Fragmento de 523 pb de la región E6 del VPH 16. B) Fragmento de 492 pb de la región E6 del VPH 33. Carril 1: marcador de peso molecular de 123 pb; carril 2-6: muestras positivas a E6; carril 7: control positivo DNA del VPH 16 (A) y 33 (B), contenido en un plásmido; carril 8: control negativo (H₂O).

El número de muestras, la posición y los cambios en la secuencia de nucleótidos de la región E6 de las diferentes clases y subclases de las variantes del VPH 16, así como el correspondiente cambio de aminoácido se observan en la tabla 4.

Del total de muestras (n=79), la variante más frecuente fue de la rama europea clase E-350G con un 32.9% (26/79). Se encontraron cinco subclases de la clase E-350G, la E-C188G en un 17.7% (14/79) seguida por E-C109G con un 8.9% (7/79), E-A176G con 3.8% (3/79), E-T182G en 2.5% (2/79) y E-G185G con 1.3% (1/79). Sólo se encontró un caso de la variante prototipo (1.3%). De la rama AA se encontraron dos subclases, la AA-a en el 27.8% (22/79) seguida por el 3.8% (3/79) de la AA-c. Respecto a la distribución de las variantes del VPH 16 en cada uno de los grupos de estudio se destaca la clase E-350G como la más frecuente en CaCu, LEIAG y CN detectada en el 32.6% (15/46), 40% (4/10) y 60% (3/5) respectivamente. Es importante señalar que en el grupo de LEIBG la subclase AA-a fue la más frecuente con 33.3% (6/18) comparado con el 22.2% (4/18) de las clase E-350G. (Tabla 5).

Tabla 4. Variación nucleotídica de las clases y subclases de la región E6 del VPH 16.

Variante (clase/subclase)	Secuencia y número de posición de nucleótidos de la región E6																									Número de muestras		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4		5	
Referencia	T	A	G	A	T	C	G	C	G	T	A	T	T	T	G	G	C	G	G	C	T	A	T	C	T	A	A	
E-350T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
E-350G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	26
E-C109G	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	7	
E-A176G	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	3	
E-C188G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	14	
E-G185G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	1	
E-T182G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	2	
AA-a	-	-	-	-	-	-	T	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	g	-	T	G	-	g	22
AA-c	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	a	g	-	T	G	-	g	3
	Total																									79		

- Las letras mayúsculas en los cambios nucleotídicos indican alteraciones en el cambio de aminoácido. Las letras en minúscula son mutaciones silenciosas.
- E-350T (Europea-prototipo), E-350G (clase Europea), E-C109G, E-A176G, E-C188G, E-C185G, E-T182G (subclases de la clase E-350G); AA-a, AA-c (subclases de la Asiático-Americana).
- Cambio de aminoácido indicado por variante:
E-350G, E-C109G, E-A176G: T350G= L83V
E-C188G: G188C= E29Q, T350G= L83V
E-C185G: T185G= L28V, T350G= L83V
E-T182G: A182T= I27L, T350G= L83V
AA-a: G145T= Q14H, C335T= H78Y, T350G= L83V
AA-c: G145T= Q14H, T183G= I27R, C335T= H78Y, T350G= L83V

Tabla 5. Frecuencia de las variantes del VPH 16 en cada uno de los diferentes tipos de lesión.

Variante (clase/subclase)	Grupo				
	Total n (%)	CaCu n (%)	LEIAG n (%)	LEIBG n (%)	CN n (%)
E-350T	1 (1.3)	0	0	1 (5.6)	0
E-350G	26 (32.9)	15 (32.6)	4 (40)	4 (22.2)	3 (60)
E-C188G	14 (17.7)	8 (17.4)	3 (30)	3 (16.7)	0
E-C109G	7 (8.9)	3 (6.5)	1 (10)	3 (16.7)	0
E-A176G	3 (3.8)	2 (4.3)	0	1 (5.6)	0
E-T182G	2 (2.5)	1 (2.2)	1 (10)	0	0
E-G185G	1 (1.3)	1 (2.2)	0	0	0
AA-a	22 (27.8)	13 (28.3)	1 (10)	6 (33.2)	2 (40)
AA-c	3 (3.8)	3 (6.5)	0	0	0
Total	79 (100)	46 (100)	10 (100)	18 (100)	5 (100)

