

VIRUS PAPILOMA HUMANO EN MUJERES QUECHUAS JUJEÑAS CON ALTA
FRECUENCIA DE CANCER DE CUELLO UTERINO
TIPOS VIRALES Y VARIANTES DE HPV16

MARIA ALEJANDRA PICCONI¹, JORGE GRONDA², LIDIA V. ALONIO¹, LUISA L. VILLA³, LAURA SICHERO³,
SERGIO MIRANDA², MARTIN BARCENA², ANGELICA TEYSSIE¹

¹Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas- ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires;
²Centro de Estudios Ginecológicos, San Salvador de Jujuy; ³Departamento Virología, Instituto Ludwig de Investigación sobre
Cáncer, San Pablo, Brasil

Resumen Los virus papiloma humanos (HPV) están asociados etiológicamente con el carcinoma cervical. A fin de evaluar la infección por HPV y su relación con la elevada frecuencia de esta neoplasia en mujeres quechuas jujeñas, se estudiaron 271 muestras de cérvix provenientes de lesiones preneoplásicas y neoplásicas (biopsias) y controles normales (citologías). Se realizó la detección y tipificación viral empleando PCR-RFLP o PCR-hibridación y se analizó la variabilidad de HPV16 en los genes L1 y E6 por PCR-hibridación. Se detectó HPV en el 52% de los controles, 91% de lesiones de bajo grado, 97% de alto grado y 100% de carcinomas invasores, correspondiendo el 55% al HPV16. Las variantes de HPV16 fueron predominantemente europeas, en su mayoría no prototípicas. La alta tasa de infección con virus de alto riesgo y la gran proporción de variantes no prototípicas de HPV16 asociadas con un mayor potencial oncogénico podrían explicar, en parte, la elevada frecuencia de cáncer cervical en esta población. Los datos obtenidos podrían contribuir al control de la enfermedad y a la formulación de vacunas.

Palabras clave: cáncer de cuello uterino, virus papiloma humano, quechuas, variantes de HPV 16

Abstract *Human papilloma virus in Quechua women from Jujuy with high frequency of cervical carcinoma. Viral types and HPV-16 variants.* Human Papillomaviruses (HPVs) are etiologically associated to cervical carcinoma. In order to evaluate HPV infection and its relationship with the high frequency of this neoplasia in Quechua women from Jujuy (Argentina), 271 cervical samples from preneoplastic and neoplastic lesions (biopsies) and normal controls (cytologies) were studied. Detection and typing were performed using PCR-RFLP or PCR-hybridization and the HPV-16 variability in L1 and E6 genes (by PCR-hybridization) was analysed. HPV was detected in 52% of controls, 91% of low-grade lesions, 97% of high-grade lesions and 100% of invasive carcinomas, corresponding 55% to HPV-16. HPV-16 European variants were predominant, most of them being non-prototypic strains. The high frequency of high risk infection types and the raised proportion of HPV-16 non-prototypic variants related to a greater oncogenic potential could explain, in part, the high cervical cancer frequency of this native population. These data may contribute to disease control and vaccinal formulation.

Key words: cervical carcinoma, human papillomavirus, Quechuas, HPV- 16 variants

El gran interés por los virus papiloma humanos (HPV) surgió a través del conocimiento de su potencial oncogénico y su asociación con tumores humanos, en especial, con el cáncer de cérvix¹⁻⁵.

Este virus epiteliotropo posee un genoma a ADN, con tres regiones: la de control (LCR), la temprana (E) y la tardía (L). LCR contiene secuencias promotoras y

represoras de la expresión y replicación viral. La región E codifica las proteínas involucradas en la transcripción, la replicación del ADN y la proliferación celular, incluyendo las oncoproteínas E6 y E7. La región L comprende los genes L1 y L2 que codifican las proteínas estructurales⁶. Se clasifican en más de 85 tipos virales sobre la base de la homología del ADN; casi la mitad se detectan en el tracto anogenital. Se dividen en tipos de bajo riesgo (HPV 6, 11 y 42), comúnmente encontrados en lesiones benignas y tipos de alto riesgo (principalmente HPV 16, 18, 31, 33 y 45) asociados etiológicamente con lesiones preneoplásicas y carcinomas⁷. La Organización Mundial de la Salud a través de la Agencia Internacional

Recibido: 28-XI-2001

Aceptado: 18-XII-2001

Dirección postal: Dra. María Alejandra Picconi. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sársfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.
Fax: (54-11) 4302-5064 e-mail: oncovir@sudnet.com.ar

de Investigación sobre Cáncer (IARC, Lyon, Francia) ha reconocido que existen evidencias epidemiológicas y experimentales suficientes para considerar que los HPV de alto riesgo, en particular los tipos 16 y 18 son carcinogénicos en humanos¹.

En los últimos años se han descrito variantes intratípicas que poseen una divergencia no superior al 5%². Los estudios de variabilidad genética se iniciaron con HPV16 por ser el tipo viral más frecuente a nivel mundial^{8,9}. Se compararon las secuencias nucleotídicas de un fragmento de 364 pb de LCR provenientes de aislamientos de distintos continentes, con el virus referencial o prototipo (primer HPV16 secuenciado)¹⁰. El árbol filogenético reveló cinco ramas: africanas (Af-1 y Af-2), asiático-americana (AA), europea (E) y asiática (As); el virus *prototipo* quedó incluido dentro de la rama E^{9,11}.

Las implicancias patogénicas de la variabilidad intratípica no han sido aún esclarecidas¹². El estudio de las regiones L1 y E6 ha despertado interés ya que diferencias en su secuencia nucleotídica podrían vincularse con cambios en la respuesta inmune del hospedador y en el potencial oncogénico, respectivamente¹³⁻¹⁶.

El cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres de los países industrializados y la primera en algunos países o regiones en vías de desarrollo, registrándose en el mundo cientos de muertes diarias por esta enfermedad^{1,5,17,18}. En Argentina, esta neoplasia ocupa el segundo lugar después del cáncer de mama¹⁹; sin embargo, en provincias como Jujuy, el cáncer cervical es la neoplasia más común en las mujeres quechuas de la Quebrada y la Puna (Dr. Jorge Gronda, comunicación personal).

El objetivo de este trabajo fue examinar el rol del HPV no sólo desde la diversidad de tipos virales, sino también considerar la posible existencia de variantes de HPV 16 características y/o predominantes que pudieran constituir un factor de riesgo asociado con la alta incidencia de cáncer de cérvix en mujeres quechuas de la Puna y Quebrada jujeñas.

Materiales y métodos

Pacientes

Se incluyeron 271 mujeres quechuas, de las cuales 99 presentaban lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), 40 lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL), 22 cánceres invasores de cérvix (CAIN) y 110 eran controles con citología normal. Todas ellas procedían de las regiones de la Puna y Quebrada de Humahuaca, Provincia de Jujuy (Argentina). El primer contacto con las pacientes estuvo a cargo de mujeres de la misma comunidad, pertenecientes a la Asociación *Warmi Sayajunqo* (Mujeres Perseverantes), quienes fueron previamente capacitadas como agentes sanitarios, salvando así las barreras culturales. Todas las pacientes dieron el consentimiento para su inclusión en este estudio.

