

DETECCIÓN MOLECULAR DE REGIONES ONCOGÉNICAS E6 Y E7 DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO MEDIANTE PCR EN PACIENTES PAPANICOLAOU NEGATIVO DEL INSTITUTO REGIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS DE LA LIBERTAD

Molecular detection of oncogenic regions E6 and E7 of HPV by PCR in patients with negative PAP diagnosis of the “Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas” of La Libertad

Josué Arteaga-Núñez^{1*}, Luis Rodríguez-Delfín²; Manuel Pesantes-Vera³; Miryam Villanueva-Baltuano⁴

Laboratorio de Investigación y Diagnostico GEN-MOL¹, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.² Universidad Nacional de Trujillo³. Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas.⁴

bio.joshua-science@live.com*

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo detectar regiones oncogénicas E6 y E7 de Virus del Papiloma Humano mediante PCR en pacientes Papanicolaou negativo del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas de La Libertad. Se seleccionaron 20 muestras Papanicolaou negativo y se procedió a extracción de ADN utilizando el kit “High Pure PCR Template Preparation Kit” de Roche. La amplificación de genes L1 y L2 se realizó utilizando el set de primers genéricos MY09/11 y GP5+/6+, seguido la amplificación de oncogenes E6 y E7 utilizando primers específicos para genotipos de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33 y 52) y bajo riesgo (VPH 6/11). Se obtuvo como resultado que el 75 % de pacientes presentaron oncogenes E6 y E7 de VPH 16, el 15 % de VPH 52, el 10 % de VPH 18, el 5 % VPH 33, 0 % de VPH 31 y el 20 % de VPH 6/11. También se observó que un 50 % presentaron infecciones simples por VPH 16 y 20 % por VPH 6/11, mientras que un 25 % presentaron infecciones múltiples por VPH 16, 18, 33 y 52. Se concluyó que se detectó regiones oncogénicas E6 y E7 de VPH 16, 18, 33, 52 y 6/11 mediante PCR en pacientes Papanicolaou negativo, con alta incidencia de oncogenes de VPH 16, y en menor grado VPH 6/11, 18, 33, y 52.

Palabras clave: Regiones oncogénicas E6 y E7, Virus del Papiloma Humano, PCR.

ABSTRACT

This study aimed to detect oncogenic regions E6 and E7 of Human papillomavirus by PCR in patients with negative Pap diagnosis of the “Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas” of La Libertad. 20 negative Pap samples were selected and DNA extraction was performed using "High Pure PCR Template Preparation Kit" of Roche. L1 and L2 genes amplification was performed using the generic primers sets MY09/11 and GP5+/6+, followed by E6 and E7 oncogenes amplification using specific primers for high risk genotypes (HPV 16, 18, 31, 33 and 52) and low risk (HPV 6/11). The result was that 75 % of patients had E6 and E7 oncogenes of HPV 16, 15 % of HPV 52, 10 % of HPV 18, 5 % of HPV 33, 0 % of HPV 31 and 20 % of HPV 6/11. Furthermore, it was observed that 50 % had HPV simple infections HPV 16 and 20 % of HPV 6/11, while 25 % had multiple infections by HPV 16, 18, 33 and 52. We concluded that the oncogenic regions E6 and E7 of HPV 6/11, 16, 18, 33 and 52 were detected by PCR in patients with negative Pap diagnosis, showing high incidence of oncogenes of HPV 16 and lesser extent HPV 6/11, 18, 33 and 52.

Key words: Oncogenic regions E6 and E7, Human Papillomavirus, PCR.

Recibido: 13 Diciembre de 2014

Aceptado: 8 de Junio de 2015

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad en mujeres a nivel mundial.¹ Durante los últimos 40 años en Canadá, Estados Unidos y otros países económicamente consolidados la incidencia de CaCu se presenta con tasas significativamente bajas, inferiores a 10 casos por cada 100000 mujeres. Sin embargo, en la mayoría de los países de América Latina y el Caribe, las tasas anuales se mantienen altas, generalmente por arriba de 20 casos por cada 100000 mujeres. En el año 2012 se presentaron 527624 casos de esta patología, y fue el responsable de 265653 muertes en el mundo.² De estos casos más del 85 % ocurren en países en desarrollo, donde el 94 % afecta a mujeres con una mortalidad cercana al 50 %.^{2,3} La prevalencia de infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) alrededor del mundo en mujeres va de un 2 % a un 44 %, siendo más alta entre mujeres jóvenes, disminuyendo las cifras conforme la edad aumenta.^{4,5}

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en el año 2012 reportaron que en el Perú se presentaron 4636, casos provocando 1715 muertes, estimándose una tasa de incidencia y mortalidad de 32.66 y 11.99 respectivamente, así mismo con una tasa de prevalencia de 144.78 por 100000 mujeres.² La incidencia de infección con tipos virales oncogénicos, parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos, dado que es originado, entre otros factores, por algunos genotipos oncogénicos de VPH, los cuales se encuentran en casi todos los casos, motivo por el cual se le ha considerado como una “causa necesaria”.⁶