Las variantes más frecuentes con respecto al tipo histológico de cáncer cervical invasor correspondieron a la clase E-350G en el 37.8% (14/37), las subclases E-C188G y AA-a se encontraron en el 18.9% (7/37) cada una en carcinoma cervical escamoso (CCE), en contraste, las variantes AA-a fueron más frecuentes en adenocarcinoma (AD) y carcinoma adenoescamoso (CAE) con 75% (3/4) y 50% (2/4) respectivamente (Tabla 6).

Con respecto a las variantes del VPH 16 en la etapa de progresión del cáncer cervical encontramos un mayor número de casos en etapa IIB (15/46), IB (13/46) y IIIB (11/46). La variante más frecuente fue la subclase AA-a en la etapa IB con 38.5% (5/13) y IIIB en 36.4% (4/11), sólo en la etapa IIB se encontró a la variante E-350G en 40% (6/15).

Tabla 6. Frecuencia de las variantes del VPH 16 en cáncer cervical invasor de diferente origen histológico.

Variante (clase/subclase)	Tipo histológico de cáncer cervical invasor			
	Carcinoma celular escamoso n (%)	Adenocarcinoma n (%)	Carcinoma adenoescamoso n (%)	Carcinoma de células Glassy n (%)
E-350G	14 (37.8)	1 (25)	0	0
E-C188G	7 (18.9)	0	1 (25)	0
E-C109G	3 (8.1)	0	0	0
E-A176G	1 (2.7)	0	1 (25)	0
E-T182G	1 (2.7)	0	0	0
E-G185G	1 (2.7)	0	0	0
AA-a	7 (18.9)	3 (75)	2 (50)	1 (100)
AA-c	3 (8.1)	0	0	0
Total	37 (100)	4 (100)	4 (100)	1 (100)

Variantes del VPH 33

Del análisis de la secuencia del gen E6 del VPH 33 en los diferentes grupos de estudio comparadas con la cepa de referencia (prototipo), se presenta, la posición y numeración de los cambios nucleotídicos en E6, los cambios de aminoácidos y la frecuencia de variantes encontradas correspondientes a los grupos de CN, LEIBG, LEIAG y CaCu. La secuencia de nucleótidos de la región E6 del VPH 33 prototipo es de acuerdo a lo reportado por Cole et al.^{17,25} Los VPHs con variaciones en la secuencia de DNA de la región E6 que conllevan a cambios en los aminoácidos se consideraron como variantes, estas fueron descritas indicando la posición del cambio del o los aminoácidos en la variante con respecto al prototipo. Así, por ejemplo, cuando el aminoácido lisina (K) en el residuo 35 del prototipo es sustituido por asparagina (N), ésta variante en E6 del VPH 33 es referida como K35N¹⁷ (Tabla 7).

Se identificaron 3 variantes diferentes: K35N encontrada en el 25% (1/4) del grupo de LEIAG, K35N/N86H también en el 25% (1/4) de LEIAG y P36T/I73L/V83L/K93N/A138V

en el 25% (1/4) de LEIAG y el 100% (4/4) de los grupos de CCN y LEIBG. La prototipo se encontró en el 25% (1/4) de LEIAG y en la única muestra de CaCu estudiada (Tabla 7).

Variantes del VPH 16 y 33 en CaCu con infección doble (caso único).

La única muestra del grupo de CaCu con VPH 33 se encontró en coinfección con VPH 16 (CC07). La PCR con los oligonucleótidos iniciadores MY09/MY11 fue positiva y permitió la identificación sólo de VPH 33. La PCR de E6 utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos para VPH 16 fue positiva, lo que permitió la identificación del tipo viral. La variante del VPH 16 fue de la subclase E-C109G y la del VPH 33 fue semejante al prototipo (Tabla 4 y 7 respectivamente).