Estudios clínicos

Las mujeres fueron citadas para el examen clínico-ginecológico en el lugar que por su proximidad era más accesible a la mayor cantidad de pobladoras, dentro de su hábitat natural (zona rural). Con este fin se adaptaron como consultorios ginecológicos, aulas de escuela, albergues, puestos sanitarios, etc; este examen incluyó una colposcopia y la toma de células cervicales. El diagnóstico citológico se efectuó mediante la coloración de Papanicolaou (Pap)²⁰, aplicando el sistema de clasificación Bethesda²¹. Cuando se detectaban imágenes colposcópicas sospechosas se efectuaba una biopsia para el examen histológico. Debido a las precarias condiciones de infraestructura en las que se realizó el examen médico, y a las limitaciones en la comunicación esperables por las diferencias culturales, no fue posible confeccionar una ficha epidemiológica convencional, registrándose sólo datos mínimos de la paciente, tales como nombre, edad, número de embarazos y de hijos y si se había realizado algún Pap previo.

Estudios virológicos

Para los estudios virológicos, se tomó una única muestra por paciente, durante la primera entrevista. Las muestras de células descamadas de cérvix fueron recogidas en buffer fosfato salino (PBS) estéril, pH 7.4 y conservadas a 5-10 °C hasta su envío al laboratorio, dentro de las 72 horas de recogidas. En el caso de las biopsias de lesiones se remitieron los tacos con el tejido fijado e incluido en parafina.

Extracción y purificación de ácidos nucleicos: Las células cérvico-vaginales fueron centrifugadas y lavadas con PBS. El ADN fue extraído y purificado según fue previamente descrito²². Brevemente, las células fueron sometidas a digestión con proteinasa K y extracción con fenol-cloroformo. Finalmente, el ADN fue precipitado con etanol absoluto, resuspendido en 50 µl de buffer TE estéril (Tris ClH 10⁻² M, EDTA 10⁻³ M, pH 8) y congelado a -20°C hasta su procesamiento. En los cortes histológicos de las biopsias, el ADN fue extraído y purificado en forma similar a lo descrito para las células, excepto que el tejido fue previamente desparafinado por tratamiento con n-octano y posteriores lavados con etanol absoluto y etanol 70%²³.

Control de calidad de los ADN templado: La integridad del ADN obtenido fue verificada mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 268 pares de bases (pb) del gen de la β-globina humana, empleando los cebadores GH20 y PCO4²⁴.

Detección y tipificación de HPV: en primera instancia, se realizó la amplificación por PCR genérica usando los cebadores consenso MY9,11 que amplifican un fragmento de 450 pb del gen L1²⁵; la tipificación se efectuó por restricción enzimática (RFLP) de los amplicones obtenidos empleando las endonucleasas BamHI, Ddel, HaeIII, HinfI, PstI, RsaI y Sau3aI en forma separada²⁶. Cuando esta PCR resultó negativa o mostró productos inespecíficos que impedían su posterior tipificación por RFLP, las muestras fueron amplificadas usando los cebadores genéricos Gp 5+, 6+ que producen un fragmento de 140 pb dentro de la misma región²⁷; en este caso, la tipificación posterior se realizó por hibridación en *dot blot* con oligosondas de los tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33, marcadas con biotina y la detección de los híbridos se llevó a cabo por quimioluminiscencia.

Análisis de la variabilidad genética de HPV16: En las muestras que resultaron positivas para HPV16, se realizó el análisis de variabilidad genética en fragmentos correspondientes a las regiones E6 y L1. La identificación y clasificación de variantes se realizó aplicando un método que permite detectar variantes ya descritas en las regiones L1 y E6, por PCR e

hibridación en 6 y 13 posiciones nucleotídicas, respectivamente²⁸. Brevemente, el producto amplificado por PCR anidada (fragmento de 422 pb para L1 y 584 pb para E6) fue hibridado en dot blot usando oligosondas biotiniladas variante-específicas; el revelado de los híbridos se realizó por quimioluminiscencia. Los datos de los nucleótidos obtenidos en cada posición, se compararon con el patrón referencial, permitiendo la identificación de variantes y su ubicación filogenética.

Resultados

Pacientes

Las mujeres tenían edades comprendidas entre 14 y 64 años (media: 35 años); el 57% de las pacientes tenía más de 30 años. El promedio de gestación fue de 7 embarazos y el de paridad de 6 hijos. El índice de abortos fue de 0.6% y el de hijos muertos en edad perinatal de 4.5%. El 85% de las mujeres se efectuaba un examen ginecológico por primera vez en el momento de la toma para este estudio.

Detección y tipificación de HPV

De las 271 muestras cervicales procesadas, se pudo amplificar el gen de la β -globina humana en 254 de ellas (94%), correspondiendo a 95 LSIL, 35 HSIL, 16 CAIN y 108 controles normales (muestras aptas para PCR). El HPV fue detectado en el 91% de las lesiones LSIL, 97% de las HSIL, 100% de los CAIN y 52% de los controles normales (Tabla 1).

Las Figs. 1 y 2 muestran la tipificación de HPV por PCR - RFLP y PCR- hibridación en dot blot, respectivamente. El HPV16 fue el tipo más frecuente, alcanzando el 55% (106/193) del total de casos positivos, incluyendo aquéllos en los que estaba coinfectando con otros tipos.

Los virus de bajo riesgo sólo fueron detectados en muestras de controles normales y LSIL, siendo el más frecuente el HPV11 (Tabla 1). En el 13% (26/193) de las muestras positivas no pudo determinarse el tipo viral, ya que no hibridaron con ninguna de las sondas ensayadas. Dentro de los casos positivos, hubo un total de 27% (53/193) de infecciones múltiples con virus de alto y bajo riesgo.

Análisis de la variabilidad genética de HPV16

En las 106 muestras positivas para HPV16, se realizó el análisis de variabilidad genética en los fragmentos de E6 y L1. El análisis de E6 sólo pudo realizarse en 47 muestras de las 106 procesadas (Fig. 3A). El análisis de trece posiciones de este gen mostró un 83% de virus europeos (39/47); entre ellos se identificaron 20 casos de variante 350G (G en lugar de T en el nucleótido 350) (Fig. 3B), 2 casos de multivariante C109G (C en lugar de T en el nt. 109 y también G en lugar de T en el nt. 350) y 3 casos de multivariante G131G (G en lugar de A en el nt. 131 y también G en lugar de T en el nt. 350). Los virus no europeos (8/47) correspondieron a 6 variantes AA, 1 NA-1 y 1 As (Fig. 4A). En total, en esta región se detectó un 70% de virus *no prototípicos* (33/47), correspondiendo el 94% (31/33) a muestras provenientes de lesiones, el 48% de ellas (15/31) eran casos severos (HSIL y CAIN) (Tabla 2).

Para el análisis de L1, en las 106 muestras amplificadas se obtuvo el fragmento del tamaño esperado (422 pb) (Fig. 5A). La Fig. 5B muestra los resultados de la hibridación en dot blot con las oligosondas 6695A/C. A través de las seis posiciones nucleotídicas analizadas se observó un amplio predominio de las variantes europeas (90%) (Fig. 4B).

TABLA 1.— Detección y tipificación de HPV en muestras de cuello uterino. La tabla reúne los resultados obtenidos mediante la aplicación de las técnicas PCR-RFLP y PCR-hibridación en dot blot.

