

MUTACIONES EN GENES *Ha-ras* y *p53* DETECTADAS MEDIANTE PCR-SSCP EN LESIONES PREMALIGNAS Y MALIGNAS DE CUELLO UTERINO ASOCIADAS CON VIRUS PAPILOMA HUMANO

LIDIA V. ALONIO¹, DELIA DALBERT², MARIA ALEJANDRA PICCONI¹, GUADALUPE CERVANTES VAZQUEZ³,
ALEJANDRO GARCIA CARRANCA³, ANGELICA L. DISTEFANO¹, JUAN MURAL², OFELIA BARTT²,
GRACIELA BAZAN², ANGELICA R. TEYSSIE¹

¹ Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires; ² Hospital Nacional Prof. Alejandro Posadas, Haedo, Provincia de Buenos Aires; ³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de México, México, DF

Resumen El objetivo del estudio fue investigar las frecuencias de virus papiloma humano (HPV) y de mutaciones en los genes *Ha-ras* y el supresor *p53* en tumores y lesiones precursoras de cérvix. Se incluyeron en el estudio 30 carcinomas invasores (CAIN), 36 displasias severas (CIN III) y 12 tejidos normales adyacentes a los tumores (TN). Se realizó la tipificación de HPV y la búsqueda de mutaciones en los genes *Ha-ras* y *p53* mediante PCR-SSCP. Los CAIN fueron HPV positivos en el 93%; en el 41% se observaron mutaciones en *Ha-ras* y en el 17% para *p53*. El 80% de los CIN III fue HPV positivo, en el 18% se detectaron mutaciones en *Ha-ras* y en el 11% en *p53*. En los TN el HPV se detectó en el 17% de los casos. Todas las mutaciones fueron heterocigotas. Por otro lado, todas las muestras con mutaciones en *Ha-ras* resultaron HPV positivas, en cambio el 33% de los casos de *p53* mutada fueron HPV negativos. El HPV 16 (44%) fue más prevalente que el HPV 18 (15%); los casos de tipo viral no determinado (18%), indicarían la circulación en nuestro país, de otros tipos distintos a los ensayados (6, 11, 16, 18, 31 y 33), variantes o infecciones mixtas. La baja frecuencia de mutaciones en el gen *p53* señala que la inactivación de la proteína normal mediada por HPV tendría un rol más importante en la patogénesis del cáncer. Dado que el *Ha-ras* mutado se halló en lesiones premalignas, hemos especulado que podría representar un marcador temprano de progresión. Nuestros hallazgos proveen de evidencias adicionales acerca de un efecto interactivo entre los HPV de alto riesgo y de oncogenes en el desarrollo tumoral.

Abstract *Ha-ras and p53 gene mutations scanned by PCR-SSCP in human papillomavirus associated with premalignant and malignant lesions of the uterine cervix.* The aim of this study was to investigate the frequencies of human papillomavirus (HPV) and mutation in *Ha-ras* oncogene and tumour suppressor *p53* gene in cervical cancer and precursor lesions. A total of 30 invasive carcinomas (IC), 36 cervical intraepithelial neoplasia grade III (CIN III) and 12 normal tissues adjacent to the tumor (NT) were included. HPV typification and scanning of possible mutations in *Ha-ras* and *p53* genes were made by SSCP-PCR. The IC cases showed 93% HPV positivity, 41% having mobility shifts for *Ha-ras* mutations and 17% for *p53* mutations while in CIN III, these percentages were 80%, 18% and 11%, respectively. In normal tissues HPV frequency was 17%. All *Ha-ras* mutated samples were HPV positive but 33% of *p53* mutated cases were HPV negative. All mutations were heterozygous. HPV 16 was more prevalent (44%) than HPV 18 (15%) and the high rate of undetermined HPV types (18%) would indicate the circulation in our country of other types different from the assayed HPV controls (6, 11, 16, 18, 31 and 33), being variants or mixed infections. The low frequency of *p53* mutations (17%) strengthens the view that wild type *p53* inactivation by HPV probably plays a major role in the pathogenesis of cervical cancer. Because mutated *Ha-ras* was found in HPV associated premalignant lesions, we speculate that it represents an early marker for progression. Our findings provide additional evidence for an interactive effect between high risk types of HPV and oncogene activation in the development of uterine cervical cancer.