En la actualidad los papilomavirus están agrupados en familias diferentes: los *Polyomaviridae* y los *Papillomaviridae*. Dentro de la familia *Papillomaviridae* se ha establecido la existencia de 18 géneros. Los papilomavirus humanos se encuentran ubicados en los géneros Alfa-papillomavirus, Beta-papillomavirus, Gama-papillomavirus, Mu-papillomavirus y Nu-papillomavirus.^{7, 8} Los papilomavirus que infectan otras especies están contenidos en los otros géneros. Dentro de los géneros establecidos en los Alfa-papillomavirus se determinó la existencia de 15 especies distintas, en las cuales la especie 7 comprende el VPH 18 y tipos relacionados genómicamente como el VPH 39, 45, 59, 68, 70. En la especie 9 se encuentra el VPH 16 y tipos relacionados

como VPH 31, 33, 35, 52, 58, 67. La especie 10 contiene el VPH 6 y tipos relacionados como VPH 11, 13, 44 y 74, siendo los tipos virales contenidos en esta especie aislados en lesiones benignas.⁸

Los estudios realizados en VPH revelan que el genoma está constituido por 7200-8000 pb, con un tamaño de 45-55 nm de diámetro y una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros que rodean al genoma.⁹ El genoma se divide en tres regiones: una región temprana E (Early) la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular, una región Tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales de la cápside (L1 y L2), y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (Long Control Región), que contiene la secuencia de ADN que permiten el control de la replicación y de la expresión del genoma viral.¹⁰

Los fenómenos moleculares que hacen que una lesión productiva progrese a neoplasia y finalmente a cáncer, parece que están relacionados con cambios en la expresión de los genes virales, en particular, con un aumento de la expresión de E6 y E7. El desarrollo de cáncer cervical, requiere además una desregulación continua de estos oncogenes virales, que se verá facilitada por la integración del ADN del VPH en el cromosoma de la célula hospedadora.¹¹

Se considera que el proceso de integración del genoma del VPH al genoma de la célula hospedadora es el evento fundamental en la progresión a cáncer debido a las oncoproteínas E6 y E7 por la pérdida de E2, proteína implicada en su regulación.¹² Las evidencias que soportan el papel causal de estos oncogenes en el desarrollo de tumores son las siguientes: los oncogenes E6 y E7 se expresan en forma constante en células cancerosas; los mecanismos que regulan la expresión de E6 y E7 están ausentes en las células cancerosas, el bloqueo de la función de los genes E6 y E7 lleva a la re-versión del fenotipo maligno de las células cancerosas, y estas oncoproteínas se unen e interactúan respectivamente con las proteínas celulares p53 y pRb que son proteínas reguladoras del ciclo celular.¹³ Los VPH de bajo riesgo aunque estimulan la proliferación celular, son aparentemente incapaces de inducir mutaciones, y la progresión tumoral dependería más de factores externos no bien conocidos. La conversión maligna con estos tipos de

VPH es rara y cuando ocurre se producen carcinomas verrugosos, localmente invasivos, pero sin potencial metastásico.¹⁴

El gen E6 es uno de los primeros que se expresan durante el ciclo viral, y codifica la oncoproteína E6, la cual está compuesta de 150 aminoácidos con dos dominios de dedos de zinc altamente conservados, caracterizados por la presencia del motivo Cys-X-X-Cys, cuya integridad es esencial para su función y se encuentra distribuida tanto en el citoplasma como en el núcleo.^{15,16} Esta tiene la capacidad de unirse a un sin número de blancos celulares en la que le permite bloquear la apoptosis, regular la transcripción viral, abatir la diferenciación celular y las interacciones célula-célula, e incrementar la inestabilidad cromosómica.^{17,18} Estudios al respecto reportan que los tumores inducidos por estos virus son debidos en buena parte al hecho que la oncoproteína E6 interactúa dentro de la célula con la proteína supresora de tumores P53 al mismo tiempo que lo hace con E6AP. La formación del complejo ternario P53-E6-E6AP permite que P53 sea ubiquitinada por E6AP, lo cual induce la degradación de aquélla en el proteosoma y facilita el desarrollo tumoral.^{19,20,21} La oncoproteína E6 al unirse a p53 también puede producir su retención en el citoplasma, bloqueando su translocación hacia el núcleo, por tanto inhibiendo su función, independiente del proceso de degradación.²²

