

Gaceta Médica de México

Volumen
Volume 139

Suplemento
Supplement

4 Noviembre-Diciembre
November-December 2003

Artículo:

Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México: su asociación a la alta incidencia del cáncer del cérvix

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México: su asociación a la alta incidencia del cáncer del cérvix

Jaime Berumen-Campos*

Variación del código de barras del Virus del Papiloma Humano

En 1992 el profesor Dr. Lutz Gissmann del "Krebsforschungszentrum" (centro de investigación de cáncer) de la ciudad de Heidelberg, Alemania Federal, me invitó a participar en un proyecto de investigación para estudiar la respuesta inmunológica contra el Virus del Papiloma Humano (VPH) de las pacientes con cáncer del cuello uterino en México, que ya se conocía era uno de los agentes responsables de esa enfermedad.^{1,2} Me encargó la tarea menos importante del proyecto, que era detectar y tipificar el genoma del Virus del Papiloma Humano en las biopsias de cáncer de las mujeres en estudio, lo cual acepté con mucho gusto, pues era una oportunidad para colaborar con un investigador importante. Los profesores Harold zur Hausen y Lutz Gissmann descubrieron en 1981-1984 los Virus del Papiloma Humano asociados a neoplasias genitales: los tipos 6 y 11 asociados a neoplasias benignas,^{3,4} como el condiloma acuminado o mejor conocido a nivel popular como «crestas de gallo» y los tipos 16 y 18 asociados al cáncer del cuello uterino.^{5,6} En ese proyecto participé conmigo la Bióloga Leonora Casas Ávila y utilizamos la técnica de hibridación de ácidos nucleicos denominada «Southern blot», la cual permite distinguir los tipos de Virus de Papiloma Humano mediante la identificación de un conjunto de bandas de DNA único para cada tipo viral en una placa de rayos X, similar a los códigos de barras que identifican a los productos en los supermercados.

Un día antes de que llegara el Profesor Gissmann en el verano de 1992, Leonora y yo revisamos rápidamente todas las placas de rayos X para ver los «códigos de barras de DNA» e identificar a cada virus y calcular su frecuencia, especialmente la del VPH16. Habíamos encontrado que la mitad de los tumores tenían el VPH16 y por la premura del tiempo no nos dimos cuenta que el

código de barras del VPH16 no era exactamente igual en todos los tumores. Al otro día, me reuní con el Dr. Lutz Gissmann, le mostré los datos y el tampoco noto las pequeñas diferencias del código del VPH16; él me mostró sus observaciones de la respuesta inmune, principalmente los hallazgos de la presencia de anticuerpos en la sangre de las pacientes con cáncer contra antígenos del Virus del Papiloma Humano tipo 16, los cuales concordaban bastante bien con la presencia del DNA del VPH16 que nosotros habíamos encontrado en las biopsias de los tumores. A los pocos días después, revisé detenidamente algunas placas de rayos X otra vez y noté que el patrón de bandeo del VPH16 era ligeramente diferente en algunos tumores: el peso molecular de la primera banda era más pequeño y el de la tercera banda era más grande que las correspondientes bandas en el VPH16 descubierto por zur Hausen y Gissmann en 1983;⁵ (Figura 1). Leonora y yo revisamos todas las placas y notamos que ese patrón variante no era raro, mas bien era bastante frecuente: en esa primera serie que exploramos, casi una cuarta parte (23%) de los tumores positivos para el VPH16 tenían el patrón variante y el resto el patrón del VPH16 de referencia o Europeo, que había sido identificado y aislado de una mujer Alemana con cáncer. Muy importante, nos dimos cuenta que las mujeres que tenían el virus variante tenían 11 años menos que las que tenían el virus de referencia (42 contra 53 años). Además, el virus variante retenía completos los genes E1/E2 y la intensidad de sus bandas de DNA era dos veces más intensa que las bandas del virus de referencia, lo cual sugería que el virus variante se replicaba más rápido que el virus VPH16 de referencia. Al profesor Gissmann, no le interesó el hallazgo, él estaba mas bien interesado por la respuesta inmune⁷ y no le dio importancia a nuestra observación. A nosotros nos pareció importante estudiar el fenómeno a fondo, pues el virus variante se presentaba muy frecuente en las muestras exploradas de pacientes Mexicanas y su

* Jefe del Laboratorio de Medicina Genómica, UNISSER, Facultad de Medicina UNAM, Hospital General de México.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Jaime Berumen Campos, Laboratorio de Medicina Genómica, Unidad de Investigación, Enseñanza y Comunicación en Salud Reproductiva, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Planta Baja, Colonia Doctores, C.P. 06726, México, D.F.