Key words: HPV, *Ha-ras*, *p53*, uterine cervical cancer

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado la asociación de los virus Papiloma humano (HPV) con el desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas del tracto anogenital^{1, 4}. Los HPV pueden

afectar a todo el tracto genital, aunque las infecciones localizadas en el cuello uterino han constituido el principal foco de atención, ya que presenta una mayor susceptibilidad a la transformación maligna⁵. Actualmente se han identificado más de 85 tipos, de los cuales alrededor de la mitad fueron detectados en lesiones anogenitales. En el cérvix se hallaron principalmente los tipos HPV6, 11 y 42 (bajo riesgo) en lesiones condilomatosas (verrugas genitales), displasias leves y moderadas; mientras que

Recibido: 22-V-2000

Aceptado: 10-VII-2000

Dirección postal: Dra. Lidia Virginia Alonio, Maza 1261, 1240 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4302-5064 e-mail: alonio@anlis.gov.ar

los HPV 16, 18, 31, 33 y 45 (alto riesgo) se encontraron principalmente en displasias de alto grado de severidad y carcinomas. Otros tipos como 39, 43, 44, 52 y 56 fueron detectados con menor frecuencia^{6, 10}.

La presencia de ADN viral en muestras clínicas ha sido demostrada por distintas metodologías incluyendo *Southern blot*, *dot blot*, hibridación *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y captura de híbridos^{11, 13}. El uso de PCR ha mejorado notablemente la sensibilidad de la detección de HPV en lesiones de cérvix, vulva, ano, pene y otras^{14, 17}. Uno de los más sensibles métodos para detectar alteraciones estructurales mínimas en el ADN, incluyendo mutaciones puntuales, es la técnica PCR-SSCP (*single stranded conformational polymorphism analysis*: análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple)¹⁸. Esta técnica ha sido aplicada para la tipificación de HPV^{19, 20}, permitiendo identificar en una sola reacción un amplio espectro de tipos de HPV, no siendo necesario realizar posteriores ensayos de confirmación. Por otro lado, también se ha empleado para la búsqueda rápida de alteraciones genéticas en un gran número de muestras, ya que han sido demostradas su sensibilidad y especificidad para detectar mutaciones puntuales y una concordancia del 100% con los resultados de la secuenciación directa¹⁸.

Existen evidencias suficientes para considerar que ciertos tipos virales, en particular HPV 16 y 18 son carcinogénicos en humanos³. Esta aseveración está sustentada en hallazgos experimentales que indican que proteínas de estos virus interfieren en el control de la célula persistentemente infectada^{4, 21}. Los genes que codifican a p53 y Rb ejercen un rol regulador del ADN celular y el ciclo mitótico, son genes supresores de tumor; cualquier alteración a nivel de estos genes o sus productos puede conducir a la transformación maligna^{22, 23}. Uno de los mecanismos de transformación por HPV demostrado *in vitro* es la unión específica de oncoproteínas virales E6 y E7, con proteínas regulatorias celulares²⁴. En las células infectadas con HPV se ha demostrado que la proteína celular p53 (producto del gen supresor de tumor homónimo) se une a la proteína codificada por la región E6 del genoma viral y que en los tipos de alto riesgo, la afinidad de la interacción es más fuerte que en los de bajo riesgo. Algunos estudios han mostrado que la oncoproteína E6 puede formar complejos solubles con p53 y además promover su degradación. Otra interacción ocurre entre la proteína celular Rb y la proteína codificada por la región E7.

La ubicuidad del HPV y el largo período de latencia entre la infección y el desarrollo del cáncer, indican que la presencia viral *per se* no es suficiente para generar la neoplasia; otros factores podrían contribuir a la transformación maligna. Se han considerado entre otros, la exposición a carcinógenos físicos (radiaciones), químicos y co-infecciones con patógenos potencialmente onco-

génicos (*Herpes simplex*, clamidias, etc). Asimismo son importantes los factores del huésped como la herencia, el estado inmunológico y/o hormonal^{3, 25, 26}.

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que involucra mecanismos genéticos y epigenéticos, los cuales pueden derivar en la activación de proto-oncogenes y/o inactivación de genes supresores. Los genes ras (Ha, Ki y N) constituyen una de las más importantes familias de oncogenes identificadas hasta ahora. Estos genes adquieren propiedades transformantes por mutaciones puntuales, generalmente en los codones 12, 13 o 61 de la proteína p21. Esta proteína está implicada en mecanismos de transducción de señales de proliferación y/o diferenciación²⁷. La mutación de la p21 es dominante, por lo que el efecto transformante ocurre aun cuando la misma es heterocigota. Las mutaciones en los genes ras se han observado en diferentes tipos de tumores humanos²⁸. Ha sido descrita una colaboración de los oncogenes ras con las oncoproteínas virales E6-E7 para inducir la transformación *in vitro* de keratinocitos²⁹; habiéndose sugerido que dicha transformación sería el resultado de un aumento en los niveles de las proteínas E6-E7 debido a la inducción de la actividad transcripcional en HPV mediada por el oncogen Ha-ras³⁰.