Esto podría ser resultado de un proceso de integración del DNA viral al genoma celular hospedador, ya que este fenómeno requiere de la ruptura de E2 y este proceso puede hacer que se pierdan otras regiones, incluido parte del ORF L1.⁵ Así, para saber el porqué la muestra resultaba negativa al VPH 16 en la región L1 se realizó una PCR de la región E2 con iniciadores tipo-específicos para determinar el estado físico de este virus y se pudo observar que el resultado fue negativo a la forma episomal indicando así la integración del DNA viral al genoma de la célula hospedadora mediante la ruptura de la región analizada (Figura 2).

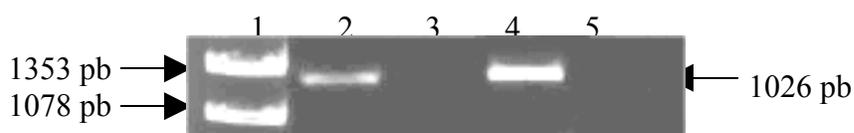


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de la región E2 del VPH 16. Carril 1: Marcado de peso molecular Φ X174/*Hae* III; carril 2: muestra positiva para el estado episomal-integrado; carril 3: muestra CC07 positiva al estado integrado; carril 4: control positivo de la región E2 no interrumpida (DNA del VPH 16 contenido en un plásmido); carril 5: control negativo (H₂O).

Tabla 7. Variación nucleotídica de la región E6 y frecuencia de variantes de VPH 33.

Posición y secuencia de nucleótidos de la región E6															Variantes	Frecuencia			
1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	5	5		Grupo de estudio			
3	3	0	1	1	7	1	2	5	6	8	4	8	2	3		CCN	LEIBG	LEIAG	CaCu
2	8	4	3	4	3	5	5	5	4	7	6	0	1	4		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
A	A	A	A	C	A	C	A	G	A	A	A	A	C	C	Prototipo				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	prototipo	0	0	1 (25)	1 (100)
-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K35N	0	0	1 (25)	0
-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	t	-	-	K35N/N86H	0	0	1 (25)	0
-	-	g	-	A	-	t	C	T	-	C	-	-	T	t	P36T/I73L/V83L/K93N/A138V	4 (100)	4 (100)	1 (25)	0
Total															4 (100)	4 (100)	4 (100)	1 (100)	

- Las letras mayúsculas en los cambios nucleotídicos indican alteraciones que resultan en el cambio de aminoácido. Las letras en minúsculas indican mutaciones silenciosas.
- Cambio de aminoácido: A213C= K35N; C214A= P36T; A325C= I73L; G355T= V83L; A364C= N86H; A387C= K93N; C521T= A138V

II. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La asociación del desarrollo del CaCu y las lesiones que lo preceden con la infección por virus del papiloma humano de alto riesgo se ha demostrado en diversos estudios epidemiológicos. Sin embargo, menos del 5% de las mujeres infectadas progresan a un cáncer invasor, indicando que hay factores virales (persistencia de la infección por VPH, carga viral, integración del DNA viral al genoma hospedero y variantes del VPH) y no virales (inmunidad celular, alelos HLA, alteraciones de genes celulares y daños genéticos y epigenéticos) que juegan un papel clave en el proceso de la carcinogénesis y solos o en combinación, están asociados con un riesgo mayor de aparición de la enfermedad o progresión de las lesiones precancerosas.¹⁴

En la actualidad, la mayor parte de las investigaciones se están enfocando a la detección de variantes de los papilomavirus oncogénicos y muchos estudios han sugerido que las variantes del VPH de alto riesgo muestran diferentes grados de asociación con CaCu y lesiones que lo preceden.^{12,26,27} Esto podría explicar, parcialmente, porqué algunas infecciones por VPH oncogénicos progresan de una lesión precancerosa hasta un cáncer invasor.¹⁴

En el presente estudio, se analizó la presencia de variantes en E6 del VPH 16 y 33 en mujeres con CaCu, LEIAG, LEIBG y con citología cervical normal. Los resultados muestran el predominio de variantes de la rama Europea del VPH 16, (68.4%), seguidas de las variantes no Europeas (31.6%). De las variantes Europeas, la clase E-350G fue la más frecuente seguida por la subclase E-C188G (32.9 y 17.7% respectivamente). Es importante señalar que, contrario a muchos otros estudios, de las variantes no Europeas sólo se encontraron las de la clase Asiático-Americana predominando la subclase AA-a (27.8%) (Tabla 5).