asociación con mujeres más jóvenes podría sugerir que el virus variante era más oncogénico. Además, en esa época también habíamos descubierto en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad que el VPH16 en la mayoría de los tumores presentaba completo el gene E2, lo cual era completamente diferente a lo encontrado por otros investigadores en Estados Unidos y Europa, quienes habían encontrado que este gen se rompe durante la integración del genoma viral al DNA celular, en la mayoría de los tumores positivos para el VPH16.⁸⁻¹⁰ De hecho 1985, el profesor zur Hausen¹¹ y su grupo postularon que la integración del VPH en el DNA celular, con el concomitante rompimiento del gen E2, era un paso indispensable para la progresión de las lesiones pre-invasoras avanzadas a cáncer invasor; una hipótesis muy interesante, puesto que ya se sabía que la proteína E2 reprime la expresión de los 2 oncogenes del virus (E6 y E7); el rompimiento del gen E2 durante la integración automáticamente permitiría la expresión de los oncogenes virales y con ello se induciría la progresión tumoral.¹² Sin embargo, lo que estábamos encontrando en México, era muy diferente y postulamos una hipótesis alternativa a la aceptada internacionalmente: para la progresión tumoral no es necesario que el gene E2 del VPH16 se rompa. Una parte de esos datos los publicamos en 1994 en la revista Europea «International Journal of Cancer»¹³ y el resto de los datos con la nueva hipótesis, en 1995 en la revista Americana «Human Pathology».¹⁴ Aunque a nivel internacional nadie le hizo caso a nuestra hipótesis, quizá porque teníamos apellidos latinos y el trabajo se había realizado en un país en vías de desarrollo, nosotros nos preguntábamos ¿qué pasaba en los tumores en México?, ¿Quizá el VPH16 variante detectado en muchos tumores era realmente diferente, era exclusivo de las mujeres Mexicanas y se comportaba biológica y clínicamente diferente al VPH16 Europeo?

Caracterización genética del VPH16 detectado en México

Una vez que había decidido explorar el fenómeno del nuevo virus a fondo, Leonora y yo realizamos inicialmente un análisis del patrón de bandedo (patrón de restricción) de los virus en la computadora, el cual sugería claramente que había cuando menos 2 mutaciones en el gene E2 (se perdía un sitio y se ganaba un nuevo sitio para la enzima PstI), por lo que decidimos descifrar la información genética del gen E2 completo mediante la técnica de secuenciación de DNA. En los primeros ensayos amplificamos el gen E2 completo mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de dos muestras de DNA extraídas de biopsias de cáncer de

cuello uterino positivos para el VPH16 variante. En ese trabajo utilizamos la técnica de secuenciación de DNA manual con isótopos radiactivos (³⁵S), la cual es bastante pesada y difícil, por lo que avanzamos muy lentamente. Este trabajo lo iniciamos a finales de 1994 y lo terminamos a finales de 1995 y constituyó la tesis de maestría de la Bióloga Leonora Casas, quien se graduó de Maestra en Ciencias en la Escuela Militar de Graduados de Sanidad en 1995, bajo mi tutoría. Secuenciamos las dos hebras de DNA de los 1100 pares de nucleótidos que constituyen el gen E2 completo de dos aislados diferentes (MX68 y MX70) del VPH16 variante. Para nuestra fortuna, además de demostrar las dos mutaciones sospechadas con el análisis de restricción en la computadora, encontramos 22 mutaciones adicionales distribuidas a lo largo del gen E2 (Figura 2). Ambos aislados eran idénticos en 19 mutaciones, pero uno tenía 3 (MX68) y el otro 2 mutaciones (MX70) exclusivas. Nos pareció claro que las 19 mutaciones idénticas no eran mutaciones *de novo* que se generaron durante la evolución del tumor puesto que eran completamente idénticas en dos aislados independientes, sino más bien nos indicó que se trataba de mutaciones que quizá se habían generado durante un cierto período evolutivo. Los tipos virales se consideran diferentes cuando difieren en mas del 10% de su secuencia de nucleótidos; cuando la variación es de 6 al 10% se consideran subtipos virales y cuando solo varían de 0.1 a 5.0% se consideran variantes virales.^{15,16} Como el porcentaje de cambio que encontramos en la secuencia de nucleótidos de los genes E2 fue solo de 1.9-2.0%, era claro que se trataba de una variante viral del VPH16. Por otra parte, no estábamos seguros que las 5 mutaciones que eran diferentes entre los dos aislados formaban parte de dos variantes virales diferentes, o simplemente eran mutaciones generadas durante la evolución del tumor, después que el virus infectó a las pacientes. Una manera de resolver esta cuestión era secuenciar un mayor número de aislados de otros tumores. Sin embargo, a finales de 1995 y prácticamente casi todo 1996 no tuvimos los suficientes recursos en el laboratorio para terminar el proyecto, además de que era una gran empresa secuenciar con el método manual el gen E2 de 5 o 6 muestras más, por lo que el proyecto se quedó inconcluso un tiempo. Afortunadamente, la Secretaría de la Defensa apoyó el financiamiento de algunas líneas de investigación del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, incluyendo el proyecto de cáncer del cuello uterino y los Virus de Papiloma, y a finales de 1996 el CONACYT me aprobó el proyecto «Desarrollo de sistemas de identificación de individuos mediante el análisis del DNA», para el cual estaba contemplada la compra de un Secuenciador Automático de DNA. El secuenciador automático llegó al laboratorio en agosto de 1997 y estuvo operativo prácticamente hasta finales de ese mismo año. La gran

ventaja del secuenciador es que se pueden secuenciar hasta 10,000 nucleótidos por día en lugar de los 1000 que secuenciábamos cada tres meses con el método manual y en lugar de usar radiactividad se utilizan marcadores fluorescentes. Así que decidimos terminar de dilucidar el misterio del VPH16 variante.