Las mutaciones del gen supresor p53 son las alteraciones más frecuentes en los cánceres humanos³¹. El producto de este gen juega un rol central en el mantenimiento de la estabilidad genómica cuando ocurren daños en el ADN. Cuando se producen mutaciones aumenta la concentración de p53 y queda bloqueada la proliferación celular, permitiendo la reparación del genoma o induciendo apoptosis. La abrogación de la función de p53 también puede ocurrir, como se mencionó previamente, por su interacción con la oncoproteína E6 del HPV.

En este estudio se ha enfocado en forma conjunta, la infección por HPV y alteraciones en los genes Ha-ras y p53, investigándose la frecuencia de la infección y la presencia de mutaciones en carcinomas invasores y lesiones premalignas de cuello uterino.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 30 casos de carcinoma invasor (CAIN); 36 casos de displasia severa/carcinoma *in situ* (CIN III) analizándose un total de 253 biopsias, incluyendo 12 adicionales tomadas de áreas adyacentes a las lesiones malignas, que resultaron histológicamente normales.

Extracción y purificación de ADN

Los ADN fueron extraídos por tratamiento enzimático y purificados por fenol/cloroformo, a partir de cortes seriados de biopsias fijadas y embebidas en parafina³². Para verificar la integridad de los ADN extraídos y su aptitud para ensayos de amplificación, se efectuó una PCR empleando *primers* GH20 y PC04 que amplifican un segmento de 260 pb del gen β globina humana³³.

Tipificación de HPV mediante PCR-SSCP

PCR: Los ADN de biopsias y de los controles virales fueron amplificados por PCR empleando *primers* genéricos GP5+ y GP6+, que producen un fragmento de 140 pb del gen viral L1¹⁶. En todos los ensayos, como controles positivos se emplearon los ADN de HPV clonados en plásmidos bacterianos, tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33, cedidos por los Dres. H. zur Hausen (Alemania), A. Lőrincz (EEUU) y G. Orth (Francia). La mezcla de amplificación, en un volumen final de 10 µl, contenía: 100-200 ng de ADN; 2.5 mM de MgCl₂; 50 mM de Tris HCl; 50 mM de ClK; 50 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP); 10 pmol de cada *primer*, 1 U de polimerasa Taq (Perkin Elmer); 1 µCi de ³³P-dCTP. Las muestras fueron desnaturalizadas a 94 °C por 5 min y sujetas a 40 ciclos de amplificación: 94 °C/30 seg., 45 °C/30 seg, 72 °C/30 seg y finalmente a 72 °C/3 min empleando un ciclador térmico Perkin Elmer 9600.

SSCP: Los productos de amplificación de muestras y controles fueron corridos en geles de poliacrilamida al 6%²⁰. Los geles fueron fijados con ácido acético al 10%, secados y expuestos a una película radiográfica X-OMAT-AR de Kodak. Se establecieron los patrones típicos de migración del ADN control correspondiente a cada tipo de HPV. La tipificación se llevó a cabo comparando la movilidad de las bandas de los productos de PCR provenientes de las muestras de biopsia con el patrón de bandas correspondiente a los controles de HPV amplificados.

Detección de mutaciones puntuales mediante PCR-SSCP

PCR en oncogen Ha-ras: Los ADN de las biopsias y de los controles fueron analizados por PCR empleando *primers* H12A y H12B, que amplifican un fragmento correspondiente a los codones 12 y 13²⁸. Como control normal se empleó ADN extraído de fibroblastos humanos de línea celular diploide y como control mutado se utilizó ADN de ras mutado clonado en

plásmido bacteriano (pEJ) cedido por el Dr. H. Suárez (Francia). La mezcla de amplificación, en un volumen final de 10 µl contenía: 100-500 ng de ADN; 50 mM de Tris HCl, 50 mM de ClK; 1.5 mM de MgCl₂; 2.5 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP); 0.25 mM de dCTP; 10 pmol de cada *primer*, 1 U de polimerasa Taq; 1 µCi de ³³P-dCTP.

Las muestras fueron desnaturalizadas a 95 °C por 2 minutos y sujetas a 39 ciclos de amplificación: 95 °C/30 seg, 59 °C/1 min, 72 °C/1 min y finalmente a 72 °C/5 min.