La variante E-350G fue la más frecuente en CaCu, LEIAG y CN, mientras que la AA-a lo fue en LEIBG (Tabla 5).

En un estudio internacional realizado por Yamada et al en 1997,²⁸ específicamente en muestras de cáncer cervical del continente americano y positivas al VPH 16, se reportó la variante E-350G en el 40% (12/30) de las muestras de Norte América (EUA y Canadá) y en el 52.2% (119/228) de las muestras de América Central y del Sur.²⁸ En nuestro estudio, la encontramos en el 32.6% de los muestras de CaCu positivas a VPH 16. Un estudio realizado por Berumen et al¹² reporta una prevalencia de 46.7% de esta misma variante en casos de mujeres mexicanas con cáncer positivos a VPH 16. El mismo estudio reporta otras variantes;

la subclase E-C188G con el 6.5% y E-A176G con 3.3%,¹² en el presente estudio se encontraron en 17.4 y 4.3% respectivamente. Como se puede observar, nuestro hallazgo de la subclase E-C188G es casi 3 veces mayor que la reportada por Berumen. Otras variantes encontradas por Berumen y no identificadas en nuestro estudio fueron la E-G131G, E-A176T y E-P350T.¹²

Como se mencionó anteriormente, la variante E-350G tiene una distribución semejante en los grupos de LEIAG, LEIBG y CN como reporta Nindl et al,²⁹ quien estudio mujeres alemanas con los mismos grados de lesión cervical, casos de CaCu e histológicamente normales y encontró que la variante E-350G tiene una distribución uniforme en todas las formas de la enfermedad y de histología cervical normal al igual que lo reportado en un estudio realizado en mujeres de Yucatán, México con LEIBG y CaCu.^{11,29} No obstante, otros estudios han mostrado que la frecuencia de esta variante es mayor en cáncer cervical invasor que en las lesiones precancerosas. Zehbe et al³⁰ comparó casos de NIC y CaCu y reportó que la variante E-350G es un factor de riesgo en mujeres suecas pero no en mujeres italianas, semejante a lo reportado por Chan et al.³¹

La variante E-350G presenta una sustitución del aminoácido valina por leucina en el residuo 83 de E6 y algunos estudios *in vitro* han sugerido que esta mutación podría incrementar la capacidad del virus para inducir la transformación celular.³² Más recientemente se ha observado un papel clave en la tumorigénesis cervical debido a que potencia la vía de señalización de las proteínas cinasas mitógeno-activadas (MAPK) y coopera en la transformación debido a la activación de la señalización de Notch1. Notch1 es parte de una familia de receptores transmembranales y la señalización activada de este receptor genera una señal antiapoptótica a través de la vía PI3K-PKB/Akt que resulta en la resistencia a la anoikis (apoptosis inducida por pérdida de la adhesión celular) y también bloquea la muerte celular inducida por p53.³³

Se ha observado también que la variante E-350G potencia la señalización de las MAPK mediante una vía independiente de Ras, ya que inhibe la transformación oncogénica mediada por esta vía y lo hace por medio de un mecanismo dependiente de Rap1, el cual, además, induce la degradación de la proteína de unión E6TP1 (una proteína GTPasa-activadora que reduce el potencial de inmortalización de E6 prototipo).³³

De acuerdo a Yamada et al²⁸ las variantes AA se han reportado en muestras de CaCu con VPH 16 de América del Sur y Central, en España y Asia. La frecuencia más alta fue reportada en América del Sur y Central con un 19.7% (45/228), de esta variante, la subclase AA-a en 14.8% y la AA-c en 4.4%.²⁸ En nuestro estudio la frecuencia es mucho mayor (34.8%) distribuyéndose en 28.3% de la subclase AA-a y 6.5% de AA-c. En el estudio realizado por Berumen se reporta una frecuencia del 45.6%; muy alta en comparación con nuestros resultados y más aún con los de Yamada,²⁸ la prevalencia de la AA-a y AA-c son del 23.9 y 21.7% respectivamente; una distribución casi uniforme de estas subclases en contraste con nuestros hallazgos.