Diagnóstico Citohistológico	n	Tipos de bajo riesgo				Tipos de alto riesgo				Coinfección tipos de alto y bajo riesgo n (%)	Tipo no Determinado* n (%)	Positividad Total n (%)
		6	11	70	16	18	31	33	45			
Normal	108 (100%)	3	9	-	16	1	1	-	-	19 (18)	7 (6)	56 (52)
LSIL	95 (100%)	12	15	1	17	6	1			21 (22)	14 (15)	87 (91)
HSIL	35 (100%)	-	-	-	16	3	2	1	1	11 (31)	0 (0)	34 (97)
CAIN	16 (100%)				6	1	2	1	1	2 (13)	3 (19)	16 (100)
Total	254 (100%)	15	24	1	55	11	5	3	2	53 (21)	26 (10)	193 (76)

* Muestras HPV positivas cuyo tipo viral no pudo ser determinado debido a que no hibridaron con ninguna de las sondas ensayadas.

LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado; CAIN: carcinoma invasor.

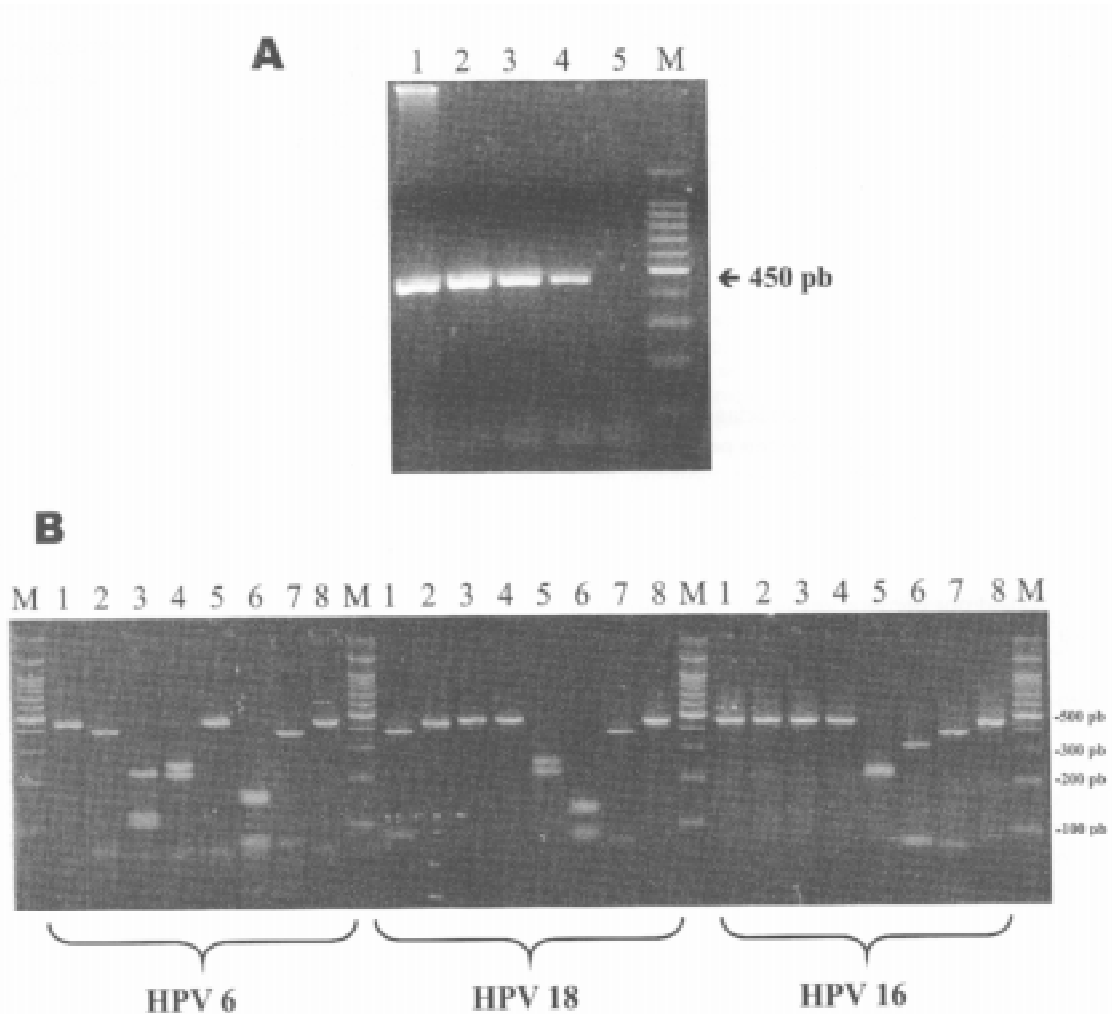


Fig. 1.— Detección y tipificación de HPV por PCR-RFLP: A. PCR genérica: los ADN extraídos y purificados a partir de las muestras de cérvix, fueron amplificados con los cebadores MY 9,11 y luego evaluados mediante electroforesis en agarosa al 2% (80V, 1 hora). Calles: 1-3: muestras positivas; 4: control positivo (ADN células CaSki); 5: control negativo. M: marcador de peso molecular (escalera de a 100 pb). Tamaño del fragmento amplificado: 450 pb. B. Tipificación por RFLP: alícuotas de los productos amplificados fueron digeridas en forma separada con 7 enzimas de restricción y sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 3% (80V., 3 horas). El gel fue teñido con bromuro de etidio y analizado por transiluminación ultravioleta. Calles: 1-7 productos de restricción con las enzimas BamH I, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I y Sau3A I respectivamente; 8: producto sin cortar (450 pb). M: marcador de peso molecular (escalera de a 100 pb). Las llaves indican el tipo viral identificado en base al patrón de restricción obtenido para cada muestra.

Comparación de los resultados obtenidos por el análisis simultáneo de distintas regiones genómicas en una misma muestra

Del total de 106 muestras HPV 16 positivas, hubo 47 que pudieron ser analizadas simultáneamente en las regiones L1 y E6. La Tabla 3 muestra en forma comparativa los cambios nucleotídicos hallados en cada caso; puede observarse la plena coincidencia en la clasificación de la rama filogenética obtenida para una determinada muestra, mediante el análisis de ambas regiones separadamente. En las 55 muestras restantes, sólo fue posible analizar la región L1.

En ninguna de las tres regiones estudiadas se detectaron coinfecciones con distintas variantes.

Discusión

La fuerte y consistente relación etiológica demostrada entre determinados tipos de HPV y el cáncer anogenital impulsó el desarrollo de diversas técnicas moleculares de tipificación, que incluyen hibridaciones (en membrana o *in situ*), con y sin previa amplificación génica por PCR^{29, 15}. En este estudio, aplicando PCR-RFLP y PCR-dot blot en forma complementaria, fue posible detectar

