

Amplificación del proto-oncogén HER-2/neu

asociada a la infección por VPH de bajo riesgo
en citología exfoliativa cervical

Palabras clave: HER-2/neu, c-erbB-2,
VPH, cérvix.

Key words: HER-2/neu, c-erbB-2, HPV,
cervix.

Recibido: 15/11/99
Aceptado: 29/11/99

Martín C Abba,* Silvana A Mourón,* Alba Güerci,* María A Gómez,*
Fernando N Dulout,* Carlos D Golijow*

* Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGABA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118 s/n, 1900, La Plata, Argentina. Tel/Fax: 54-221-421-1799. E-mail: cgolijow@fcv.medvet.unlp.edu.ar

26

Resumen

Se analizaron 69 muestras positivas para el virus papiloma humano (VPH) tipos -6, -16 y -18, y 24 muestras con citología cervical normal negativas para el VPH como grupo control. El análisis de la amplificación génica del proto-oncogén HER-2/neu se realizó utilizando la técnica de coamplificación con locus de referencia. Se encontró una asociación entre la amplificación del gen HER-2/neu y el grupo viral de "bajo riesgo" (VPH-6) ($p < 0.005$). Dentro de este grupo, se observó una asociación entre la amplificación del proto-oncogén y el status citopatológico CIN I ($p < 0.01$). Debido a que la mayoría de las muestras CIN I analizadas presentaron un patrón coilocítico, la amplificación de HER-2/neu parecería estar relacionada con este tipo de alteración celular. Por otra parte, sería importante estudiar la amplificación génica y la expresión de HER-2/neu en los diferentes estadios de las neoplasias intraepiteliales cervicales a fin de poder evaluar su papel en la progresión del cáncer cervical

Summary

Sixty-nine non-cancerous cytological samples from exocervical specimens positives for HPV type-6, -16 and -18, and 24 non-infected samples as controls were analyzed for HER-2/neu gene amplification. The genomic differential polymerase chain reaction with the single copy reference gene was employed for gene amplification detection. An association between HER-2/neu gene amplification and "low-risk" HPV group (type-6) was found ($p < 0.005$). Within this group, HER2/neu amplification was associated to the CIN I grade ($p < 0.01$). Since, in the samples analyzed most of the CIN I stage was characterized by a koilocitotic pattern, HER-2/neu amplification could be related to this kind of cellular alteration. It would be important the study of HER-2/neu gene amplification and also gene expression in different CIN stages, in order to determine its role and significance in cervical carcinogenesis.

Introducción

El cáncer de cuello uterino es la segunda enfermedad maligna más frecuente y con elevada mortalidad en la población mundial de mujeres.^{1,2,3}

Como ha sido demostrado, las neoplasias cervicales son el resultado de la interacción entre factores físicos, químicos y microbianos. Entre estos últimos el virus papiloma humano (VPH) juega un rol primordial, aunque no suficiente por sí solo,

para causar la tumorigénesis.^{1,4} Según la probabilidad de transformación celular, el VPH puede clasificarse en tipos virales de “alto riesgo” (VPH-16, -18), o de “bajo riesgo” (VPH-6 y -11).

Para que la transformación celular pueda ocurrir deben suceder cambios a nivel fisiológico, inmunológico y principalmente deben acumularse múltiples alteraciones genéticas en el hospedador. Entre ellas, la activación de oncogenes y la pérdida o inactivación de segmentos cromosómicos y/o genes supresores de tumor son eventos determinantes y por lo tanto altamente asociados a los tumores humanos.⁵

El proto-oncogén HER-2/neu (también conocido como c-erbB-2) es el segundo miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento epidermales. Este gen codifica un receptor tirosin quinasa de transmembrana implicado en la transducción de señales que conducen a la proliferación celular.⁶ La sobreexpresión de la oncoproteína por amplificación génica conduce a la autoactivación de los dominios de la tirosinquinasa, con una consecuente proliferación no regulada.⁷

La amplificación y sobreexpresión de este gen han sido descritas en una variedad de tumores humanos.⁸⁻¹¹ Sin embargo, pocos estudios han sido realizados sobre muestras cervicales con citología no cancerosa tipificadas para VPH.^{12,13}

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la relación entre la amplificación del proto-oncogén HER-2/neu en muestras cervicales no cancerosas positivas para ADN-VPH y en muestras cervicales normales negativas para ADN-VPH como grupo control.