Más recientemente, González-Losa et al¹¹ estudiando mujeres yucatecas con CaCu y LEIBG reportó variantes AA sólo en los casos de cáncer cervical,¹¹ nuestros resultados en cambio muestran una mayor frecuencia de las variantes AA en el grupo de LEIBG. Otro estudio realizado en mujeres Quechuas de Argentina divididas en grupos semejantes a los analizados en el presente trabajo reportó una alta frecuencia de variantes de la rama Europea, la variante prototipo fue la más frecuente seguida por la clase E-350G, y es importante señalar que no se encontró la variante AA en CaCu ni en citología cervical normal pero sí en los grupos de LEIBG y LEIAG.¹⁴ Nuestros resultados en cambio muestran que sólo encontramos la variante prototipo en LEIBG (5.6%) y las variantes AA se encontraron en los cuatro grupos. Estos hallazgos pueden ser el resultado de las diferencias étnicas y geográficas que existen entre los grupos poblacionales pero otra explicación podría ser la distribución heterogénea del número de muestras analizadas en cada grupo.

El carcinoma celular escamoso tiene una mayor incidencia que el adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso, sin embargo, estos últimos usualmente exhiben un comportamiento biológico más agresivo y generalmente se asocian con la infección por el VPH 18.^{19,34} En nuestro caso, como se puede observar, la variante E-350G fue la más frecuente en carcinoma celular escamoso, pero es importante destacar que la variante AA fue la más frecuente en adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso y se encontró en el único caso de carcinoma de células Glassy (Tabla 6). Así, estos resultados son congruentes con los estudios realizados en México por Berumen (2001)¹² y Lizano (1997),¹⁹ y más recientemente por Burk, (2003).³⁴ En nuestros resultados encontramos el 75% (3/4) de variantes AA en adenocarcinoma, Berumen la reporta en todos los adenocarcinomas analizados en sus casos.

Además, la baja frecuencia de VPH 16 en adenocarcinomas puede explicarse por diferencias étnicas y geográficas, ya que se ha reportado que las variantes AA del VPH 16, específicamente la subclase AA-c, son raramente encontradas en cualquier región del mundo excepto en México, América Central y del Sur y en España.¹² Actualmente no hay una explicación clara entre la histología del tumor y el tipo de VPH, sin embargo, muchos reportes muestran que hay una evidencia creciente que soporta la asociación del VPH 18 con formas más agresivas de cáncer cervical comparado con otros tipos y esto parece tener especial significado cuando los estudios examinan las etapas de avance del CaCu en las pacientes.³⁵ Este hecho hace relevante el hallazgo de variantes AA que en los estudios reportados se asocian más a adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso.

Nosotros determinamos la variante del VPH 16 más frecuente con respecto a la etapa de avance en la que se encontraba el cáncer. Se puede observar que las variantes no tienen una distribución uniforme en función de la etapa de CaCu (Tabla 7). No hay reportes que relacionen las variantes del VPH 16 con la etapa de avance de la enfermedad. Un estudio realizado en pacientes con CaCu en etapa IB encontró una mayor incidencia de metástasis a ganglio linfático pélvico e invasión estromal asociado al VPH 18 en adenocarcinoma.³⁵ Estos resultados no son comparables con nuestro estudio pero nos sugiere que puede existir un comportamiento semejante de las variantes que encontramos en la etapa IB, IIB y IIIB, etapas en las que encontramos el mayor número de casos de CaCu en nuestro grupo de estudio y donde las variantes AA-a (38.5%), E-350G (40%) y AA-a (36.4%) respectivamente son las más frecuentes. De existir este probable comportamiento, quizá esté más directamente relacionado con las variantes AA-a, que fueron más frecuentes en adenocarcinoma.