El gen E7 codifica la oncoproteína E7 que es un polipéptido de aproximadamente 100 aminoácidos y presenta tres dominios; CR1 donde se encuentra en el extremo amino terminal, CR2 el cual contiene un motivo LXCXE donde se une la proteína pRb y CR3 por medio del cual forma dímeros vía a un motivo de dedos de zinc.²³ Esta oncoproteína es capaz de unirse a múltiples blancos celulares y virales. Si bien el blanco principal de E7 es Rb, la lista de blancos celulares alternativos es muy extensa desconociéndose en muchos casos la consecuencia funcional de dichas interacciones. No existe hasta el momento consenso sobre cuál o cuáles de los blancos celulares con los que E7 interactúa. Sin embargo, el número de blancos es asombrosamente grande, por otro lado, ninguna de las interacciones puede explicar por sí sola el fenotipo celular que produce la transformación con E7.^{24,25} La proteína retinoblastoma (pRb), es un miembro de la familia de “proteínas de bolsillo” que incluye a p107 y p130. Estas proteínas contienen regiones homólogas para su unión a E7 del VPH. La proteína supresora de

tumores pRb, es el principal regulador negativo del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S. Al final de la fase M, es defosforilada por una fosfatasa específica. En este estado de hipofosforilación, la proteína se encuentra activa y se evita la progresión a la fase S del ciclo celular. En el estado hiperfosforilado de pRb puede establecer un complejo con la oncoproteína E7 e inducir a su degradación. La activación de pRb induce a la acción constitutiva del factor de transcripción E2F, el cual induce a la activación de genes involucrados en la síntesis de ADN.²⁶

En cuanto a la detección molecular y la tipificación de VPH, dos métodos de PCR convencional son relevantes para la detección del ADN: la PCR tipo específico y la PCR general o de amplio espectro.²⁷ El método de PCR general más usada es el que amplifica el gen L1 que codifica proteínas estructurales para ello se ha utiliza los cebadores MY09/MY11, pero tienen en contra el gran tamaño del fragmento diana (450-500 pb) lo que disminuye la sensibilidad, otros cebadores conocidos con un tamaño de 150-170 pb son GP5+/GP6+ con una mayor sensibilidad, la desventaja en general de este sistema de PCR es que el ORF (Open Reading Frame) del gen que se usa como blanco puede perderse cuando el virus se integra en el genoma de la célula hospedera (lo que sucede con frecuencia en los tipos oncogénicos), por lo que se desarrollaron sistemas de PCR tipo específica; que utilizan oligonucleótidos para los genes E6 y E7, los cuales se mantienen intactos durante la integración viral, del mismo modo, estos genes admiten el empleo de otras variantes de PCR como el PCR tiempo real, que permite determinar carga viral.^{27,28,29}

Por la importancia expuesta de tales genes transformantes responsables de la expresión de oncoproteínas que están directamente relacionadas a la progresión de cáncer invasivo, la presente investigación tuvo como objetivo principal, detectar las regiones oncogénicas E6 y E7 de Virus del Papiloma Humano mediante PCR en pacientes Papanicolaou negativo del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas de La Libertad. Así mismo, como objetivos secundarios, determinar el grado de incidencia tipificando oncogenes de alto y bajo riesgo, así como también, evaluar el tipo de infección que presenta cada paciente a causa de la presencia simultánea de ciertos genotipos de VPH.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN Y MUESTRA

1.1. Población de estudio

Se estudiaron aquellas pacientes que acudieron a la consulta de patología cervical en el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas "IREN" de La Libertad, de acuerdo a los reportes epidemiológicos realizados en Trujillo en el año 2013, se reportaron que 921 pacientes fueron diagnosticadas Pap negativo. Según los datos estimados por el IREN utilizando la técnica de Papanicolaou en diagnósticos de VPH se estimó que en una población aproximadamente el 65 % de pacientes no presentan esta patología, y el error de diagnóstico de este tipo de análisis de dar resultados falsos es el 20.5 %. El número de pacientes ($n=20$) se determinó de acuerdo a la fórmula estadística para variables cualitativas teniendo en cuenta la presencia y ausencia de tal enfermedad.

$$n = \frac{T^2 * N * P * Q}{E^2(N - 1) + T^2 * P * Q}$$

$$= \frac{1.96^2 * 921 * 0.65 * 0.35}{0.205^2(921 - 1) + 1.96^2 * 0.65 * 0.35}$$

$$n \approx 20$$

$$T_{(gl\infty; a; 0,05)}: 1.96$$

N: Población diagnóstico Pap negativo

P: % muestras sin VPH

Q: 1-P

E: Error

1.2. Recopilación de datos

En esta investigación fue necesario aplicar previamente un documento de consentimiento informado aprobado por el comité de ética en investigación del IREN, en el cual se especifica las estipulaciones para que cada paciente otorgue la autorización y procesar la muestra en la etapa de ejecución. La recopilación de datos se llevó a cabo en entrevistas orientadas a recabar información personal mediante una ficha de datos: fecha de toma de muestra, datos de identificación del paciente, número de gestaciones, número de parejas sexuales, ITS diagnosticadas, modo de protección anticonceptiva, edad de inicio de relaciones sexuales, aspecto del cuello uterino, y otras observaciones realizadas por el ginecólogo.