Material y métodos

Muestras analizadas

Se analizaron 93 muestras de citología exfoliativa cervical provenientes de una base de datos anónima (*cuadro I*). La recolección del material biológico se realizó mediante espátula de Ayre estéril sumergida luego en 5 mL de solución de PBS (phos-

Cuadro I. Distribución de las muestras de citología exfoliativa cervical según las variables analizadas.

Variables	Número de muestras (n = 93)
Tipos de VPH	
VPH de bajo riesgo	35
VPH de alto riesgo	34
VPH-negativas	24
Citología	
Normal	32
Condiloma	23
CIN I	32
CIN II	3
CIN III	3
Edades	
< 24 años	24
25-30 años	16
> 31 años	29
Sin datos	24

VPH=Virus Papiloma Humano

phate buffered saline) con 0.05% de merthiolate y conservadas a 4°C para su posterior procesamiento dentro de las siguientes 24 horas.

Extracción de ADN

Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante ocho minutos, resuspendidas y lavadas con 1 mL de PBS. El pellet celular fue incubado durante tres horas a 56°C en 300 µL de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8.5; 1 mM EDTA; 1% Tritón x100 y 0.5% Tween 20) y 15 µL de proteinasa K (solución stock 10 mg/mL). Efectuada la extracción se inactivó la proteinasa K por ebullición durante 15 minutos. Se utilizaron 2.5 µL del lisado para la amplificación.

Detección del genoma viral por PCR

Para la detección del genoma viral se realizó la reacción en cadena de la polimerasa anidada (“nested PCR”).^{14,15} Los cebadores MY09 y MY11 fueron utilizados como cebadores externos y los GP5 y GP6 como cebadores internos. La tipificación del ADN-HPV fue realizada empleando el método previamente descrito.¹⁶

Detección de la amplificación en HER-2/neu

El análisis de la amplificación génica del proto-oncogén HER-2/neu se realizó utilizando la técnica de coamplificación con locus de referencia.¹⁷ Como gen control de copia única se empleó el locus timidinquinasa que se halla en el mismo cromosoma.¹⁸ La relación entre el gen en estudio y el gen de referencia ha probado ser un método eficiente para determinar la amplificación génica de forma semicuantitativa.¹⁹

La reacción de amplificación fue realizada utilizando 2.5 mL del lisado, 1.8 mM Cl_2Mg , 250 mM de cada uno de los dNTPs, 25 pmol de cada cebador¹⁷ (cuadro II) y 1.25 U de Taq DNA polimerasa en buffer de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), en un volumen final de 50 mL. Los ciclos de amplificación se realizaron como sigue: un ciclo a 94°C durante cuatro minutos y 26 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 56°C y un minuto a 72°C.

La detección de los productos de amplificación se realizó por corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 6% y se empleó Sybr Green-DNA como tinción. El análisis de relación de intensidad de bandas entre HER-2/neu y timidinquinasa (neu/tk) se efectuó por digitalización de imágenes con el programa Kodak Digital Science® ID Image Analysis. Todas las muestras se analizaron como mínimo por duplicado para confirmar los valores obtenidos.

Análisis estadístico

La asociación entre la amplificación del proto-oncogén, el tipo de VPH, el estado citopatológico

de las muestras y la edad de las pacientes fueron analizados empleando la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores de $p < 0.05$. Los datos fueron analizados utilizando el programa Statgraphics 3.0 Plus.

Resultados

Se analizaron 69 muestras positivas para el ADN-VPH y 24 muestras con citología cervical normal (PAP I) negativas para el ADN-VPH (grupo control). Se consideraron como muestras amplificadas para HER-2/neu, aquellas con una relación neu/tk superior a dos desviaciones estándar con respecto a la media calculada para las muestras control (media = 1.25 y desviación estándar = 0.33). De las muestras positivas para VPH 11.6% (8 de 69) presentaron valores superiores a dos, indicando eventos de amplificación génica (figura 1). No se detectó amplificación génica de HER-2/neu en las muestras negativas para VPH.