De acuerdo a lo descrito por Berumen, la incidencia del cáncer cervical en mujeres jóvenes se ha incrementado durante las dos últimas décadas en muchos países excepto en los Estados Unidos. Así, en México, la diferencia puede ser resultado de los programas de tamizaje o las altas prevalencias de variantes del VPH 16. Aún cuando en nuestro estudio las variantes Asiático-Americanas fueron menos frecuente que las Europeas, suficientes datos apoyan que las variantes AA se asocian con infección en mujeres más jóvenes (7.7 años menos que los casos positivos a la variante E), con adenocarcinoma y un riesgo significativamente más elevado para el cáncer cervical (OR de 27.0 IC 95%=6.4-113.7).¹² La mayor oncogenicidad de estas variantes puede ser resultado de una actividad neoplásica

incrementada de los oncogenes E6/E7, una replicación viral más eficiente o mejor estimulación de los genes virales tempranos. Por ejemplo, la proteína E6 de una variante AA produce consistentemente más colonias resistentes en la diferenciación a suero y calcio en queratinocitos de prepucio primarios de humanos y estimula la degradación de p53 mejor que la proteína E6 de la variante E.³⁶ El número de copias de las variantes AA es mayor que el de las variantes E, lo que sugiere que las AA se replican mejor y más rápido que las E.²⁴

Muchos de los estudios sobre variación genética del papilomavirus humano se han enfocado principalmente al VPH tipo 16 y 18 debido a su potencial oncogénico, sin embargo, tipos de VPH como el 45, 31, 35, 52, 58, 33, entre otros, también se han estudiado sus variaciones intragénicas.

González, LMR et al reportó al VPH 33 como tipo común en mujeres yucatecas con diagnóstico de CaCu, LEIAG o LEIBG después del VPH tipo 58, 16 y 18.¹¹ Estos resultados concuerdan con los reportados en el Estado de Guerrero, donde el VPH tipo 33 es uno de los más frecuentes en mujeres con citología cervical normal, LEIBG y LEIAG, no así en mujeres con CaCu, donde sólo se encontró en el 1.1% de casos.²⁰ La alta frecuencia de VPH 33 hace importante determinar las variaciones nucleotídicas en la región E6 de este VPH de alto riesgo. Los resultados de este estudio indican que las variantes del VPH 33 predominaron más que el prototipo en mujeres con citología cervical normal y las precancerosas, no así en el único caso positivo a VPH 33 encontrado en CaCu en el que se identificó el VPH 33 prototipo. Se encontraron 3 variantes diferentes (K35N, K35N/N86H y P36T/I73L/V83L/K93N/A138V) descritas de acuerdo a la posición y cambio de aminoácido resultado de las alteraciones no silenciosas en la secuencia de la región E6 del VPH 33 (Tabla 7). Xin et al¹⁷ reportó 6 variantes diferentes en mujeres japonesas divididas en tres grupos clínicos de acuerdo al avance de la enfermedad: NIC I/II, NIC III y CaCu, tres de estas variantes son semejantes a las que nosotros encontramos. Xin et al¹⁷ identificó en el grupo de NIC III una frecuencia del 100% (5/5) para el VPH 33 prototipo, en el grupo de NIC I/II reportan que el 71% (5/7) presentó variantes (K35N, K35N/N86H, K35N/P36A/N86H, P36T/I73L/K93N/A138V y P36T/I73L/V83L/K93N/A138V) y en CaCu sólo el 25% (2/8) presentó variantes (K8N y K35N/N86H/K93N/Q113R). En nuestro estudio se encontró que el 75% (3/4) de LEIAG presentó variantes (K35N, K35N/N86H y P36T/I73L/V83L/K93N/A138V) y el 25% (1/4)

presentó VPH 33 prototipo. Los grupos de LEIBG y CN presentaron el 100% de la misma variante, la P36T/I73L/V83L/K93N/A138V.

Nuestro estudio no reveló las variantes K8N y K35N/N86H/K93N/Q113R, en CaCu, y K35N/P36A/N86H y P36T/I73L/K93N/A138V, en lesiones precancerosas de acuerdo a los reportado por Xin et al.¹⁷ Nuestros resultados no son comparables con los de Xin et al¹⁷ debido a la diferente clasificación en las que dividió a sus grupos de estudio.