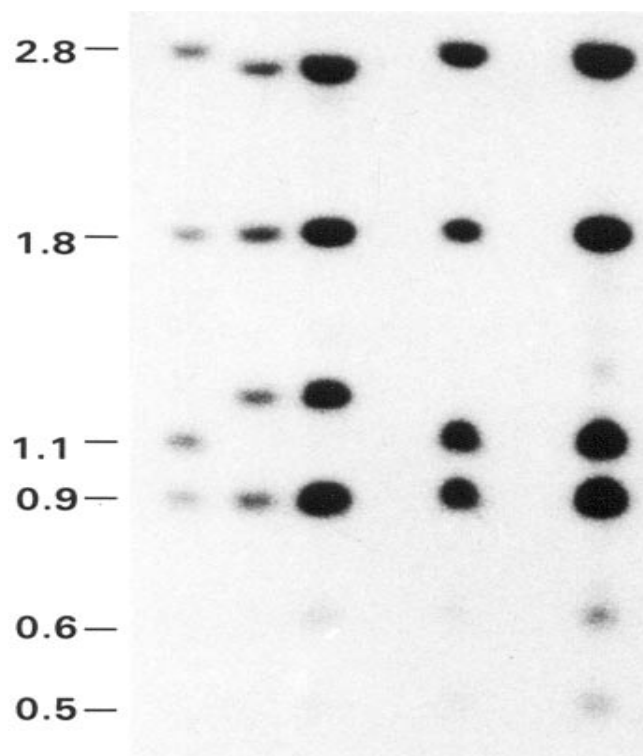


Figura 1. Identificación de las variantes del VPH16 por cambios en el "Southern blot". Se muestran el patrón de 5 muestras de DNAs positivos para el VPH16 derivados de carcinomas cervicales y digeridos con las enzimas PstI/BamHI. Las muestras en el segundo y tercer carril muestran el patrón variante, mientras que las muestras en los carriles restantes muestran el patrón de VPH16 de referencia. A la izquierda se muestra una escala de peso molecular en kilobases.

A principios de 1998, decidí secuenciar el gen E2 de 7 tumores mas, positivos para el VPH16 variante. Para esta parte del proyecto participaron la M. en C. Rosa María Ordóñez del Departamento de Biología Molecular del Laboratorio Multidisciplinario y la Química Nora López, una estudiante del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, que vino al laboratorio para realizar su tesis de maestría bajo mi tutoría. Los resultados nos mostraron claramente que se trataba de dos variantes diferentes del gen E2 del VPH16. Por lo que le encargué a la M. en C. Silvia Galván del Instituto de Investigaciones

Biomédicas de la UNAM, que acababa de incorporarse al grupo como profesor invitado, que escribiera el primer borrador del artículo. Además, como en 1997 el grupo de la Dra. Cossette Wheelers de la Universidad de Nuevo México, habían reportado todas las ramas filogenéticas de las variantes del VPH16,¹⁶ secuenciando el gen E6 y parte del gen L1, decidimos investigar si las variantes que habíamos descubierto en base al gen E2 del VPH16 correspondían a alguna de las variantes previamente reportadas para los genes E6 y L1. Secuenciamos los genes E6 y L1 de todos nuestros nueve aislados y comparando con los datos de la Dra. Wheelers nos dimos cuenta que todos ellos correspondían a variantes Asiático-Americanas (AA): los aislados con la secuencia del E2 del tumor MX68 correspondían a la variante AA-a y los idénticos al E2 del tumor MX70 a la variante AA-c. Afortunadamente, nadie había reportado las variaciones en los genes E2 y mucho menos su asociación con un alto nivel de replicación viral y a la retención de los genes E1/E2 en los cánceres invasores de cérvix, por lo que mandamos el artículo, a finales de diciembre de 1998, a la revista «International Journal of Cancer» y fue aceptado de inmediato para su publicación con «minor corrections». Este artículo fue publicado en esa revista en noviembre de 1999.¹⁷

TIPOS DE VPH (n = 181)