1.3. Toma de muestra

Las muestras fueron tomadas por el ginecólogo encargado del IREN, y se realizó en el Centro de Prevención y Detección del Cáncer siguiendo el protocolo adecuado con el fin de no atentar contra la salud de la paciente. Obtenida la muestra se colocó en un tubo cónico de 15 ml contenido 10 ml del medio tampón Fosfato Salino (PBS: 8 g de ClNa, 0.2 g de ClK, 0.2 g de PO_4KH_2 y 1.44 g de $PO_4HNa_2 \cdot 2H_2O$ a pH 7.3) para luego ser conservadas a $-10^\circ C$.

1.4. Papanicolaou (Pap)

Fueron seleccionadas 20 muestras cuyos resultados fueron negativos después de haber sido procesados mediante la técnica convencional de Papanicolaou, y leídos en el Centro de Prevención y Detección del Cáncer del IREN se consideraron criterios de inclusión: pacientes con SIS, muestras tomadas en campañas en el año 2014, pacientes con resultados Pap negativo, pacientes entre 38-62 años de edad y criterios de exclusión: muestras conservadas en años anteriores, pacientes con cáncer cervicouterino, pacientes en gestación, resultados Pap positivo, pacientes con vacunas contra VPH.

2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en el laboratorio de investigación y diagnóstico GEN-MOL de Trujillo. Para esto se utilizó el kit "High Pure PCR Template Preparation Kit" de Roche. Por lo cual se descongeló las muestras conservadas a $-10^\circ C$, se centrifugó por 5 min a 4000 rpm, después se descartó el sobrenadante hasta quedar aproximadamente 0,5 ml de PBS (inmerso el pellet). Se marcaron microtubos de 1.5 ml por muestra de cada paciente y en estos agregó 0.5 ml de PBS, se centrifugó por 3 min a 6000 rpm, se descartó el sobrenadante hasta quedar solo el pellet de células. Luego se agregó 200 μl de lysis buffer y 40 μl de proteinase K para incubación por 30 min a $55^\circ C$. Se extrajo los microtubos y se agregó 200 μl de binding buffer para después ser incubado por 15 min a $70^\circ C$. Se extrajo los microtubos y después se agregó 300 μl de isopropanol y se homogenizó la muestra. Esto se trasladó a tubo de filtro dentro de una columna y se centrifugó por 5 min a 6000 rpm. Se desechó el flujo atravesado y dentro de una nueva columna se agregó 500 μl de inhibitor removal buffer, se centrifugó por

5 minutos a 6000 rpm, se desechó el flujo atravesado y la columna. Se introdujo el tubo de filtro en una nueva columna y se agregó 500 µl de wash buffer, se centrifugó por 3 min a 6000 rpm, desechando el flujo colectado y la columna (se repitió esto 2 veces). Se introdujo el tubo de filtro en un microtubo de 1.5 ml y se agregó 100 µl de elution buffer, se dejó reposar por 15 min, se centrifugó por 2 min a 10000 rpm. Posterior a esto se agregó 50 µl de elution buffer, se dejó reposar por 5 min, y se centrifugó a 2 min por 10000 rpm. Finalmente se trasladó el ADN obtenido a un microtubo de 600 µl y se refrigeró a 4 °C.

2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Obtenido el ADN en microtubos de 600 µl se procedió a amplificar las regiones que codifican proteínas de la cápsida (L1 y L2) para detección inespecífica de VPH (PGM), después una amplificación selectiva para detectar regiones oncogénicas E6 y E7 y tipificar a los genotipos de HR-VPH (VPH 16, 18, 31, 33 y 52) y LR-VPH (VPH 6/11). Para la amplificación se utilizó primers diseñados para cada genotipo de VPH (Tabla 1). Se utilizaron microtubos de 250 µl en estos se agregó 23.0 µl del PRE-MIX de reacción (Tabla 2) y 3.0 µl del ADN (26.0 µl por reacción), simultáneamente se preparó un control positivo y negativo para cada genotipo. Se programó 30 ciclos en un termociclador modelo Applied Biosystems 2720, siguiendo las fases de amplificación; etapa inicial de desnaturalización (T°1; 94 °C por 3 min), etapa de desnaturalización (T°2; 94 °C por 45 s), etapa de

hibridación (T°3; 40-58 °C por 45-120 s), etapa de elongación (T°4; 72 °C por 45-60 s), y etapa de elongación final (T°5; 72 °C por 3 min).