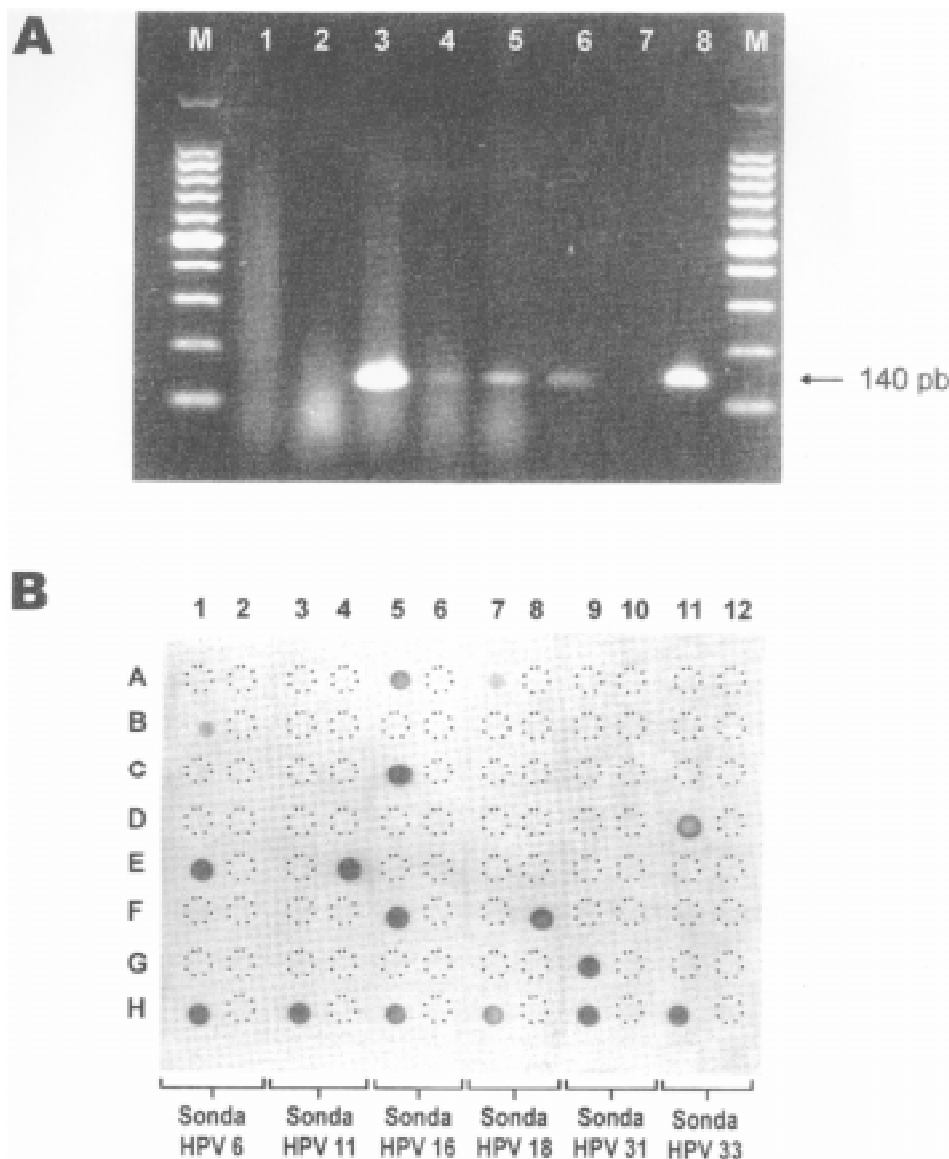


Fig. 2.- Detección y tipificación de HPV por PCR-hibridación en dot blot. A. PCR genérica: los ADN extraídos y purificados a partir de las muestras de cérvix fueron amplificados con los cebadores Gp 5+, 6+ y luego evaluados mediante electroforesis en agarosa al 2% (80 V, 30 minutos). Calles: 3-6 muestras positivas; calles 1 y 2: muestras negativas; 7: control negativo y 8: control positivo. M: marcador de peso molecular (escalera de a 100 pb). Tamaño del fragmento amplificado: 140 pb. B. Tipificación por hibridación en *dot blot*: alícuotas de los productos amplificados fueron desnaturalizadas y aplicadas por sextuplicado sobre membranas de nylon. Las membranas fueron hibridadas con cada una de las seis oligosondas biotiniladas según se indica en la figura y reveladas por quimioluminiscencia. Filas A muestra positiva para HPV 16 y 18; B: positiva para HPV 6; C: positiva para HPV 16; D: positiva para HPV 33; E: positiva para HPV 6 y 11; F: positiva para HPV 16 y 18; G: positiva para HPV 31 y H1, 3, 5, 7, 9 y 11: controles positivos para las respectivas sondas; H2, 4, 6, 8, 10 y 12: controles negativos.

HPV en el 76% de las muestras analizadas. Los tipos virales hallados en estas indígenas y su distribución coinciden, en rasgos generales, con los datos informados en el principal estudio internacional⁸ que señala a los tipos 16, 18, 31, 33 y 45 como los virus más frecuentes

en las lesiones preneoplásicas severas y cánceres. Se confirmó que a medida que aumenta el grado de severidad de la lesión, se incrementa el porcentaje de los HPV de alto riesgo en detrimento de los de bajo riesgo, que desaparecen.