Las muestras fueron clasificadas en tres grupos: ausencia de VPH (grupo control), presencia de VPH-6 (grupo de *bajo riesgo*) y presencia de VPH-16/18 (grupo de *alto riesgo*). Se registró un incremento significativo en la relación neu/tk ($p < 0.005$) cuando se comparó el grupo de bajo riesgo (constituido en su totalidad por VPH-6) con los grupos control y de alto riesgo (figura 2). Cuando se comparó el grupo control con el de alto riesgo para dicha relación no se encontraron diferencias esta-

Cuadro II. Secuencia de los cebadores para la coamplificación de HER-2/neu y el gen de la timidinquinasa.

Gen	Secuencia	Fragmento
HER-2/neu		
Cebador 1	5'-CACCTGTGAGGCTTCGAAGCTGCAG-3'	217 pb
Cebador 2	5'-TATCCAGGAGGTGCAGGGCTAC-3'	
Timidin quinasa		
Cebador 1	5'-CTCTGGGAACAACCTCTGGGATGAGG-3'	136 pb
Cebador 2	5'-ACTCAGGTGGTCCCAGGAAGTGTGG-3'	

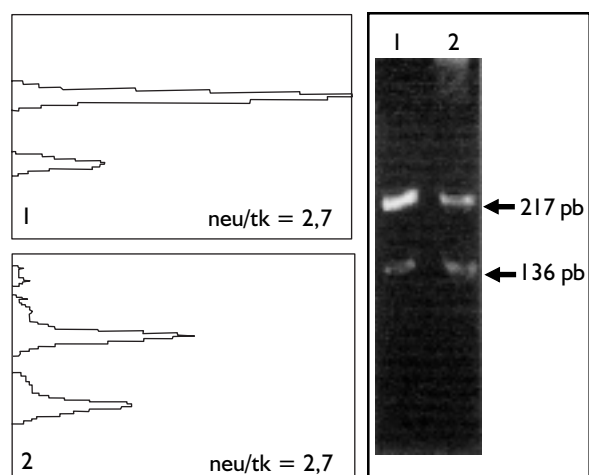


Figura 1. Corrida electroforética de los productos de coamplificación. La relación neu / tk fue establecida con base en los perfiles de intensidad neta de banda. Calle 1: muestra normal, calle 2: muestra amplificada para HER-2/neu.

dísticamente significativas ($p > 0.05$) (figura 2), lo cual sugeriría una asociación entre la amplificación de HER-2/neu y el tipo viral 6.

El VPH-6 es frecuentemente asociado a los estados histopatológicos clasificados como Condiloma y Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado I (CIN I). Dada la posible asociación entre las muestras de bajo riesgo y la amplificación de HER-2/neu, se agruparon las muestras positivas para VPH-6 de acuerdo a los criterios Condiloma o CIN I. Los valores obtenidos de la relación

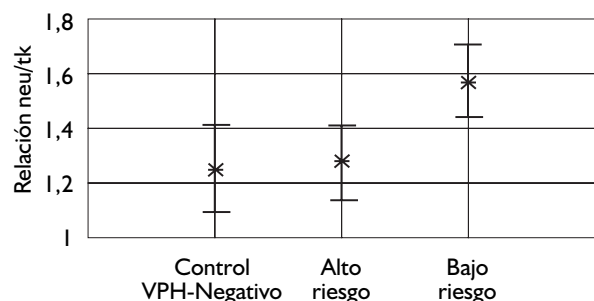


Figura 2. Intervalos de confianza de 99.5% para la prueba de Tukey de las relaciones neu/tk para los grupos: control (VPH negativo), bajo riesgo y alto riesgo. Denotan diferencias significativas entre el grupo de bajo riesgo en comparación con los grupos control y de alto riesgo.