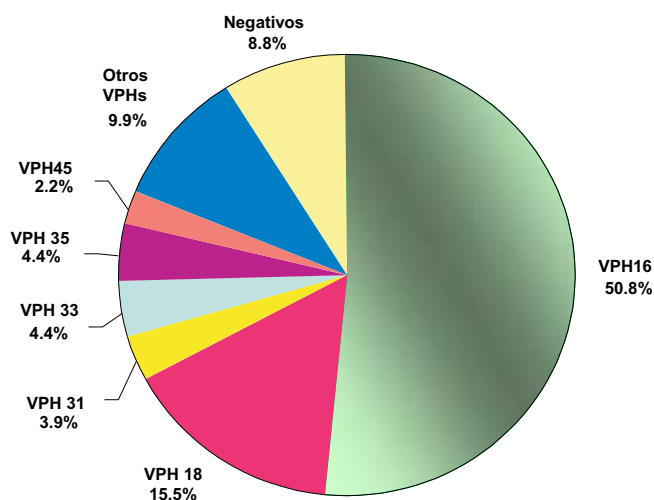


Figura 2. Cambios en la secuencia de nucleótidos del gen E2 de los virus Asiático-Americanos-a y AA-c. Se muestran los cambios en la secuencia de nucleótidos del gen E2 aislado de dos muestras de DNA derivadas de carcinomas cervicales positivos para el VPH16. El aislado MX68 es positivo para el virus AA-a y el MX70 para el virus AA-c, y la muestra de referencia corresponde a la secuencia del gen E2 del VPH16 Europeo, aislado de una mujer alemana. Las posiciones donde no existe variación en relación a la secuencia de referencia están marcadas con un guión.

Los virus Asiático-Americanos son muy frecuentes en México y uno de ellos, el AA-c parece haberse generado en América hace 24,000 años

Durante el transcurso de los experimentos anteriores surgieron muchas preguntas. Por ejemplo, no sabía si las variantes Asiático-Americanas eran más agresivas biológica y clínicamente, si la proteína E2 no reprimía la actividad de los oncogenes del virus o si los propios oncogenes del virus tenían mayor actividad transformante. Una primera pregunta que quisimos resolver fue investigar cual era la magnitud del problema, ¿cuál era la frecuencia de las variantes AA y el resto de variantes del VPH16 en las pacientes con cáncer en México?. Para ello en un estudio de casos y controles que realizamos en una muestra de la población Mexicana, incluimos 181 enfermas con cáncer del cuello uterino de la clínica 4 del IMSS. El estudio clínico lo realizó el Dr. Guillermo González Lira de esa institución y el estudio de los virus lo realizamos en nuestro laboratorio a partir de una biopsia del tumor tomada de las enfermas. El VPH16 se detectó en el 51.5% (92 de 181) de las biopsias estudiadas (Figura 3). Casi la mitad (45.7%) de las muestras positivas para el VPH16 presentaron variantes Asiático-Americanas, el

del mundo.¹⁶ Estos datos sugieren que este virus (AA-c) se asocia fuertemente con el componente genético Amerindio, que predomina en la población mestiza de este país. Cálculos que realizamos en base a las mutaciones encontradas en el gen E2, sugieren que este virus probablemente se generó en América hace 24,000 años, después que el hombre Asiático cruzó por el estrecho de Bering. El virus AA-a, junto con los virus Europeos, que predominan en Europa y en Estados Unidos, muy probablemente llegaron a México con los conquistadores Españoles. La frecuencia similar de los virus AA-a y AA-c encontrada en México pudiera explicarse por el gran mestizaje ocurrido entre indígenas y españoles durante los 300 años de colonización de México.

Los virus AA se asocian a mujeres más jóvenes y a tumores histológicamente más agresivos

Cuando comparamos las edades de las pacientes con cáncer, encontramos que las que tenían el virus AA-c (edad promedio de 43 años) tenían 11 años menos que las pacientes que tenían los virus Europeos (54 años en promedio) y 6 menos que las que tenían el virus AA-a (49

GEN E2

NUCLEOTIDO	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	8	1	1	1	1	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	5	6	6	6	7	7	7	8
	6	5	6	8	8	2	4	6	7	8	1	1	4	1	1	3	6	6	8	9	0	7	8	0
	0	9	1	1	2	4	9	2	7	7	0	6	9	6	7	8	6	4	4	4	6	8	7	5
Referencia	C	C	C	A	G	T	G	A	C	T	C	G	G	C	T	A	T	T	C	T	T	G	C	T
MX68	A	A	-	C	A	A	A	G	G	C	T	-	A	A	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G
MX70	A	A	T	-	A	A	A	G	G	-	T	A	A	A	C	C	G	-	A	A	C	T	A	G

Figura 3. Frecuencia de los tipos de Virus del Papiloma Humano (VPH). Se muestra la distribución de los tipos de VPH encontrados en una muestra de 181 mujeres con cáncer. En las muestras positivas para otros VPHs se incluyen 2 positivas para el HPV39, una para los VPHs 51, 52, 56 y 58, y doce aislados positivos para la región MY (negativos para los VPHs 16/18) que no se tipificaron por insuficiente cantidad de DNA.

resto presentaron variantes Europeas (6.5% la E-350T y 46.7% la E-350G; Figura 4), excepto una que fue positiva para una variante Norte Americana. No detectamos variantes Africanas ni Asiáticas. La mitad de las variantes Asiático-Americanas fueron AA-a (24.0%) y la otra mitad AA-c (21.7%). Muy interesante, la frecuencia de las variantes AA encontrada en México fue mucho mayor que la encontrada en España (14%) o Sudamérica (19%), principalmente a expensas de la variante AA-c que es rara en España (2%) y Sudamérica (4%) y no existe en el resto

años en promedio; Figura 5). Sin embargo, los dos virus Asiático-Americanos AA-a y AA-c eran mucho más comunes que los virus Europeos en las mujeres con cáncer con 35 o menos años de edad, lo cual sugería claramente que los virus Asiático-Americanos, especialmente el virus AA-c, eran más oncogénicos que los virus Europeos. Por otra parte, los virus Asiático-Americanos se encontraron asociados tanto a tumores epidermoides como a adenocarcinomas, mientras que los virus Europeos solo se encontraron en tumores epidermoides.