Se ha demostrado que durante el proceso de transformación maligna cervical asociada a VPH, el virus se integra al DNA celular pudiendo perderse por delección algunas porciones de su genoma tales como L1, L2, E1 y E2, mientras que los oncogenes virales E6 y E7 siempre se conservan.⁵ Esto se ha demostrado en un estudio realizado por Kalantari et al, quien indica incluso que las delecciones varían desde 35 pb hasta 3.8 kb.³⁷ Esta característica explica el resultado de la única muestra de CaCu positiva al VPH 33 y que fue negativa al VPH 16 por el sistema de PCR MY09/11 para L1, sin embargo, esta misma muestra resultó ser positiva a la región E6 cuando se sometió a PCR con oligonucleótidos específicos para VPH 16 y la variante identificada fue de la rama Europea subclase E-C109G. Para descartar que el genoma de este virus pudiera estar integrado al DNA celular, se realizó una segunda PCR tipo-específica para la región E2, el resultado negativo en la región antes mencionada, puso en evidencia la integración del DNA del VPH 16 al genoma celular hospedador. zur Hausen et al³⁸ postuló que la integración del VPH en el DNA celular, con el previo rompimiento de E2, era un paso indispensable para la progresión de las lesiones precancerosas a cáncer cervical invasor.³⁹ Resultados aportados por Casas et al²⁴ indican que las variantes de la rama E tienden a romper su genoma durante el proceso de integración, no así las variantes AA, las cuales se asociaron con carcinomas positivos a E1/E2. Casas et al identificó 24 mutaciones distribuidas a lo largo del gen completo E2, 19 de las cuales resultaron en el cambio de aminoácidos, lo que, de acuerdo a estudios *in vitro* en líneas celulares, el gen E2 de la rama Europea, como ya se sabía, reprimió la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, no así el gen E2 de las variantes AA principalmente las de la subclase AA-c.^{24,39} Estos hallazgos soportan y podrían explicar la mayor agresividad de las variantes AA que las E. Resultados obtenidos por Illades et al⁴⁰ en 39 muestras de CaCu positivas a VPH 16 muestran un 53% (22/39) de muestras negativas a E2 y 47% (17/39) positiva a esta región.⁴⁰ En este estudio, 14 muestras de la variante AA que en el estudio de Illades et al⁴⁰ se analizaron para E2, el 92.9%

(13/14) fueron positivas a dicha región, hallazgos que indican la probable retención del gen E2 y no integración del VPH. Sin embargo, algunas de nuestras variantes de la rama Europea mostraron el mismo comportamiento (resultados no mostrados), es decir, retienen E2, lo cual difiere de los resultados de Casas et al.²⁴

Se ha propuesto que el origen de los distintos papilomavirus humanos muestran concordancia con los patrones de migración humana. Así, se ha propuesto que las variantes AA, particularmente la AA-c del VPH 16 tuvo su origen en el continente americano y es exclusivo de América Latina. Esta variante pudo emerger en el nuevo mundo después que varios grupos étnicos provenientes de Asia entraron a América por el estrecho de Bering. La variante AA-a y las de la rama Europea, podrían haber llegado con los conquistadores españoles.^{5,12} La llegada de las variantes del VPH 33 pueden ser explicadas también por los patrones de migración y múltiples movimientos poblacionales.

Con base en los resultados de este estudio se puede concluir que las variantes del VPH 16 de la rama E son la más frecuentes en los grupos de CN, LEIAG y CaCu, no así en el grupo de LEIBG donde la variante AA predomina. De la rama E, la clase E-350G fue la más frecuente seguida por la subclase E-C188G y de la AA la más frecuente fue de la subclase AA-a. Aún cuando muy pocas muestras del grupo de CaCu presentaron adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso, en éstas, la variante mas frecuente fue la AA-a, considerada menos agresiva que la AA-c.

En las muestras positivas al VPH 33, fueron más frecuentes las variantes de este tipo viral, pero en CaCu se encontró la prototipo, considerada en mujeres japonesas como un factor de riesgo para el desarrollo de LEIAG y cáncer cervical.