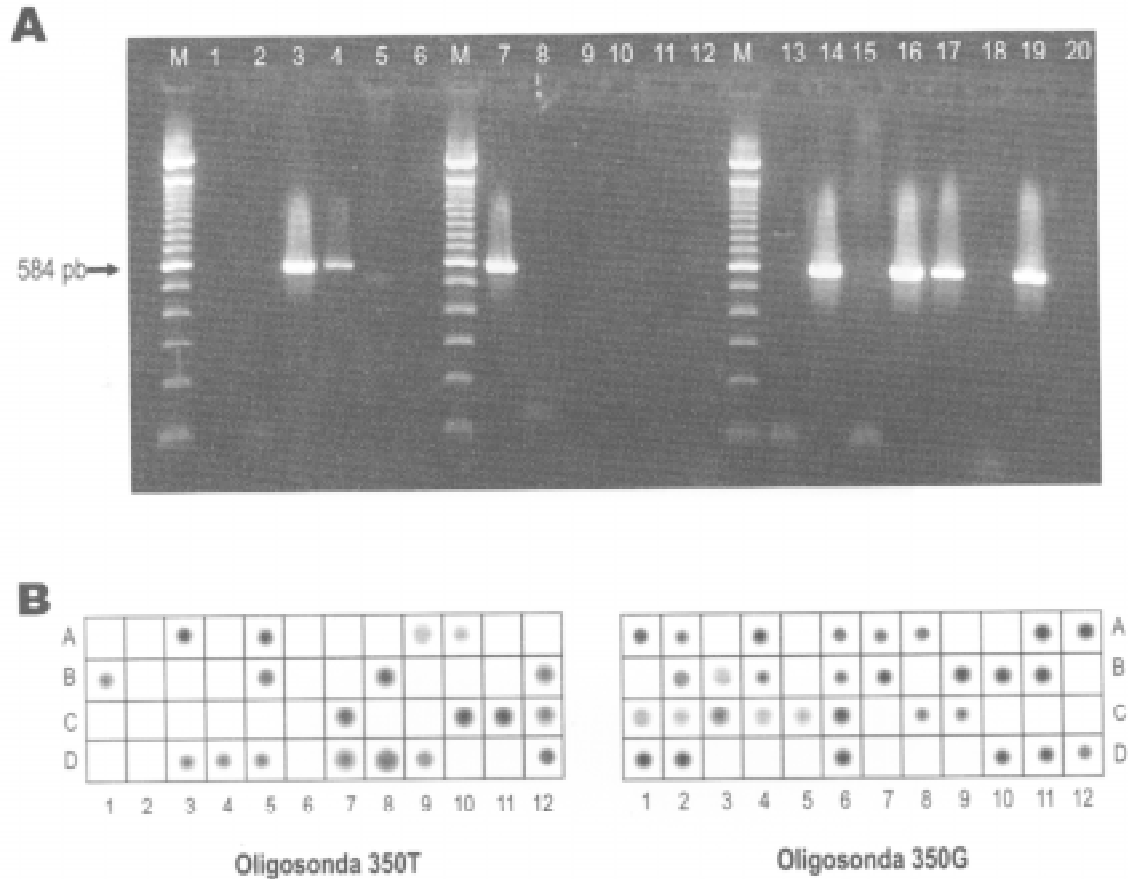


Fig. 3.— Análisis de variabilidad en el gen E6. A. PCR anidada: electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados. Calles: 3, 4, 7, 14, 16 y 17: muestras que rindieron el fragmento esperado (584 pb); 1, 2, 5, 8-12, 13, 15 y 18: muestras no amplificables; 6 y 20: controles negativos; 19: control positivo. M: marcador de peso molecular (escala de a 100 pb). B. Hibridación en *dot blot*: pareja de películas expuestas a las membranas hibridadas con las oligosondas que permiten discriminar la presencia de T o G en la posición nucleotídica 350 del gen E6. Filas A,B,C y D1-6: muestras; D7: control europea (prototipo), D8: control africana-1, D9: control africana-2, D10: control norteamericana-1, D11: control asiático-americana, D12: control positivo de quimioluminiscencia.

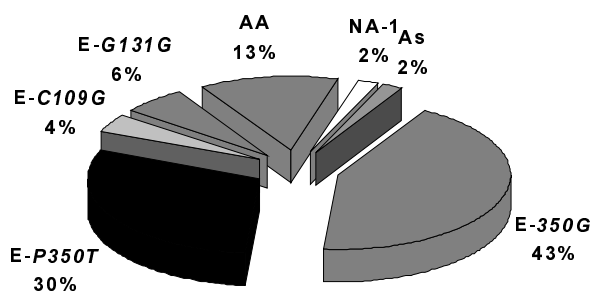
TABLA 2.— Variantes de HPV16 en la región E6 detectadas en las lesiones de cérvix de distinta severidad.

Diagnóstico Citohistológico	E-P350T	E-350G	E-C109G	E-G131G	NA-1	AA	As
Normal n= 7	5	2	-	-	-	-	-
LSIL n= 22	6	10	1	2	-	2	1
HSIL n= 13	2	4	1	1	1	4	-
CAIN n= 5	1	4	-	-	-	-	-
Total n= 47 (100%)	14 (30%)	20 (43%)	2 (4%)	3 (6%)	1 (2%)	6 (13%)	1 (2%)

LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado; CAIN: carcinoma invasor.

E: europea (P: prototipo); AA: asiático- americana; NA-1: norteamericana- 1; As: asiática.

A. Variantes en E6 (n=47)



B. Variantes en L1 (n=106)

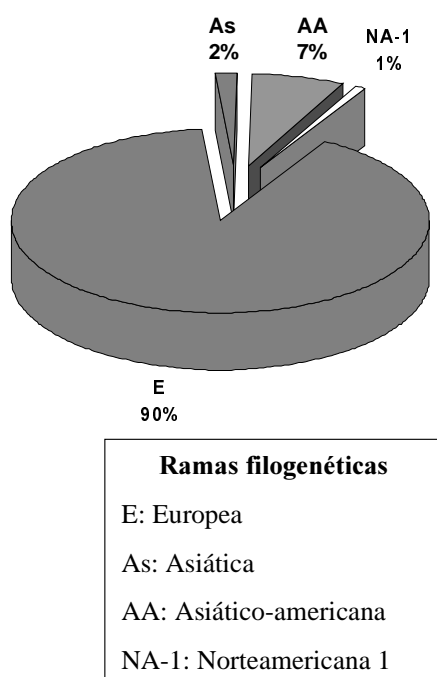


Fig. 4.- Distribución de variantes de HPV16.

El 13% de las muestras positivas cuyo tipo viral quedó indeterminado podría corresponder a HPV conocidos, pero distintos a los ensayados; también podría tratarse de virus aún no identificados. No se pudieron realizar estudios adicionales debido al escaso volumen de las muestras.

Detectamos un 27% de mujeres con coinfecciones de virus de alto y bajo riesgo. Las infecciones múltiples son consideradas un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones preneoplásicas cervicales³¹⁻³³. El HPV16 fue el tipo de alto riesgo más frecuentemente hallado, aun

en coinfecciones, lo cual coincide con otros estudios^{1, 5, 8}. Los tipos de bajo riesgo que se detectaron en HSIL y CAIN siempre estaban coinfectando con un tipo de alto riesgo, corroborando su bajo potencial oncogénico. Por otro lado, ha sido observado que mujeres mayores de 30 años, que han adquirido una infección múltiple en la que participa al menos un virus de alto riesgo, tendrían mayor probabilidad de desarrollar una infección persistente³⁴⁻³⁶. Las coinfecciones podrían ser el resultado de una inmunidad deprimida que no resuelve las infecciones, superponiéndolas. En las pacientes estudiadas, estas coinfecciones, además, podrían estar asociadas con malnutrición y hábitos sexuales, incluyendo el alto número de parejas, el inicio temprano de las relaciones sexuales y la falta de educación sexual. Las coinfecciones demostradas en la población estudiada podrían aumentar el riesgo de persistencia viral y progresión maligna de las lesiones.

La alta prevalencia de HPV detectada en mujeres citológicamente normales (52%) estaría indicando una elevada circulación del virus en esta población, correspondiendo más de la mitad de los casos (66%) a infecciones con al menos un tipo de alto riesgo. Es probable que muchas de estas infecciones, especialmente en las más jóvenes, sean transitorias y se resuelvan en forma espontánea sin consecuencias oncopatogénicas. Dado que más de la mitad de estas mujeres (57%) tenía por encima de 30 años, es probable que algunas de estas infecciones puedan ser persistentes. La persistencia viral ha sido estimada en un 5-10% en mujeres mayores de 30-35 años^{35, 37-39}, asociada a virus preferentemente de alto riesgo. En estudios prospectivos realizados sobre mujeres con citología cervical normal, se demostró que aquellas que presentaban HPV 16 o 18 tenían 10 o más veces mayor riesgo de progresar a carcinoma *in situ* en los próximos dos años de seguimiento^{38, 40}. En la población estudiada, la alta frecuencia de la infección constituiría un factor de riesgo de cáncer de cérvix.

El análisis de la variabilidad genética de HPV16 se realizó en las regiones genómicas E6 y L1 a partir de aislamientos obtenidos en muestras de cuello uterino.

En la región E6, hemos observado un marcado predominio de virus europeos (83%) y dentro de ellos la variante 350G fue la más frecuente. Esta variante es también conocida como L83V, en referencia al correspondiente cambio de aminoácido número 83, leucina por valina^{16, 28}. En la oncoproteína E6 prototípica, esta sustitución afectaría la presentación antigénica y la inmunogenicidad. Estudios *in vitro* han sugerido que esta mutación aumentaría la capacidad transformante del virus⁴¹. La detección de la variante 350G ha sido asociada con la persistencia viral y la progresión a carcinoma por lo que se la consideraría un factor de riesgo de cáncer⁴², aunque el tema genera aún controversias⁴³.