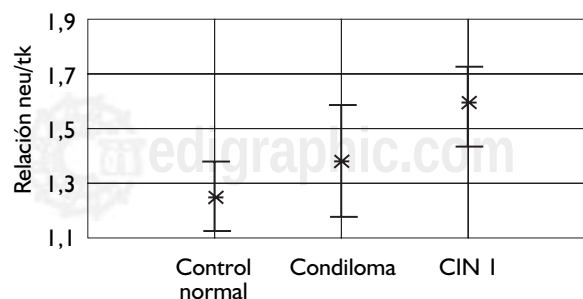


Figura 3. Intervalos de confianza de 99% para la prueba de Tukey de las relaciones neu/tk para los grupos: Control (PAP I, VPH-negativo), Condiloma y CIN I. Denotando diferencias significativas al comparar los grupos control y CIN I ($p < 0.01$).

neu/tk fueron comparados para estos subgrupos y para el grupo control (citología normal). Se observó un incremento significativo ($p < 0.01$) en dicha relación cuando se compararon las muestras CIN I con las muestras con citología normal, lo cual sugeriría una asociación entre la amplificación del proto-oncogén y las muestras clasificadas como CIN I (figura 3).

No se encontraron diferencias significativas al comparar las citologías y los grupos de edades cuando fueron empleados como únicos criterios de clasificación ($p > 0.05$).

Discusión

La amplificación génica es un importante acontecimiento en la inducción y progresión tumoral. El proto-oncogén HER-2/neu se encuentra amplificado y sobreexpresado en una variedad de carcinomas humanos, incluyendo el cáncer de mama, ovario, vejiga y células escamosas del cérvix.^{8,10,19,20} Se ha sugerido que la amplificación y/o sobreexpresión de HER-2/neu es un indicador de mal pronóstico en los carcinomas de mama, ovario y gástrico.^{6,8,18,19} Su relevancia clínica y su significado pronóstico no han sido establecidos aún definitivamente.

En la actualidad se dispone de escasa información en lo que respecta a la mutación y amplificación génica en muestras no cancerosas positivas

para VPH. Estos cambios genéticos son muy importantes en la transición de las células al fenotipo neoplásico. En el cáncer cervical la presencia de VPH es un factor crucial pero no suficiente en la promoción de la transformación celular. Por ello, el estudio de los factores genéticos del hospedador es el único camino para identificar los pacientes de alto riesgo.

Para la evolución gradual del estado premaligno al maligno deben ocurrir múltiples cambios genéticos. Específicamente, ha sido bien establecida la relación entre el VPH y los genes supresores de tumores, tales como p53 o Rb.^{21,22} Sin embargo, son necesarios otros cambios genéticos para la progresión tumoral. En estudios previos, en muestras no cancerosas ha sido demostrada la asociación entre la infección con VPH de alto riesgo y la mutación en el codón 12 del proto-oncogén K-ras,²³ indicando que este oncogén podría cooperar en la transformación maligna.

En este estudio se encontró una asociación entre la amplificación del proto-oncogén HER-2/neu y el estado citopatológico CIN I, lo cual podría reflejar un cambio genético más, necesario para la evolución a cierto grado de displasia, aunque no suficiente para la total transformación neoplásica.

De las muestras analizadas correspondientes al subgrupo citológico CIN I e infectadas con VPH-6 94% (16 de 17) se caracterizó por un patrón celular coilocítico, sugiriendo una asociación entre el evento de amplificación génica y este tipo de alteración celular. Debido a que un elevado porcentaje de las células con este grado de displasia puede revertir a un epitelio citológicamente normal,⁵ la amplificación de HER-2/neu aparentemente sería insuficiente, por sí sola, para causar la transformación tumoral.

Aunque los resultados obtenidos demuestran que las alteraciones genéticas, incluyendo la amplificación génica, pueden ser estudiadas en estadios tempranos de la progresión de la enfermedad, algunas limitaciones deben ser consideradas. Primero, al provenir las muestras del exocérnix la

relación células normales a mutantes es elevada, dificultando la observación de los eventos de amplificación. En segundo lugar, al ser necesarias múltiples alteraciones genéticas para conducir a la transformación celular, deberían evaluarse simultáneamente más de un proto-oncogén, además de genes supresores de tumores, para determinar el riesgo de la progresión de dicha enfermedad.