V. REFERENCIAS

1. Park BR, Androphy EJ. Genetic analysis of high-risk E6 episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol* 2002; 76:11359-11364.
2. Howley PM, Lowy DR. Papillomavirus and their replication. *En: Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 4ª. Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; vol 2:2197.*
3. Burd E M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Micro Rev* 2003;16: 1-17.
4. Anhang, R, Goodman A, Goldie SJ. HPV communication: review of existing research and recommendations for patient education. *A Cancer J Clin* 2004;54:248-259.
5. Picconi MA, Alonio LV, Carranca A, Lizano M, Cervantes G, Distefano AI, et al. Variantes moleculares de virus papiloma humano (VPH) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cérvix. *Medicina-Buenos Aires* 2000;60:889-894.
6. Lizano M, García-Carrancá A. Las variantes moleculares de papilomavirus humanos 16, 18 y 45 en tumores del cuello uterino, en México. *Gac Med Méx* 133:43-48.
7. Callejas-Macias I.E, Kalantari M, Huh J, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, González-Guerrero JF, et al. Genomic diversity of human papillomavirus- 16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology* 2004;319:315-323.
8. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-527.
9. Bosh FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
10. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
11. González-Losa MR, Laviada-Mier MA, Teran M, Puerto-Solís, García-Carrancá A. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol.* 2004;29:95-98.
12. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al. Asian-american variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1325-1330.
13. Heilman V, Kreienberg R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Curr Women's Helth Rep* 2002;2:27-33.
14. Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, Mbayed V, Villa LL, Gronda J, et al. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua Aboriginal from Argentina. *J Med Virol* 2003;69:546-552.
15. Giannoudis A, Herrington S. Human papilomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 2001;193:295-302.
16. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations

- characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 1995;69:7743-7753.
17. Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, et al. Analysis of variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett* 2001;170:19-24
 18. Callejas-Macias IE, Prado J, Villa L, Bernard HU. The genomic variation of HPV-31, 35, 44, 52, 53, 56, 58, 66, and 68 correlates with the geographic origin and the ethnicity the infected patient cohort. *Memorias del 22nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop*. 2005
 19. 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* 1997;89:1227-1231.
 20. Illades-Aguilar B, Leyva-Vázquez MA, Alarcón-Romero LC, Flores-Alfaro E, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, et al. Human papillomavirus infection in Mexican women with cervical cancer, squamous intraepithelial lesion and cytologically normal. *18th International Papillomavirus Conference*. Barcelona, España. 2000.
 21. Davis L, Kuehl M, Battey J. *Basic methods in molecular biology*. 2nd Edition. Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1994; p:16.
 22. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Trans Dis* 1993;20:274-278.
 23. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Inf Dis* 1994;170:1077-1085.
 24. Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, López N, Guido M, Berumen J. Asian-american variants of human papillomaviru type 16 have extensive mutations in the *E2* gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1999;7:258-269.
 25. Cole ST, Streeck RE. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer. *J Virol* 1986;58:991-995.
 26. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000;81:2959-2968.
 27. Fu-Xi L, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:796-802.
 28. Yamada T, Manos MM, Peto J, Creer CE, Muñoz N, Bosch FX, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997;71:2463-2472.
 29. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. Uniform distribution of HPV 16 E6 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* 1999;82:203-207.

30. Zehbe I, Voglino G, Delius H, Wilander E, Tommasino M. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet* 1998;352:1441.
31. Chan KSP, Lang CW, Cheung TH, Li WWH, Lo KWR, Chan MY, et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in Southern China. *J Inf Dis* 2002;186:696-700.
32. Stoppler MC, Ching K, Stoppler 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* 1996;70:6987-6993.
33. Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, et al. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol* 2004;78:5934-5945.
34. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* 2003;63:7215-7220.
35. Samuel SI, Wilczynski SP, Burger RA, Monk BJ. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper. *Clin Cancer Res* 2003;9:4145-4150.
36. Stoppler MC, Ching K, Stoppler 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* 1996;70:6987-6993.
37. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diag Mol Pathol* 2001;10: 46-54.
38. Schwarz E, Fresse UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nat* 1985;314:111-114.
39. Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendáriz-Borunda J, Berumen J. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gene Virol* 2004;85:1433-1444.
40. Miranda-Bello A, Illades-Aguilar B, Antonio-Véjar V, Leyva-Vázquez MA, Terán-Porcayo MA. Physical state of HPV 16 DNA in cervical cancer from women of southern Mexico. 21st. International Papillomavirus Conference. Mexico City, 2004.