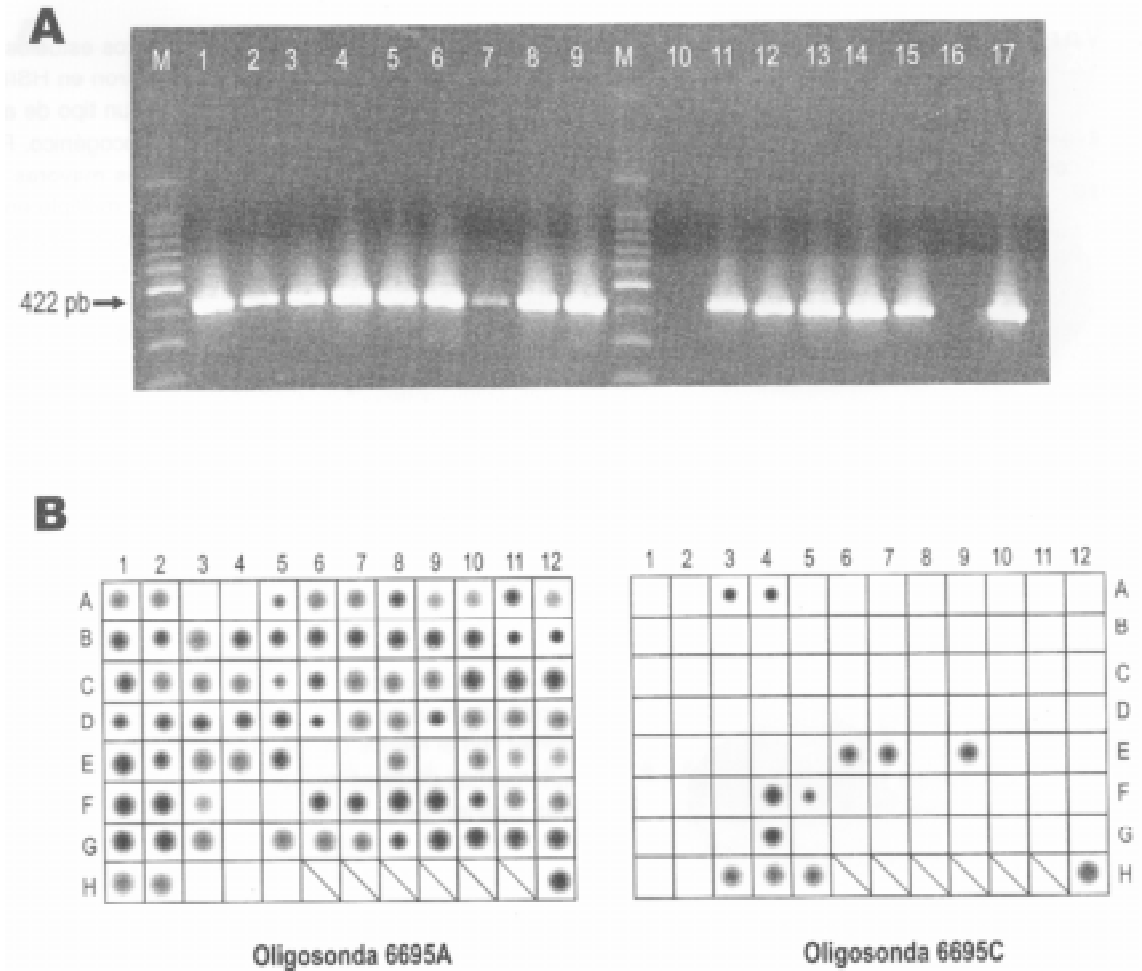


Fig. 5.— Análisis de variabilidad en el gen L1. A. PCR anidada: electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados. Calles 1-9 y 11-15: muestras que generaron el fragmento esperado (422 pb); 10 y 16: controles negativos; 17: control positivo. M: marcador de peso molecular (escala de a 100 pb). B. Hibridación en *dot blot*: pareja de películas expuestas a las membranas hibridadas con las oligosondas que permiten diferenciar la presencia de A o C en la posición nucleotídica 6695 del gen L1. Filas A-G: muestras. Fila H: controles de variantes; 1: europea; 2: africana-1; 3: africana-2; 4: norteamericana-1, 5: asiático-americana y 12: control de quimioluminiscencia. Las líneas cruzadas indican ausencia de muestras.

TABLA 3.— Variaciones de la secuencia nucleotídica halladas en las muestras analizadas en los genes L1 y E6

	L1						E6																			
n	6	6	6	6	6	6	6	7	8	8	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	4	5	VARIANTE
	9	2	0	5	6	9	0	3	3	4	4	7	8	8	8	8	3	5	0	3					(Clase/Subclase)	
	5	1	3	4	2	4	9	1	2	3	5	8	3	6	9	5	0	3	2						Prototipo	
	A	G	A	C	T	G	T	A	G	C	G	T	T	T	A	C	T	A	A							
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E-P350T	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	E-350G	
2	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	E-C109G	
3	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	E-G131G	
1	C	A	-	T	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	A	G	T	G	-	-	-	-	-	-	NA-1	
6	C	A	T	T	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	A	G	T	G	-	-	G	-	-	-	AA	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	As	

E: europea (P: prototipo); AA: asiático-americana; NA-1: norteamericana- 1; As: asiática.

Otra de las variantes en E6, la *G131*, fue identificada en el 6% de las muestras analizadas. La sustitución en el nucleótido 131 se corresponde con el cambio de aminoácido número 10, arginina por glicina, por lo cual es también conocida como *R10G*. Fue originalmente hallada en un carcinoma de cérvix y se la ha asociado con lesiones severas, de mal pronóstico; se ha planteado que esta variante presentaría una mayor capacidad de evasión del sistema inmune, vinculada con la presencia de determinados haplotipos del sistema HLA⁴⁴.

En el 4% de las muestras analizadas se identificó la variante *C109* cuyo codón no genera un cambio aminoacídico (codón sinónimo). Tanto en los casos de la variante *G131* como en *C109*, también se encontraba presente la mutación *350G*, lo cual define a dos multivariantes: *G131G* y *C109G*. Debido a la metodología empleada, no puede descartarse que se trate de una coinfección con dos variantes, aunque este hallazgo es poco frecuente. Las multivariantes encontradas han sido descritas en otros estudios de carcinomas de cérvix y lesiones precursoras^{16, 28}.

En este estudio, el 64% de los virus europeos identificados presentó la mutación *350G* (incluyendo los 5 casos de multivariantes con cambios adicionales en 109 y 131). Nuestro análisis en E6 mostró un franco predominio (70%) de virus no prototípicos (E, incluyendo la variante *350G*; AA; NA-1 y As), detectándose la mayoría de ellos (94%) en muestras provenientes de lesiones (no eran controles normales) y casi la mitad de ellos en lesiones de alto grado. Diversas publicaciones apoyan una mayor asociación de los virus no prototípicos con el desarrollo de lesiones severas y cánceres cervicales^{45, 46}; resultados similares fueron hallados en carcinomas anales en donde las variantes no prototípicas fueron 3 veces más prevalentes que el HPV 16 prototipo⁴⁷. Si bien este estudio no es prospectivo e incluye un número limitado de muestras, la elevada proporción de variantes de E6 podría estar asociada con la alta frecuencia de cáncer de cuello uterino observada en la población quechua considerada.