PCR en el gen supresor p53: Los ADN de las biopsias y de controles normales fueron amplificados por PCR empleando *primers* (P7-5 y P7-3) diseñados de acuerdo con las secuencias publicadas que corresponden a regiones donde habitualmente se detectan mutaciones en los exones 5 y 7 del gen p53³¹. La mezcla de amplificación en un volumen final de 10 µl contenía: 100-500 ng de ADN, 10 mM de Tris ClH (pH 8.3); 50 mM de ClK; 1 mM de MgCl₂; 2.5 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP); 0.25 mM de dCTP; 10 pmol de cada *primer*, 1 U de polimerasa Taq; 1 µCi de ³³P-dCTP.

Las muestras fueron desnaturalizadas a 94 °C por 3 minutos y sujetas a 30 ciclos de amplificación: 94 °C/1 min, 60 °C/1 min, 72 °C/1 min y finalmente a 72 °C/3 minutos.

SSCP: Se procedió en forma similar a la previamente descrita para la tipificación de HPV²⁰. Las mutaciones homocigóticas y heterocigóticas en Ha-ras y p53 fueron determinadas por variaciones en el número de bandas y la movilidad característica correspondiente a ambos alelos normales²⁸.

Resultados

Tipificación de HPV por PCR-SSCP

La Fig. 1 muestra la tipificación de HPV mediante la técnica PCR-SSCP, observándose un patrón de ban-

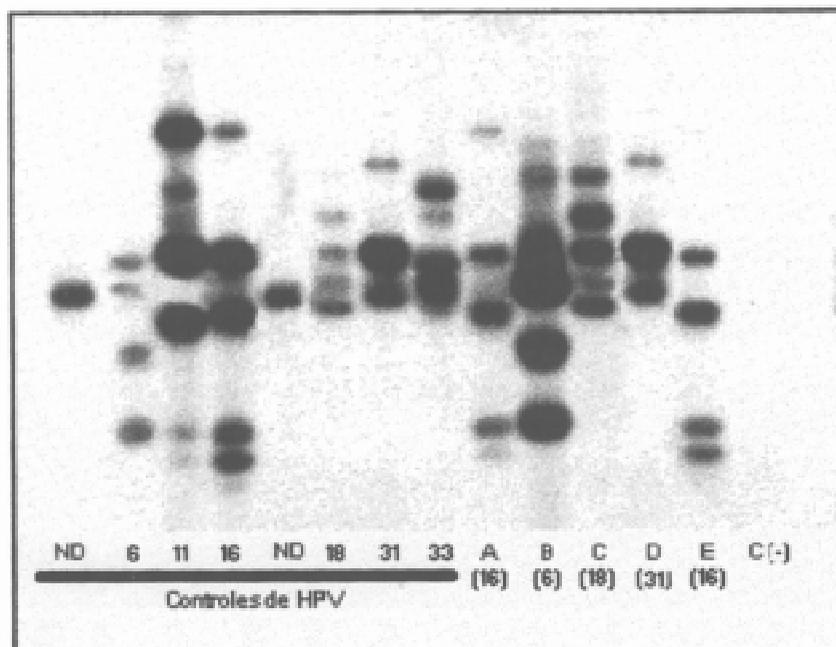


Fig. 1.— Tipificación de HPV en lesiones de cuello uterino mediante PCR-SSCP. ND: control de ADN no desnaturalizado. Controles positivos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33. A, B, C, D, E: carcinomas invasores. [0]: Tipo de HPV hallado. C (-): muestra sin ADN (control negativo). Las muestras A, B, C, D y E son positivas para los tipos 16, 6, 18, 31 y 16 respectivamente.

das específico para cada tipo viral incluido como control.

El HPV fue detectado en el 93% de los carcinomas invasores, en el 81% de los CIN III y en el 17% de los tejidos normales (Tabla 1). Los HPV 16 y 18 fueron los tipos virales más frecuentes (44% y 15% respectivamente). En la serie de lesiones analizadas no se detectaron casos positivos para HPV 11 y sólo se demostraron un caso de HPV 31 y 3 del HPV 33. El HPV 6 fue demostrado en dos carcinomas y en los correspondientes tejidos normales adyacentes a la lesión. El tipo viral no pudo determinarse por esta metodología

en 4 casos de carcinoma invasor (13%) y en 8 casos de CIN III (22%) debido a que el patrón de migración no coincidió con ninguno de los observados en los controles de HPV ensayados, por lo que se consideró positivos pero de tipo viral indeterminado (no mostrado).