Finalmente, sería importante evaluar la expresión génica de HER-2/neu en los diferentes grupos de riesgo (según el tipo de VPH) y del estado citopatológico, con el objetivo de estimar con mayor precisión su rol biológico y su significado pronóstico en la carcinogénesis cervical.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA) y a la Dra. María Mercedes Lojo por la tipificación en parte de las muestras. El trabajo fue realizado gracias a los subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Bibliografía

1. Zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991; 184: 9-13.
2. Parkin D, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; 54: 594.
3. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 1994; 44(1): 7-26.
4. Gissman L. Human Papillomavirus and genital cancer. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 253-261.
5. Ross D. Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine. Ed Word Crafters. Springer Press, New York. 1998.
6. Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol* 1999; 26(4): 51-59.
7. Bahman S, Jones LA, El-Naggar A, Felix JC, George J et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB-2) in endometrial cancers: correlation with overall survival. *Cancer Res* 1995; 55: 5693-5698.
8. Medl M, Sevela P, Doz MD. DNA amplification of HER-2/neu and INT-2 oncogene in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1995; 59: 321-326.
9. Depowski PL, Brien TP, Sheehan CE, Stylos S, Johnson RL et al. Prognostic significance of p34cdc2 cyclin-dependent kinase and MIB1 overexpression, and HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence *in situ* hybridization in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999; 112(4): 459-469.

10. Fernandes A, Hamburger AW, Gerwin BI. ErbB-2 kinase is required for constitutive stat 3 activation in malignant lung epithelial cells. *Int J Cancer* 1999; 83(4): 564-570.
11. Oh JJ, Grosshans DR, Wong SG, Slamon DJ. Identification of differentially expressed genes associated with HER-2/neu overexpression in human breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(20): 4008-4017.
12. Roland PY, Stoler MH, Broker TR, Chow LT. The differential expression of the HER-2/neu oncogene among high-risk human papillomavirus-infected glandular lesions of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177(1): 133-138.
13. Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, Van den Broek LJ, Uljee SM et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5(3): 577-586.
14. Ting Y, Manos MM. Detection and typing of genital human papillomavirus. In: Innis MA, Gelfand DH, Sneinsky JJ and White TJ (eds). *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego 1990: 356-367.
15. Evander M, Edlund K, Bodun E. Comparison of a one-step and two-step polymerase chain reaction with the degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 987.
16. Drut R, Drut RM, Gómez MA, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. *JPGN* 1998; 27: 530-535.
17. Lönn U, Lönn S, Nylén U. Gene amplification detected in carcinoma cells from human urinary bladder washings by the Polymerase Chain Reaction Method. *Cancer* 1993; 71: 3605-3610.
18. Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res* 1992; 12: 419-425.
19. Underwood M, Bartlett J, Reeves J. c-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res* 1995; 55: 2422-2430.
20. Mitra AB, Murty VS, Pratap M. ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1994; 54: 637-639.
21. Barbosa MS. The oncogenic role of Human Papillomavirus proteins. *Critical Reviews in Oncogenesis* 1996; T1-18.
22. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degeneration of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.
23. Golijow CD, Mourón SA, Gómez MA, Dulout FN. Differences in K-ras codon 12 mutation frequency between "high-risk" and "low-risk" HPV infected samples. *Gynecol Oncol* 1999; 75(1): 108-112.



Encuentro de Inmunohematología y Medicina Transfusional

31

Houston, Texas, Junio 8 - 11, 2000

Patrocinado por:

UT M.D. Anderson Cancer Center,
Servicio de Transfusión y Banco de Sangre

Gamma Biologicals, Inc.
A Division of Immucor, Inc.

Cobe BCT, Inc.
A Division of GAMBO, Inc.

Baxter Healthcare
Corporation

Grupo Cooperativo Iberoamericano de
Medicina Transfusional

Para más información sírvase escribir a:

Benjamin Lichtiger, MD, PhD, MBA
1515 Holcombe Blvd., Box 73
Houston, Tx. 77030
USA
E-mail: blichtig@mdanderson.org

F. Enrique Alvarez BS, MT, CLS (NCA), CQA (ASQ)
1515 Holcombe Blvd., Box 73
Houston, Tx. 77030
USA
E-mail: ealvarez@mdanderson.org

The University of Texas
MD ANDERSON
CANCER CENTER