Variantes virales del VPH16 (n = 92)

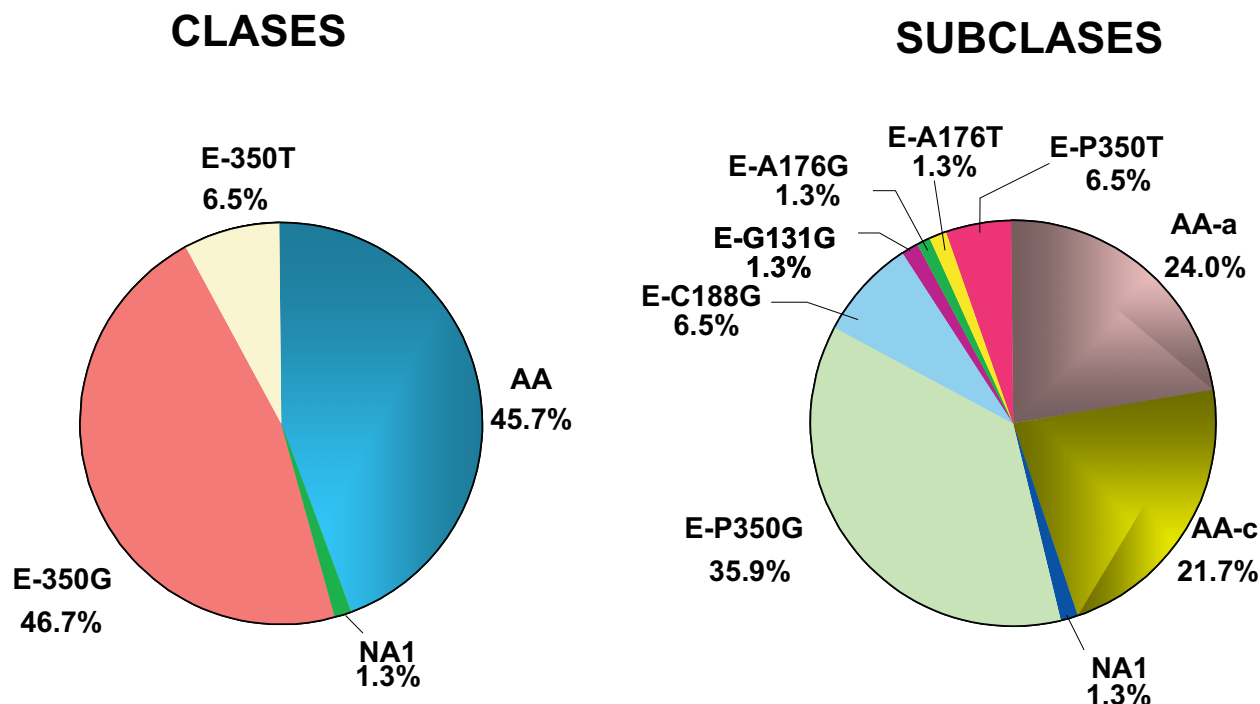


Figura 4. Frecuencia de las clases y subclases del Virus del Papiloma Humano 16 detectadas en carcinomas del cuello uterino en México. Se muestra la distribución de las clases y subclases del VPH16 en los 92 aislados positivos para el VPH16 mostrados en la figura 3. Las clases y subclases de VPH16 se asignaron de acuerdo a la nomenclatura de Yamada y cols, 1997. E=Europeo, AA=Asiático-Americano, NA=Norte Americana.

Los virus VPH16 Asiático-Americanos son 9 veces más oncogénicos que los virus VPH16 Europeos

La asociación de los virus AA con mujeres jóvenes y con adenocarcinomas sugiere que estos virus son más oncogénicos, sin embargo estas asociaciones no son suficientes para decir que un virus es más oncogénico. Existen varias maneras de demostrar si un virus es más oncogénico que otro. La manera más sencilla (entre comillas) es mediante la realización de un estudio de casos y controles, en el cual se explora un grupo de mujeres con cáncer y un grupo control, integrado por mujeres sanas. Con este tipo de estudio se puede calcular la "razón de momios" que es equivalente al riesgo relativo, y nos indica el riesgo que tiene una mujer de desarrollar el cáncer de cérvix cuando esta infectada con un determinado virus, en relación a cuando no esta infectada con ese virus. Por tal motivo decidí realizar un estudio de casos y controles, y para ello invite un grupo de epidemiólogos del Instituto Nacional de Salud Pública dirigidos por el Dr. Eduardo Lazcano, los cuales me auxiliaron en el diseño epidemiológico del estudio y el análisis de los datos. En