2.3. Electroforesis y tinción con nitrato de plata

Se preparó gel de poliacrilamida al 4 % (12 ml de agua destilada, 4 ml de TBE 5 X, 4 ml de solución acrilamida-bisacrilamida (20:1), 25 µl de N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina (TEMED) y 250 µl de persulfato de amonio (APS) al 10 %), se implementó la cámara de electroforesis agregando TBE 1X. Después de la amplificación en cada microtubo se agregó 2.0 µl de buffer de carga (azul de bromofenol), se mezcló y depositó 28.0 µl de muestra en cada pozo. Se analizaron 12 muestras por cada corrido electroforético, se corrió simultáneamente en el mismo gel un patrón de corrido, además, de un control negativo, positivo y 1.5 µl de marcador de peso molecular de 100 pb y 1 kb, luego se sometió a una carga de 92 volt por 55 min. Se extrajo el gel, se depositó en 100 ml de solución fijadora por 2 min, luego por 10 min en la solución de tinción (0.3 g de AgNO₃, 50 ml del fijador y 300 de agua destilada) se lavó 3 veces con agua destilada, se agregó 100 ml de solución de revelado (15 g de NaOH, 2.5 ml de formaldehído y 500 ml de agua destilada) por 20 min y se descartó, finalmente se agregó 100 ml de la solución fijadora recuperada para neutralizarla reacción, seguido se llevó a visualización en un trasluminador de luz blanca obteniendo los perfiles electroforéticos como resultado.

Tabla 1. Set de primers genéricos para amplificación de L1 y L2 y específicos para amplificación de regiones oncogénicas E6 y E7.

<i>Genotipos</i>	Primers	Amplicón (pb)
<i>PGM</i>	MY09; 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' MY11; 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'	450-500
	GP5+; 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3' GP6+; 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'	150
<i>VPH 16</i>	Pr1; 5'-ATC ATC AAG AAC ACG TAG AG-3' Pr2; 5'-GAT CAG TTG TCT CTG GTT GCA AAT-3'	100
<i>VPH 18</i>	Pr1; 5'-GAT TTC ACA ACA TAG CTG GG-3' Pr2; 5'-TGC CTT AGG TCC ATG CAT AC-3'	127
<i>VPH 31</i>	Pr1; 5'-GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G-3' Pr2; 5'-CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A-3'	263
<i>VPH 33</i>	Pr1; 5'-ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA-3' Pr2; 5'-GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA-3'	398
<i>VPH 52</i>	Pr1; 5'-TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG-3' Pr2; 5'-CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT-3'	229
<i>VPH 6/11</i>	Pr1; 5'-TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC-3' Pr2; 5'-TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT-3'	334

Tabla 2. PRE-MIX de amplificación (23.0 µl) para VPH.

REACTANTES	[Stock]	Vol (µl)	[final]
H ₂ O mQ estéril		12.5-15.5	
Tampón de Reacción	10 X	2.5-5.5	1-4 X
MgCl ₂	25 mM	1.8-3.8	2.0-4.1 mM
dNTPs	2.5 mM	2.0	217.4 µM
Primers (F+R)	25 µM	1.0	1 µM
Taq Polimerasa	5 U/µl	0.2	1 U

RESULTADOS

Se analizaron 20 muestras cuyos resultados fueron negativos aplicando la técnica convencional de Papanicolaou, aparentemente estos pacientes con un rango de 38 a 62 años de edad son sanos, y las observaciones realizadas por el especialista en ginecología oncológica reportó que en todos los casos evaluados presentan el cuello uterino con aspecto anatómico normal, solo un caso se reportó cuello uterino congestivo (caso 2). Como resultado se muestran los perfiles electroforéticos que evidencian el amplicón como un producto de la amplificación de las regiones oncogénicas. Así mismo, para la detección VPH inespecífico mediante la

amplificación de genes que codifican proteínas estructurales (L1 y L2). Se utilizó los primers genéricos MY09-MY11 cuyo amplicón es de 450-500 pb encontrándose que en el 95 % de muestras presentan algún genotipo de VPH (Fig. 1). También se utilizó los cebadores GP5+-GP6+ cuyo amplicón de 150 pb confirmó la presencia de VPH inespecífico en 4 muestras seleccionadas (Fig. 2).

En las muestras evaluadas para detección de regiones oncogénicas E6 y E7 de VPH de alto riesgo, se mostraron una alta frecuencia en cuanto a detección de oncogenes de VPH 16 encontrándose en los perfiles electroforéticos 15 de los 20 casos (75 %).

(Fig. 3 y 4). En cuanto a la detección de oncogenes de VPH 18 se mostraron 2 de 20 casos (10 %) lo que revela una frecuencia relativamente baja de tales oncogenes (Fig. 4). Además, se encontraron oncogenes de VPH 33 en 1 de 20 casos (5 %) (Fig. 5). Se encontraron oncogenes de VPH 52 en 3 de 20 casos (15 %) (Fig. 6), y para VPH 31 no se detectaron oncogenes en los casos evaluados.