Detección de mutaciones en el oncogen Ha-ras y el gen supresor p53

El análisis por SSCP de los productos de PCR para Ha-ras, mostró imágenes de bandas compatibles con posi-

TABLA 1.- Tipos de HPV detectados en lesiones malignas y premalignas de cuello uterino mediante PCR-SSCP

Diagnóstico histológicos	Tipos virales detectados						Total (%)
	6 (%)	16 (%)	18 (%)	31(%)	33(%)	Tipo(%) No det*	
CIN III n = 36	-	15 (42)	4 (11)	-	2 (6)	8 (22)	29 (81)
CAIN n = 30	2 (7)	14 (47)	6 (20)	1 (3)	1 (3)	4 (13)	28 (93)
Total n = 66	2 (3)	29 (44)	10 (15)	1 (1)	3 (5)	12 (18)	57 (86)
Tejido normal n = 12	2 (17)	-	-	-	-	-	2 (17)

* Tipo de HPV no determinado: El patrón de migración no coincidió con ninguno de los tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31 y 33 corridos como control.

CAIN: carcinoma invasor; CIN III (displasia severa/carcinoma in situ).

Tejido normal: tomado de áreas adyacentes a los CAIN, que resultaron histológicamente normales.

TABLA 2.- Detección de mutaciones en el oncogen Ha-ras y el gen supresor p53

Diagnóstico histológico	Ha-ras mutado (%)	p53 Mutado (%)	Total Mutaciones (%)
CIN III n = 36	7 (19 ^a)	4 (11)	11 (30)
CAIN n = 30	12 (40 ^a)	5 (17 ^b)	17 (57 ^c)
Tejido normal n = 12	-	-	-

^a Todos positivos para HPV.

^b Tres casos HPV negativos.

^c En tres casos se detectaron ambas alteraciones simultáneamente.

CAIN: carcinoma invasor; CIN III (displasia severa/carcinoma in situ)

Tejido normal: tomado de áreas adyacentes a los CAIN, que resultaron histológicamente normales.

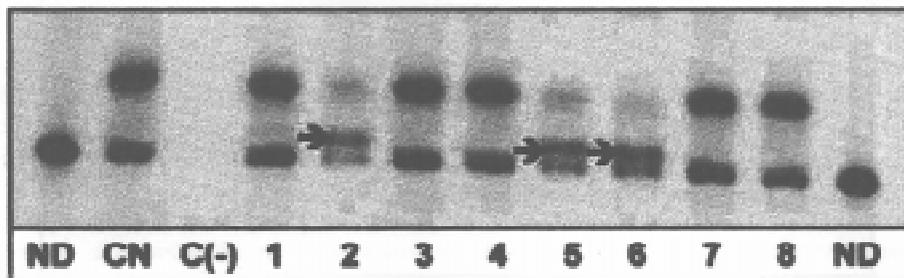


Fig. 2.- Detección de mutaciones en el gen supresor p53 en lesiones de cuello uterino mediante PCR-SSCP. ND: control de ADN no desnaturizado. CN: ADN control normal. C(-): muestra sin ADN (control negativo). 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8: carcinomas invasores. → 2, 5 y 6 muestran una banda adicional correspondiente a un probable alelo mutado (heterocigota).

TABLA 3.— Tipos virales detectados en los casos de mutación en los genes Ha-ras y p53

Tipos de HPV	Ha-ras					Total (%)	p53			Total (%)
	16 (%)	18 (%)	31 (%)	33 (%)	Neg. (%)		16 (%)	18 (%)	Negativo (%)	
CIN III	4	2	-	1	-	7	2	2	-	4
CAIN	9	1	1	1	-	12	2	-	3	5
Total	13 (68)	3 (16)	1 (5)	2 (10)	-	19 (100)	4 (44)	2 (22)	3 (33)	9 (100)

CAIN: carcinoma invasor; CIN III (displasia severa/carcinoma in situ)

bles mutaciones heterocitogas, en el 40% de los carcinomas y en el 19% de los CIN III (Tabla 2).

De los exones 5 y 7 de p53 examinados, sólo en el segundo se obtuvieron imágenes compatibles con mutaciones heterocitogas (Fig. 2) en 5 carcinomas invasores (17%) y en 4 CIN III (11%) (Tabla 2).

No se detectaron mutaciones para Ha-ras ni para p53 en las 12 biopsias de tejidos normales incluidas en el estudio.

Tipos de HPV detectados en los casos de mutaciones de Ha-ras y p53

Todos los casos de mutaciones en Ha-ras fueron positivos para HPV, resultando el 68% (13/19 casos) positivo para el tipo 16 y el 16% (3/19) para el tipo 18 (Tabla 3).