este estudio se incluyeron 181 mujeres con cáncer y 181 mujeres control. El virus VPH16 se encontró en la mitad de las muestras de cáncer y solo en el 11% de las muestras control. La frecuencia de los virus Asiático-Americanos fue 21 veces mayor en las mujeres con cáncer (23.2%) que en las mujeres sanas (1.1%), mientras que la frecuencia de los virus Europeos fue solo 2.7 veces mayor en las mujeres con cáncer (27.1%) que en los controles (10%). Esto sugiere que la infección con los virus AA termina habitualmente en cáncer. Las mujeres infectadas con los virus AA tuvieron un riesgo de desarrollar cáncer 27 veces mayor que las mujeres que no tienen estos virus, mientras que las mujeres infectadas con los virus Europeos tuvieron solo 3.3 veces más riesgo de desarrollar cáncer. Estos datos claramente indican que los virus AA son casi 9 veces más oncogénico que los virus Europeos. Estos datos los publicamos en la revista "Journal of the National Cancer Institute" en septiembre del año 2001.¹⁸ Al editor de la revista le pareció que la noticia era suficientemente importante y mandó un comunicado a la prensa internacional, el cual se difundió por internet en todo el mundo.

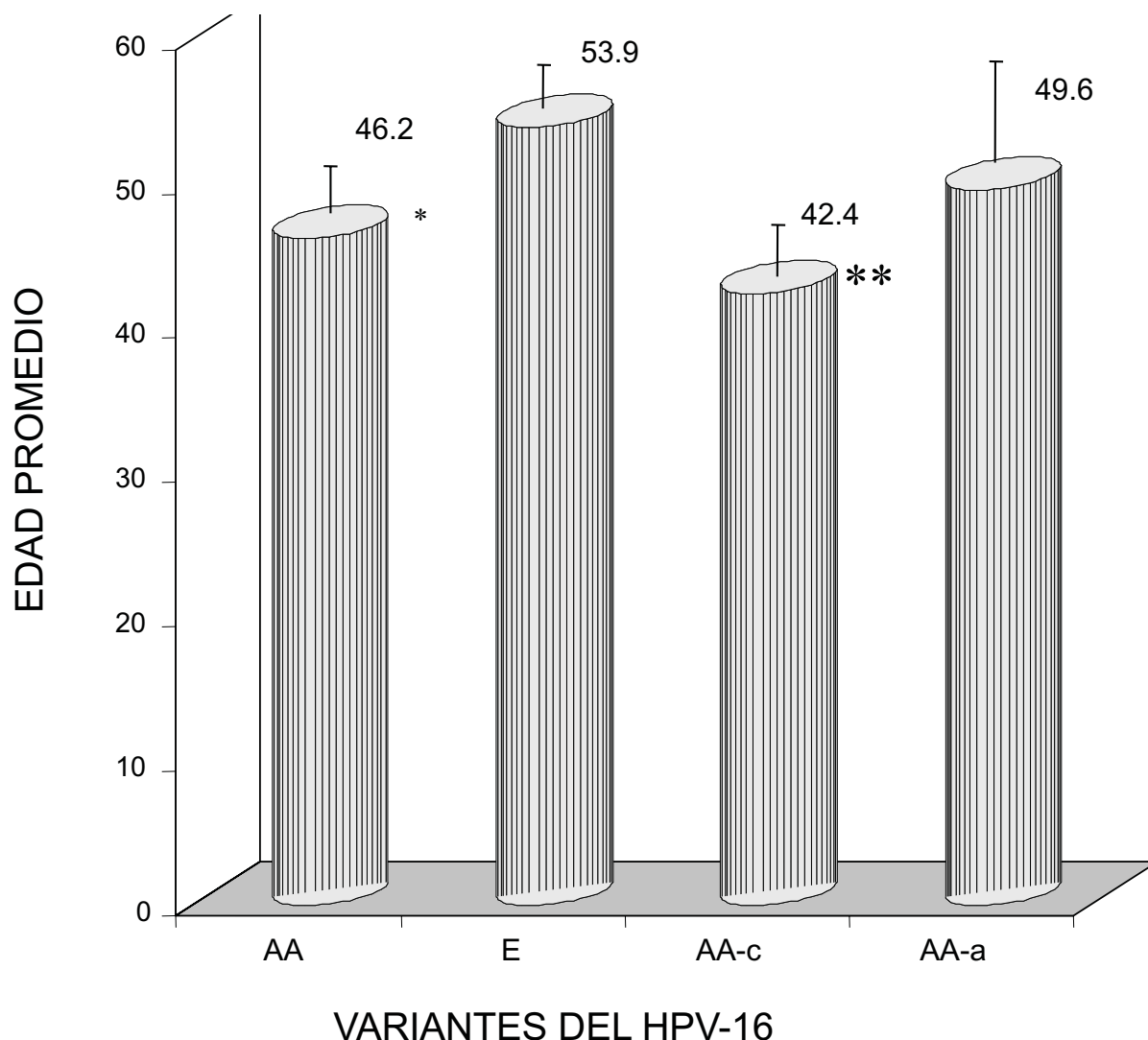


Figura 5. Edad promedio de las pacientes con cáncer del cuello uterino. Se muestra la edad promedio de las pacientes con cáncer del cuello uterino agrupadas de acuerdo a la variante de VPH16 que se detectó en el tumor. El número de pacientes por grupo es como sigue: AA=42, E=49, AA-a=22, AA-c=20. Los valores de "p" se calcularon con la prueba de t comparando el grupo E contra el AA y el AA-c.

Los mayor oncogenicidad de los virus VPH16 AA pudiera estar asociada a la imposibilidad de la proteína E2 de reprimir la transcripción de los oncogenes virales E6/E7

La mayor oncogenicidad de los virus AA demostrada en el estudio de casos-controles necesariamente debe tener un fundamento biológico. Algunos datos experimentales apoyan esta hipótesis: el oncogén E6 de los virus AA tiene una actividad neoplásica mayor en cultivos celulares que el oncogén E6 de los virus Europeos,¹⁹ la replicación del genoma viral es mayor en los virus AA¹⁷ y la región de control transcribe mas activamente los oncogenes E6/E7.^{20,21} Sin embargo estas diferencias no son muy marcadas entre ambos virus, por lo que se esperaría encontrar diferencias más importantes.