La frecuencia de oncogenes E6 y E7 de VPH 6 y 11 es moderada y se consideró la misma dado que los sitios de reconocimiento del genoma para los primers

son similares para ambos genotipos, y en el perfil electroforético se detectaron en 4 de los 20 casos evaluados (20 %) (Fig. 7).

Analizando todas las pacientes evaluadas se determinó que el 70 % presenta una infección simple; 50 % de pacientes presentan oncogenes E6 y E7 de VPH 16, y el 20 % de VPH 6/11. Así mismo, el 25 % presentaron infecciones múltiples: el 10 % de VPH 16 y 18, el 10 % de VPH 16 y 52 y el 5 % de VPH 16, 33 y 52 (Tabla 3).

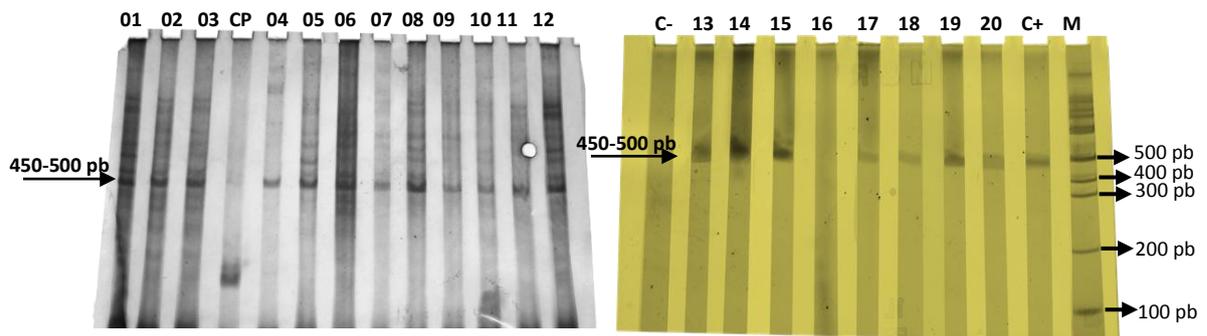


Fig. 1. Detección de VPH mediante PCR con primers MY09-MY11. 01-20: Muestras de estudio, C-: Control negativo, C+: Control positivo, M; Marcador de peso molecular (100 pb), CP: Patrón de corrido (150 pb).

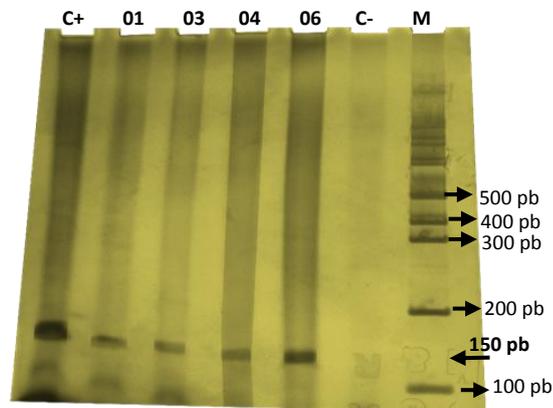


Fig. 2. Detección de VPH mediante PCR con iniciadores GP5+-GP6+. 01-06: Muestras de estudio, C-: Control negativo, C+: Control positivo, M: Marcador de peso molecular (100 pb).

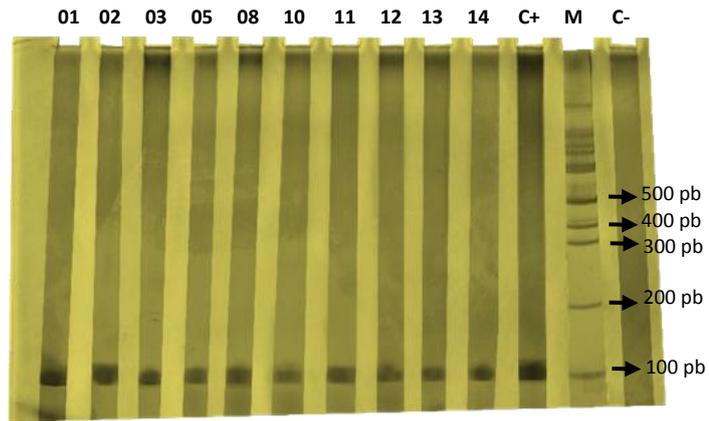


Fig. 3. Detección de oncogenes E6 y E7 de VPH 16 (100 pb) mediante PCR. 01-14: Muestras de estudio, C-: Control negativo, C+: Control positivo, M: Marcador de peso molecular (100 pb).