El 67% (6/9) de los casos con mutaciones en p53 fueron positivos para HPV; correspondiendo la totalidad a los HPV 16 y 18 (Tabla 3).

Conclusiones

Los estudios clínicos, epidemiológicos y virológicos han mostrado una asociación etiológica entre ciertos tipos de HPV y la neoplasia anogenital. Datos recientes obtenidos por la técnica PCR, aplicada en extendidos citológicos cervicales, indican que entre el 15 y 45% de las mujeres sanas están infectadas por tipos de HPV de alto riesgo; sin embargo se estima que sólo cerca del 3% de ellas desarrollarán cáncer de cérvix^{3,34}. La ubicuidad del HPV y el largo período de latencia entre la infección y el desarrollo del cáncer; indican que la presencia viral por sí sola no es suficiente para generar la neoplasia; otros factores podrían contribuir a la transformación maligna, entre ellos en este estudio se han abordado las alteraciones en el oncogen Ha-ras y el gen supresor tumoral p53.

En coincidencia con la mayoría de las publicaciones que señalan la presencia del HPV en el 80-100% de los CAIN^{3,35}, nosotros hemos detectado el ADN viral en el

93% de los CAIN y en el 81% de los CIN III, lográndose identificar el tipo viral en el 82% de los casos positivos. En el 18% restante podría corresponder a infecciones mixtas, variantes u otros tipos virales distintos de los ensayados. Si bien se incluyeron como control los HPV más frecuentes en lesiones severas y malignas, otros tipos virales podrían estar circulando en nuestra población y será necesario incluirlos en ensayos futuros. Los resultados obtenidos confirman la alta frecuencia de los HPV de los tipos 16 y 18 en tumores y lesiones precancerosas severas, siendo la infección por el tipo 16 la de mayor prevalencia. En 2 carcinomas se detectó el HPV 6 (bajo riesgo), aunque no se puede descartar que la biopsia del carcinoma contuviera parte del tejido normal, ya que en la muestra del tejido adyacente, también se encontró el mismo tipo viral. El hallazgo de HPV 6 en carcinomas no es frecuente aunque ha sido documentada su detección y localización del ADN viral en células malignas, mediante técnicas de hibridación *in situ*¹².

Los estudios de transformación han proporcionado evidencias valiosas que apoyan el rol central de los HPV en la etiología del cáncer anogenital; estos estudios han mostrado que los oncogenes ras cooperan con los HPV de alto riesgo en la transformación^{29,30}. La activación de oncogenes ras ocurre por mutaciones en codones específicos de la proteína p21 analizados en este estudio. El 40% de los carcinomas invasores y el 19% de los CIN III analizados mediante PCR-SSCP, mostraron patrones de migración compatibles con mutaciones. Todos los casos de mutaciones en Ha-ras fueron positivos para HPV. En los tejidos normales adyacentes no se detectaron modificaciones genéticas, indicando que la alteración en las lesiones era somática. Todas las mutaciones mostraron un patrón del tipo heterocitoga. La presencia de alelos normales y mutados es difícil de interpretar debido a que no se puede distinguir mediante la metodología aplicada si el hallazgo representa una verdadera heterocitosis o si se trata de un tejido neoplásico con homocitosis para el alelo mutado, contaminado con células normales circundantes. Si fuera un caso de heterocitosis implicaría que en los tejidos neoplásicos

podrían co-expresarse los genes normales y los mutados, aunque como se mencionó previamente las mutaciones en ras tienen carácter dominante.

Las mutaciones en Ha-ras fueron detectadas no sólo en los CAIN sino en lesiones CIN III, aunque la frecuencia de mutaciones en carcinomas fue el doble de la observada en las lesiones premalignas. La detección de mutaciones en lesiones precancerosas ha sido observada en otros tipos de cánceres, como el de colon³⁶. Estos resultados sugieren que la activación mutacional de ras podría ser un evento temprano en el desarrollo temporal de esas lesiones y contribuir directamente en la progresión. Aunque el mecanismo por el cual ras podría conducir a la conversión maligna no está totalmente dilucidado, el mismo podría involucrar la inducción de la inestabilidad genómica y la subsiguiente acumulación de daños genéticos³⁷. Si bien el número de pacientes incluidos en el estudio es acotado, los datos aportados sugerirían que la mutación de Ha-ras junto con la detección de HPV de alto riesgo podría ser un marcador de progresión o riesgo de invasión.