Diferencias en la regulación de la transcripción de los oncogenes E6/E7 por la proteína E2 pudiera también contribuir a la mayor oncogenicidad de los virus Asiático-Americanos, dado que estos virus retenían completo el gen E2 en la mayoría de los tumores. Pudiera ser que el gen E2 de las variantes AA no reprimiera la transcripción de los oncogenes virales o quedara inactivado por algún mecanismo alternativo, incrementándose la expresión de los oncogenes virales E6/E7. Para investigar estas posibilidades invité a la M en C. Rosa María Ordóñez Razo a participar en el proyecto, el cual sirvió además como su tesis de Doctorado. Primero investigamos si en los tumores donde se retiene el gen E2 existen transcritos de los oncogenes E6/E7, y encontramos que todos ellos presentan transcritos de los oncogenes E6/E7. Estos datos sugerían que el gen E2 no se transcribe o se

desactiva de alguna manera. Decidimos explorar la presencia de transcritos para el gen E2, y encontramos que en los tumores positivos para el VPH16 Europeo que retienen el gen E2, los transcritos del gen E2 son excluidos por "splicing", mientras que, sorprendentemente, en todos los tumores positivos para el VPH16 Asiático-Americano se encontraron transcritos completos del gen E2.

Dado que el gen E2 de los virus AA-a y AA-c tienen 16 mutaciones no conservadas distribuidas a lo largo de toda la proteína, el siguiente paso fue determinar si estas proteínas reprimen la transcripción de los oncogenes virales. Comparamos la actividad del gen E2 de los virus Europeo, AA-a y AA-c en 4 líneas celulares tumorales en cultivo. A dos de ellas, que eran negativas para el VPH, les introducimos un gen reportero clonado enfrente de la región de control de la expresión genética (LCR) del VPH16, de tal manera que este gen se integró al DNA celular y se expresaban permanentemente en las células modificadas. Las otras dos líneas celulares eran positivas para el VPH16 y VPH18, respectivamente, y expresaban los oncogenes E6/E7 permanentemente. Como queríamos probar la función de los genes E2, los aislamos a partir del DNA tumoral y los «clonamos» en plásmidos de expresión apropiados para utilizarlos en las líneas celulares. Así que, en experimentos por separado, introducimos los genes E2 del virus Europeo, del virus AA-a y del AA-c en las cuatro líneas celulares y medimos la expresión de los oncogenes virales o el gen reportero. Mientras que el gen E2 Europeo, como ya se sabía, reprimió la expresión de los oncogenes virales y el gen reportero, sorprendentemente la proteína E2 del virus AA-c no reprimió la expresión de los oncogenes virales en ninguna de las 4 líneas celulares. La proteína E2 del virus AA-a también reprimió los oncogenes virales, pero menos fuerte que el gen E2 del virus Europeo.