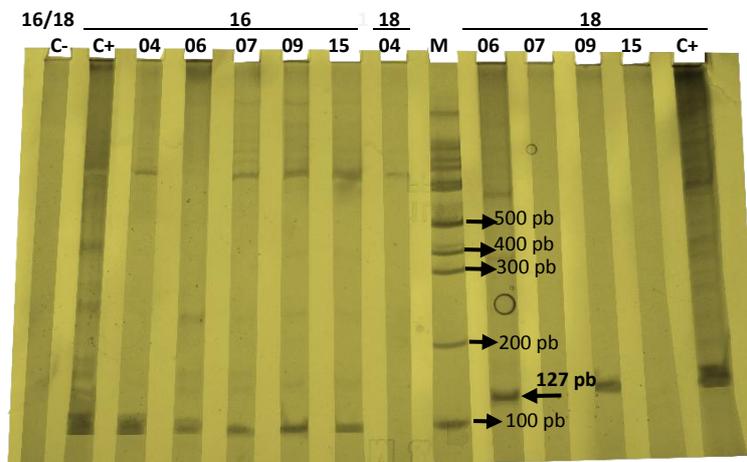


Fig. 4. Detección de oncogenes E6 y E7 de VPH 16 (100 pb) y VPH 18 (127 pb) mediante PCR. 04-15: Muestras de estudio, 16 y 18: Genotipos de VPH, C-: Control negativo, C+: Control positivo, M: Marcador de peso molecular (100 pb).

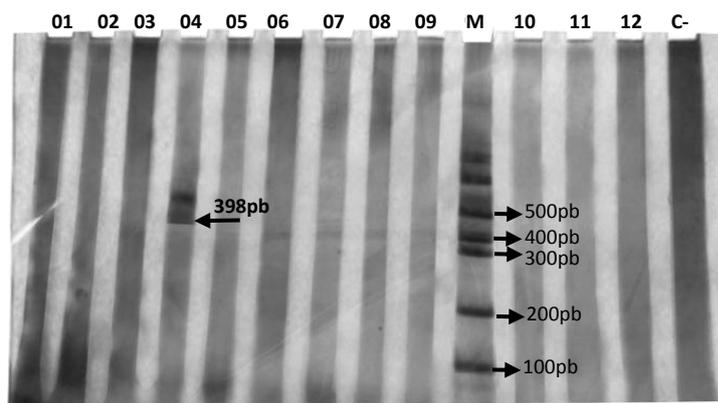


Fig. 5. Detección de oncogenes E6 y E7 de VPH 33 (398 pb) mediante PCR. 01-12: Muestras de estudio, C-: Control negativo, M: Marcador de peso molecular (100 pb).

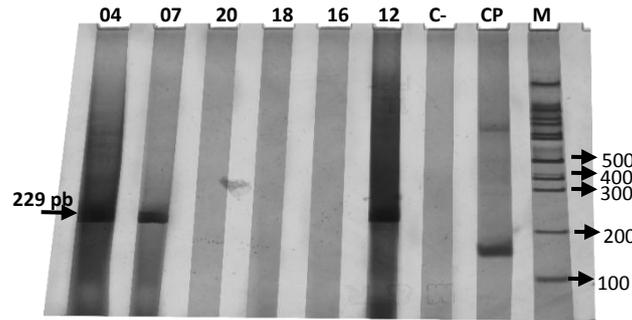


Fig. 6. Detección de oncogenes E6 y E7 de VPH 52 (229 pb) mediante PCR. 04-12: Muestras de estudio, C-: Control negativo, CP: Patrón de corrido (150 pb), M: Marcador de peso molecular (100 pb).

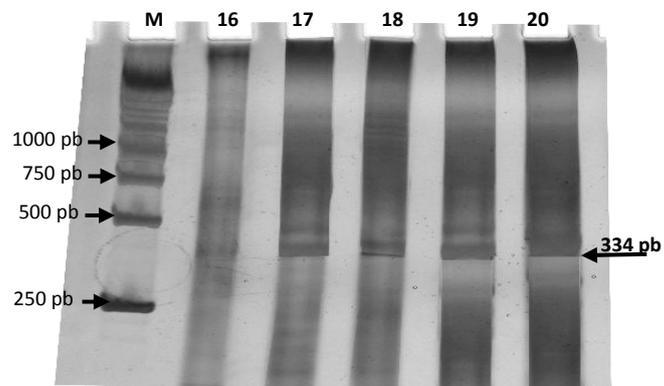


Fig. 7. Detección de oncogenes E6 y E7 de PVH 6/11 (334 pb) mediante PCR. 16-20: Muestras de estudio, M: Marcador de peso molecular (1 kb).