La inactivación de proteínas supresoras como p53 y pRb por la formación de complejos estables con oncoproteínas de HPV es importante en el desarrollo tumoral, pero aún no han sido identificados en forma conclusiva los factores genéticos que predispongan a una mujer infectada al desarrollo del cáncer de cuello uterino. La p53 mutada se la halló en una variedad de tumores, aunque habitualmente en las lesiones iniciales se detecta la proteína normal. Por otro lado, la degradación de p53 mediada por E6 es análoga en sus efectos a una mutación. Nuestros resultados confirman que la presencia de HPV y la alteración en p53 no son eventos carcinogénicos mutuamente excluyentes. En este estudio el 17% de los carcinomas invasores presentaron alteraciones en p53 aunque todas fueron de carácter heterocigota. En los CIN III la frecuencia de mutación fue levemente menor (11%) aunque dentro del mismo orden. Los datos publicados hasta el presente muestran discrepancias en cuanto a la frecuencia de las mutaciones de p53 en neoplasias anogenitales asociadas con HPV; se han hallado en el 0-33%³⁸ de los carcinomas de pene y en el 3-15% de los de cérvix³⁹. En nuestro estudio, la mayoría de los casos (67%) estuvieron asociados con la infección por HPV, pero la frecuencia de mutación también fue menor a la observada en otras neoplasias, por lo que se deduce que estas alteraciones no serían un factor preponderante pero podrían contribuir a la progresión de las lesiones HPV positivas. La mutación heterocigota en sí misma representa un riesgo potencial por la susceptibilidad a la pérdida de la función del alelo normal por una mutación subsiguiente, o por inactivación vía E6, en presencia de infecciones por HPV de alto riesgo. Algunos estudios han aportado evidencias que señalan que los tumores cervicales con p53

mutada podrían tener un comportamiento más agresivo que aquéllos sin esta alteración^{40, 41, 42} y generalmente se hallaron en mujeres de mayor edad⁴³. La baja frecuencia de mutaciones indicaría que la inactivación de p53 normal mediada por HPV probablemente tendría un rol más importante en la patogénesis del cáncer cervical.

La presencia viral *per se* podría contribuir en la inducción de la inestabilidad genética; nuestros resultados confirman la importancia de la infección por HPV y apoyan la hipótesis de un potencial efecto interactivo entre tipos de alto riesgo y las alteraciones genéticas en el desarrollo del cáncer cervical.

Agradecimientos: Agradecemos el apoyo técnico brindado por Mariana Domínguez, Silvia Núñez y Jorge Basiletti. Este trabajo fue subsidiado por la Fundación Mosoteguy y el CONICET (PIA N° 7346) y realizado en el marco del convenio CONACYT (México) CONICET (Argentina).

Bibliografía

- Schiffman MH. New epidemiology of human Papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 1345-7.
- Syrjänen KJ. Human Papillomavirus in genital carcinogenesis. *Transmitted Dis* 1994; 21: 886-9.
- International Agency for Research on Cancer, Lyon. Human Papillomaviruses. Vol 64 Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; 1995.
- zur Hausen H, de Villier E. Human Papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 427-47.
- Band D, Zajchowsky V, Kulesa R, Lager R. Human papillomavirus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 463-8.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiological evidence showing that human Papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Inst* 1993; 85: 958-64.
- van den Brule AJ, Du Maine M, Kenemans P, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Difference in prevalence of human Papillomavirus genotypes in cytologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 48: 404-8.
- Teyssié AR, Alonio LV, Distéfano AL, Picconi MA. Virología. *En: El virus Papiloma en la pareja humana*. Mural J, Teyssié A, Baitrochi C, Alfonsín A (eds). Buenos Aires: Editorial Ascune, 1993, p 25-45.
- Jacobs M, de Roda Husman A, Van den Brule A, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Group specific differentiation between high- and low-risk human Papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotides probes. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 901-5.
- Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, et al. Determinants of genital HPV infection in low risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis* 1993; 20: 274-8.
- Melki R, Khoury B, Catalan F. Nucleic acid spot hybridization with non radioactive labeled probes in screening for human Papillomavirus DNA sequences. *J Med Virol* 1988; 26: 137-43.
- Alonio LV, Dalbert D, Mural J, et al. Different Papillomaviruses in uterine cervical lesions: detection and location by *in situ* hybridization with biotinylated probes.