Estos hallazgos podrían explicarnos por qué los virus Asiático-Americanos pueden expresar sus oncogenes aun cuando retengan y expresen el gen E2. Así mismo podrían explicar su asociación con mujeres más jóvenes, especialmente el virus AA-c. Cuando una mujer es infectada por el virus VPH16 AA-c, este se replica rápidamente y la expresión de sus oncogenes E6/E7 se presenta casi de inmediato puesto que su proteína E2 no reprime su expresión. Los oncogenes estimulan para que las células se dividan sin control hasta que se convierten en células invasoras cancerosas. Para los virus Europeos, la expresión de los oncogenes no se presenta de inmediato puesto que su proteína E2 sí reprime su expresión; la desrepresión de los oncogenes de los virus Europeo está ligada al rompimiento del gen E2 durante la integración del DNA viral al genoma celular de la célula infectada o a la desregulación post-transcripcional de E2 por "splicing", mecanismos que pudieran depender de factores celulares

y pudieran llevarse a cabo en un lapso de varios años. Un artículo con estos últimos descubrimientos lo hemos enviado recientemente a la revista «Cancer Research».²²

Implicaciones del descubrimiento de los virus Asiático-Americanos en México

La incidencia del cáncer del cuello uterino en México (50 por 100,000 habitantes por año) es de las más elevadas en todo el mundo. En 1995 se detectaron 16,000 nuevos casos de cáncer cérvico-uterino y se calcula que cada dos horas se muere una mujer por esta enfermedad en México.^{23,24} Parece claro que uno de los factores que contribuyen importantemente a esa alta incidencia es la baja cobertura de la campaña de detección oportuna del cáncer cervical a nivel Nacional, ya que solo cubre alrededor del 30% de las mujeres con vida sexual activa y con riesgo potencial para padecer este cáncer. La alta frecuencia de los virus VPH16 Asiático-Americanos detectados en México (23% de todos los cánceres del cuello uterino), los cuales son más oncogénicos que los virus Europeos, pudiera también contribuir importantemente a la alta incidencia de este cáncer en México.

Por otra parte, la respuesta inmune de las mujeres con cáncer contra los virus Asiático-Americanos pudiera ser bastante diferente que para los virus Europeos, ya que presentan muchas mutaciones que modifican los blancos virales del sistema inmune.^{17,25,26} Por lo que no se podría asegurar que las vacunas que se están desarrollando en Estados Unidos y Europa contra el virus Europeo serán útiles en países como México, ya que el virus Europeo de referencia (E-350T) solo se presenta en el 6.5% de los carcinomas cervicales. El diseño apropiado de vacunas preventivas contra el VPH deberá contemplar la prevalencia, además de los tipos virales, de las variantes del VPH16.

Referencias

1. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer* 1992;52:743-9.
2. Muñoz N, Bosch FX. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica Mex* 1997;39:274-282.
3. Gissman L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int. J. Cancer* 1980;25:605-9.
4. Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J. Virol* 1982;44:393-400.
5. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983;80:3812-5.
6. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its prevalence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984;3:1151-7.
7. Nindl I, Benítez-Bribiesca L, Berumen J, Farmanara N, Fisher S, Gross

- G, López-Carrillo L, Muller M, Tommasino M, Vázquez-Curiel A, Gissmann L. "Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients". Archives of Virology 1994;137:341-353.
8. Cullen AP, Reid R, Campion M, And Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. J. Virol 1991;65:606-612.
9. Choo KB, Pan CC, Han SH. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. Virology 1987;161:259-261.
10. Wilczynski SP, Pearlman L, Walker J. Identification of HPV16 early genes retained in cervical carcinomas. Virology 1988;166:624-627.
11. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature (London) 1985;314:111-114.
12. Schneider-Manoury S, Croissant O, Orth G. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. J. Virol. 1987;61:3295-3298.
13. Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, García-Carrancá A. "Genome amplification of Human Papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes". International Journal of Cancer 1994;56:640-645.
14. Berumen J, Unger ER, Casas L, Figueroa P. "Amplification of Human Papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer". Human Pathology 1995;26:676-681.
15. 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.
16. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Muñoz N, Bosch FX, Wheelers C. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. Journal of Virology 1997;71:2463-72.
17. Casas L, Galván SC, Ordoñez RM, López N, Guido M, Berumen J. "Asian-American variants of Human Papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas". International Journal of Cancer 1999;83:449-455.
18. Berumen J, Ordoñez RM, Salmeron J, Lazcano E, Galvan S, Estrada RA, Yunes E, García-Carrancá A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-De La Campa. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. Journal of the National Cancer Institute 2001;93:1325-1330.
19. Stoppler M, 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. 70;6987-6993:1996.
20. Veress G, Szarka K, Dong X, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. J. Gen. Virol 80;1035-1043:1999.
21. Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martínez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. J. Gen. Virol 81;1975-1981:2000.
22. Ordoñez RM, Armendáriz-Borunda J, Berumen J. Enhanced oncogenicity of Asian-American Human Papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7-oncogenes transcription. Cancer Research, enviado a publicación (2002).
23. Lazcano E, Nájera P, Alonso P, Buiatti E, Hernández-Avila M. Programa de detección oportuna del cáncer cervical en México. I. Diagnóstico situacional. Rev. Inst. Nal. Cancerología 1996;42:123-40.
24. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, México D.F., México, 1997.
25. Dillner J., Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. Int. J. Cancer 1990;46:703-711.
26. Kónya J, Eklund C, Geijersstam V, Yuan F, Stuber G, Dillner J. Identification of a cytotoxic-T-lymphocyte epitope in the human-papillomavirus-type-16 E2 protein. J. Gen. Virol 1997;78:2615-2620.