A fin de establecer la procedencia de los HPV 16 circulantes, se analizaron seis posiciones nucleotídicas del

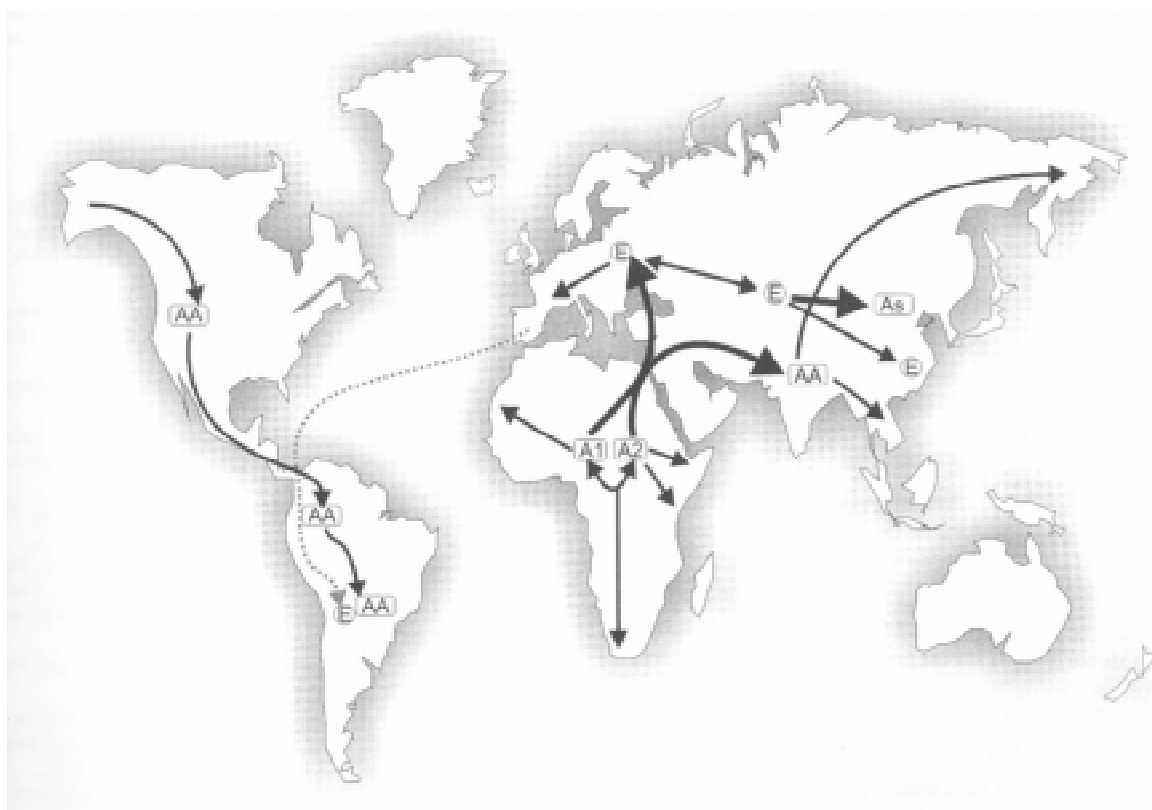


Fig. 6.— Evolución y distribución de las variantes de HPV16 en el mundo: las flechas negras señalan la dispersión de variantes de HPV16 en tiempos prehistóricos, estimada mediante el análisis filogenético de LCR^{51, 52}. Las flechas más gruesas representan los cambios mutacionales que habrían dado lugar a las cinco principales ramas de divergencia intratípica (E: europea, AA: asiático-americana, As: asiática, Af 1-2: africanas 1 y 2). La flecha gris punteada indica el probable origen de las variantes europeas predominantes en las mujeres quechuas estudiadas, que habrían ingresado a través de la colonización española.

gen L1 que permiten distinguir cepas pertenecientes a las cuatro principales clases o ramas filogenéticas: E, AA, Af-1, Af-2. La mayoría de las variantes fueron identificadas como europeas; sin embargo la estrategia metodológica usada no permitió discriminar cambios respecto del virus prototipo, por lo que se desconoce si hubo modificaciones en otras posiciones que pudiesen haber generado variantes. Las distintas variantes de HPV 16 presentarían sero-reactividad cruzada⁴⁸, aunque no hay suficientes estudios que lo confirmen. Dado que los epitopes de las proteínas de la cápside inducen anticuerpos neutralizantes, la variabilidad genética de L1 podría modificar la respuesta inmune. Una cuestión importante será demostrar cambios de secuencia que puedan implicar la alteración de propiedades funcionales o antigénicas de proteínas virales específicas, que permitan discriminar variantes con distinto potencial infeccioso, así como en la definición de los epitopes relevantes para el diseño de vacunas⁵⁰.

Considerando el origen de HPV16 en África, las variantes europeas podrían haber evolucionado a partir de los humanos infectados con HPV16, dispersados fuera de África (Fig. 6). Es probable que las cepas europeas se hayan generado fuera de África hace mucho tiempo, ya que la variante G-1 (mutada en el nt. 7521) fue aparentemente el genoma ancestral de la rama As, la cual podría haber demorado cerca de 50000 años en evolucionar^{51, 52}. Los virus AA se distribuyen en amerindios y en una minoría de asiáticos. Ho y col. han especulado que las variantes AA en América estarían asociadas a etnias nativas, cuyos ancestros habrían llegado desde Asia cruzando el Estrecho de Bhering, probablemente 24000 años atrás^{9, 51, 53} (Fig. 6). La baja prevalencia de las variantes AA hallada en este estudio haría suponer que hubo una diseminación limitada de la infección por HPV en los quechuas durante la época prehispánica; la fuerte irrupción del virus durante la colonización española con el ingreso de variantes específicas de HPV16, explicaría el predominio actual de las cepas europeas en esta comunidad nativa americana.

La Organización Mundial de la Salud ha recomendado profundizar y ampliar los estudios de prevalencia de los diferentes tipos de HPV, especialmente en poblaciones con alto riesgo de cáncer cervical (países o regiones en desarrollo) a fin de contribuir en la definición de una futura fórmula vacunal^{54, 55}. Este estudio aporta los primeros datos sobre la diversidad de tipos de HPV y variantes de HPV16 en muestras de cérvix de una población aborigen del noroeste argentino. Los tipos virales hallados coinciden, en general, con los virus más prevalentes a nivel mundial, por lo que, en principio, una vacuna polivalente que estuviera basada en estos virus sería efectiva en la comunidad quechua. La alta frecuencia de variantes de HPV16 demostrada constituye, sin embargo, un llamado de atención ya que su significado

patogénico y sus posibles efectos sobre la respuesta inmune no están aún claramente dilucidados.

Este trabajo proporciona evidencias acerca de factores virales que podrían explicar la alta frecuencia de cáncer de cérvix en las quechuas; entre ellos, la alta tasa de infección con virus de alto riesgo y coinfecciones, además de una elevada proporción de variantes de HPV16 circulantes asociadas con un mayor potencial oncogénico. Por otro lado, debe considerarse la influencia en esta neoplasia, de otros factores ya conocidos como el bajo nivel económico-educacional y la falta de acceso a los sistemas de salud que harían a estas mujeres más vulnerables. El estudio además de ser un aporte a la epidemiología molecular del HPV en Argentina, ha promovido el interés de la comunidad quechua local, que se ha traducido en la implementación de controles ginecológicos periódicos que esperamos puedan ser sostenidos en el tiempo.

Agradecimientos: Los autores agradecen la valiosa asistencia técnica de J. V. González y J. A. Basiletti y la generosa colaboración de R. Andrada de Quispe y demás mujeres de la Asociación *Warmi Sayajunqo*, quienes desde su perseverancia ejemplar lideran la lucha contra el cáncer de cuello uterino en esta comunidad. Este trabajo fue apoyado en parte por el CONICET, la Fundación Mosoteguy y el convenio colaborativo entre los Institutos Malbrán (Buenos Aires, Argentina) y Ludwig (San Pablo, Brasil).