- The Cervix & Ifigt* 1990; 3: 339-46.
13. Cox JT, Lörinicz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human Papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obst & Gynecol* 1995; 172: 946-54.
 14. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital Papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.
 15. Evander M, Edlund K, Boden E. Comparison of a one step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population based study of human Papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 987-92.
 16. Snijders PJF, van den Brule AJ, Schrijnemakers HJF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human Papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990; 71: 173-81.
 17. Picconi MA, Eiján AM, Distéfano AL, et al. Human Papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: an analysis of primary tumors and lymph nodes. *J Med Virol* 2000; 61: 65-9.
 18. Orita M, Iwahana H, Kanazaga H, Hayashi K. Detection of polymorphism of human DNA by Gel Electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-70.
 19. Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, García-Carrancá A. Association between Papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1227-31.
 20. Distéfano A, Picconi MA, Alonio LV, et al. Persistence of human papillomavirus in cervical lesions after treatment with diathermic large loop excision. *Infect Dis Obst Gynecol* 1998; 6: 214-9.
 21. Howley P. Papillomaviridae and their replication. The viruses and their replication. Howley, P. En Fields Virology, tercera edición. Editado por B. Fields, D. Knip, P. Howley. Editorial Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996 p 2045-70.
 22. Levine A, Momand J, Finlay C. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
 23. Hope Seyler F, Butz K. Molecular mechanism of virus-induced carcinogenesis: the interaction of viral factors with cellular tumor suppressor proteins. *J Mol Med* 1995; 73: 529-38.
 24. Thomas J, Laimins L, Ruesch M. Perturbation of cell cycle control by E6 and E7 oncoproteins of human papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* 1998; 9: 59-63.
 25. Villa L. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. *Adv Cancer Res* 1997; 65: 321-41.
 26. Bosch FX, Manos M, Muñoz N, et al. & IBSCC Study Group. Prevalence of human Papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
 27. Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y. Function of Ras as molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* 1992; 267: 24149-52.
 28. Susuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Detection of ras gene mutation lung cancers by single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reactions products. *Oncogene* 1990; 5: 1037-43.
 29. Storey A, Pim D, Murray A, et al. Comparison of the *in vitro* transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO* 1988; J. 7: 1815-20.
 30. Medina-Martínez O, Vallejo J, Guido MC, García Carrancá A. Ha-ras oncogene induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. *Mol Carcinog* 1997; 19: 83-90.
 31. Gaidano G, Ballerini P, Gong J, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: Association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5413-7.
 32. Wright D, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. Innis M. (ed.) PCR protocols. A guide to methods and applications. Editorial San Diego Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich. 1990, pages 153-8.
 33. Saiki RK, Bugawan TL, Hom GT, Mulis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin HLA-DQalpha DNA with alleles-specific oligonucleotide probes. *Nature* (Lond) 1986; 324: 163-6.
 34. Tonon S, Picconi MA, Zinovich JB, et al. Human Papillomavirus cervical infection and associated risk factors in a region of Argentina with a high incidence of cervical carcinoma. S.A. *Infect Dis Obst Gynecol* 1999; 7: 237-43.
 35. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human Papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
 36. Cho K, Vogestein B. Genetic alterations in adenocarcinoma sequence. *Cancer* 1992; 76: 1927-31.
 37. Denko NC, Giaccia AJ, Stringer JR, Stambrook PJ. The human Ha-ras oncogene induce geneomic instability in murine fibroblast within one cell cycle. *J Acad Natl Sci USA* 1994; 91: 5124-8.
 38. Levi JE, Rahal P, Sarkis SA, Villa LL. Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 76: 779-83.
 39. Munirajan A, Kaman K, Bhuvahamurthy V, et al. The status of human Papillomavirus and tumor suppressor genes p53 and p16 in carcinomas of the uterine cervix from India. *Gynecol Oncol* 1998; 69: 205-9.
 40. Wrede D, Tidy J, Crook T, Lane D, Wousden KH. Expression of Rb and p53 proteins in HPV positive and HPV negative cervical carcinoma cell lines. *Mol Carcinogen* 1991; 4: 171-5.
 41. Tsuda H, Hiroshashis. Frequent occurrence of p53 gene mutation at advanced clinical stage and with aggressive histological phenotypes. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1184-91.
 42. Chen C-A, Chen T-M, Wu C-C, Chang C-F, Hsieh C-Y. Human papillomavirus DNA and p53 status in stage bulky cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120: 678-82.
 43. Nakagawa S, Yoshikawa H, Jimbo H, et al. Elderly Japanese women with cervical carcinoma show higher proportions of both intermediate-risk human papillomavirus types and p53 mutations. *Br J Cancer* 1999; 79: 1139-44.