Bibliografía

1. IARC Working Group. Human Papillomaviruses. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer (IARC)-World Health Organization (WHO), Vol 64, 1995.
2. zur Hausen H. Papillomavirus infection- a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-F78.
3. Villa LL. Human papillomavirus and cervical cancer. *Advances Cancer Res* 1997; 71: 321-41.
4. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM *et al*. Human papilloma virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
5. Muñoz N. Human papillomavirus and cervical cancer. The epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19: 1-5.
6. Howley P. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: Fields B, Knipe D, Howley P (eds). *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p 2045-70.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Phys* 1999; 11: 581-7.
8. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N *et al*. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
9. Ho L, Chan S-Y, Chow V *et al*. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1765-72.
10. Seedorf K, Krämer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 1985; 145: 181-5.

11. Chan S-Y, Ho L, Ong Ch-K *et al.* Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992; 66: 2057-66.
12. Zehbe I, Tommasino M. The biological significance of human papillomavirus type 16 variants for the development of cervical cancer. *Papillomavirus Rep* 1999; 10: 105-16.
13. Lizano M, García Carrancá A. Las variantes moleculares de papiloma virus humanos tipo 16, 18 y 45 en tumores del cuello uterino, en México. *Gac Méd Méx* 1996; 133: 43-8.
14. Picconi MA, Alonio LV, García Carrancá A *et al.* Variantes moleculares de virus papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cérvix. *Medicina* 2000; 60: 889-94.
15. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA *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.
16. Yamada T, Manos MM, Peto J *et al.* Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71: 2463-72.
17. Pan American Health Organization (PAHO). Cancer of the uterine cervix. Bulletin of the PAHO (special issue) 1996; 30 (4).
18. Sherris JD. Cervical cancer prevention: a strategic opportunity to improve women's reproductive health. *Int Family Planning Persp* 1999; 25: 556-7.
19. Programa Nacional de Estadísticas de Salud. Estadísticas vitales. Ministerio de Salud de la Nación. Serie 5, 2000.
20. Papanicolaou GN, Traut HF. Atlas of exfoliative cytology. Commonwealth Fund by Universisty Press, Massachusetts, 1954.
21. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA* 1989; 262: 931-4.
22. Astori G, Pipan C, Muffato G. Detection of HPV-DNA in semen, urine, urethral samples by dot blot and PCR. *Microbiologica* 1995; 18: 143-9.
23. Wright D, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis M (ed). PCR protocols. A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, 1990, p 153-8.
24. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S *et al.* Primed-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-97.
25. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Brocker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.
26. Bernard HU, Chan S-Y, Manos MM *et al.* Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogentic algorithms. *J Inf Dis* 1995; 170: 1077-85.
27. de Roda Husman A-M, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJL, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76: 1057-62.
28. Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 11-9.
29. de Villiers E-M. Hybridization methods other than PCR: An update. In: The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus. International Agency for Research on Cancer (IARC)-WHO, IARC Scientific Publications N°119, Lyon, 1992, p 111-9.
30. Gravitt PE, Manos MM. Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA. In: Muñoz N, Bosch X, Shah K, Meheus A (eds). The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus. International Agency for Research on Cancer (IARC)-WHO, IARC Scientific Publications N° 119, Lyon, 1992, p 121-33.
31. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD *et al.* A prospective study of HPV 16 DNA detection by PCR and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* 2000; 183: 1651-5.
32. Thomas KK, Hughes JP, Kuyers JM *et al.* Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. *J Infect Dis* 2000; 182: 1097-102.
33. Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol* 2001; 64: 550-9.
34. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180: 1415-23.
35. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* 1996; 69: 364-8.
36. Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerborst TJ *et al.* The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 61: 306-11.
37. Dexeus S, Sas A, Suría JC. HPV: una nueva epidemia que afecta a la mujer. 18th International Papillomavirus Conference, Jul 23-28, 2000, Barcelona, España, p 58.
38. Liaw KL, Glass AG, Manos MM *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 954-60.
39. Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB *et al.* Infección por virus papiloma humano en mujeres con cito-coloscopia normal residentes en una región de alta incidencia de carcinoma de cérvix: la Provincia de Misiones y áreas de influencia. *Colposcopia* 1999; 2: 60-8.
40. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE *et al.* Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169: 235-40.
41. 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: 6987-93.
42. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998; 58: 829-33.
43. Andersson S, Alemi M, Rylander E *et al.* Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer* 2000; 83: 307-10.
44. Ellis JRM, Keating PJ, Baird J *et al.* The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Med* 1995; 1: 464-70.
45. Luxton J, Mant Ch, Greenwood B *et al.* HPV16 oncogene variants in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* 2000; 60: 337-41.
46. Villa LL, Sichero L, Rahal P *et al.* Molecular variants of

- human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000; 81: 2959-68.
47. Xi LF, Critchlow CW, Wheeler CM *et al.* Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res* 1998; 58: 3839-44.
 48. Cheng G, Icenogle JP, Kirnbauer R *et al.* Divergent human papillomavirus type 16 variants are serologically cross-reactive. *J Infect Dis* 1995; 172: 1584-7.
 49. Kirnbauer R, Tabú J, Greenstone H *et al.* Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993; 67: 6929-36.
 50. Touzé A, El Mehdaoui S, Sizaret PY, Mougín C, Muñoz N, Coursaget P. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2046-51.
 51. Ho L, Chan S-Y, Burk RD *et al.* The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 1993; 67: 6413-23.
 52. Ong CK, Chan S-Y, Campo MS *et al.* Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993; 67: 6424-31.
 53. Bonatto SL, Salzano FM. Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups and their implications for the peopling in the New World. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1413-23.
 54. Breitburd F, Coursaget P. Human papillomavirus vaccines. *Cancer Biol* 1999; 9: 431-45.
 55. International Agency for Research on Cancer (IARC)-World Health Organization (WHO). The current status of development of prophylactic vaccines against human papillomavirus infection. Report of a technical meeting, Ginebra, Suiza, 1999.

LA PORTADA

Norberto Pagano. Los quenachos, 1990

Acrílico sobre hardboard, 182 x 122 cm. Cortesía de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Predio TANDAR, Centro Atómico Constituyentes.

Presidente de la Comisión Organizadora de la Exposición Permanente: Dr. A.J.G. Maroto. La exposición permanente está abierta al público.

Norberto Pagano nació en Olivos (Provincia de Buenos Aires) en 1940. Dibujante, pintor y muralista. Docente en las Escuelas de Bellas Artes Prilidiano Pueyrredón y Ernesto de la Cárcova. Realizó 32 muestras exposiciones en el país y en el exterior. Expone con regularidad en salones municipales, provinciales y nacionales en los que obtuvo diversas distinciones; entre ellas, Premio Pío Colivadino, Distinción Especial del Jurado del Salón Nacional. Poseen obras suyas los Museos de Bellas Artes de Luján, de Resistencia, de Corrientes y UCA (La Plata) entre otros¹.

¹ Extractado de: *Comisión Nacional de Energía Atómica. Artistas Plásticos con la CIENCIA*, 102. Centro Atómico Constituyentes, Predio TANDAR, Buenos Aires, 1999; p. 106.