Tabla 3. Relación de casos encontrados con infecciones simples y múltiples de VPH.

casos	Oncogenes (E6 y E7) de genotipos encontrados			
	Infecciones simples		Infecciones múltiples	
	LR-VPH	HR-VPH	LR-VPH	HR-VPH
1		16		
2		16		
3		16		
4				16, 33, 52
5		16		
6				16, 18
7				16, 52
8		16		
9				16, 18
10		16		
11		16		
12				16, 52
13		16		
14		16		
15		16		
16	-	-	-	-
17	6/11			
18	6/11			
19	6/11			
20	6/11			

DISCUSIÓN

A nivel mundial el cáncer de cuello uterino se ha estudiado que en el 99 % de los casos tratados está implicado algún genotipo de VPH. Por tanto, se ha seleccionado genotipos que en investigaciones anteriores registran mayor incidencia de grupos de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 52) así como también grupos de bajo riesgo cuyos genotipos (VPH 6 y 11) son los más frecuentes por causar verrugas genitales o cambios leves en el cuello uterino.^{30,31,32}

La determinación de frecuencia de oncogenes de VPH está basado en la detección de ADN viral en regiones altamente conservadas como parte del genoma. Los sets de primers MY09/11 y GP5+/6+ han sido considerados en esta investigación para desarrollar la detección inespecífica de VPH, dado que la sensibilidad usando ambos sistemas de primers es del 94 % lo cual hace una herramienta indispensable en la detección.³³ Sin embargo, la detección superficial de VPH no determinan el grado de neoplasia cervical que podría causar un genotipo viral.

Hasta el momento en nuestra región no existen reportes previos a esta investigación; por ello es de suma importancia y necesidad desarrollar un nuevo enfoque totalmente basado en PCR para la detección sensible y específica de los genotipos de VPH. La detección mediante PCR de VPH presenta una sensibilidad aproximada del 90 %, con un intervalo más compacto (84.9-100 %) y no varía con la edad. Mientras que en los análisis citológicos la especificidad se incrementa con la edad y resulta más baja.²⁷ Por lo tanto, en base a la PCR se implementó sets de primers que amplifiquen en las secuencias de los oncogenes E6 y E7, estos primers que se hibridan en regiones altamente específicas dentro de estos oncogenes han demostrado una alta especificidad para amplificar el ADN de todos los genotipos de alto riesgo y algunos de los más prevalentes de bajo riesgo. Además, los alineamientos de secuencia con las correspondientes regiones a E6 y E7 son de un amplio espectro, por tanto, estos primers también serían capaces de amplificar el ADN de infecciones de VPH infectando el epitelio de otros órganos con una eficiencia comparable.³⁴

Un enfoque similar se ha descrito recientemente por Sasagawa et al.³⁵ sus iniciadores LCR-E7 se encuentran en regiones específicas cercanas a las

contempladas por los cebadores utilizados en nuestro estudio. Para permitir la tipificación exacta, no sólo en una infección simple, sino también en múltiples infecciones por VPH.

En las pacientes evaluadas se encontraron una alta frecuencia de oncogenes de VPH 16 (75 %). Resultados que coinciden con las investigaciones realizadas por Koutsky et al.³² quienes estimaron que más del 52 % de casos se le atribuye una infección por VPH de alto riesgo específicamente del tipo 16 provocando un grado de displasia del tipo 2 y 3 en las observaciones realizadas. Melo et al.³⁶ reportaron que el 81.6 % de casos evaluados mediante la Reacción de Polimerasa en Cadena anidada dirigida al gen L1 (RPCL1) presentaron VPH 16 siendo el más frecuente de 44 biopsias de adenocarcinoma cervical (ACC).

En cuanto VPH 18 se obtuvo una baja frecuencia oncogénica del 10 % resultados análogos con los que obtuvieron Zehbe et al.³⁷ encontrándose que solo el 13.4 % de pacientes con diagnósticos histológicos con carcinoma escamoso y adenocarcinoma presentaron VPH 18. En todo el mundo la frecuencia de VPH 16 y 18 son relativamente diferentes de acuerdo a las variaciones geográficas el cual juega un papel importante en el predominio de un genotipo sobre el otro, por ejemplo, en una población de mujeres finlandesas se reportó que la frecuencia de VPH 18 fue de 56 % más alta que la de VPH 16 con un 17 %.³⁸ Similar a los resultados obtenidos por Anderson et al.³⁹ quienes encontraron que el genotipo más predominante es el VPH 18 con una frecuencia de 52 % y para VPH 16 con 35 %, evaluados en biopsias de ACC de mujeres suecas, siendo la presencia de VPH significativamente más frecuente en mujeres menores de 40 años.

La incidencia de VPH 31 33 y 52 son bajas menos del 10 % comparables a una investigación publicada por Weimin et al.⁴⁰ quienes determinaron la presencia de VPH en muestras de lavado cervicovaginal obteniendo como resultado 11.1 % para VPH 31, el 3,6 % para VPH 33 y el 3,6 % para VPH 52. Sin embargo, en esta investigación se obtuvo un 15 % de VPH 52, lo que se explica por la investigación de Muñoz et al.³¹ quien postuló que el VPH 52 es el genotipo con más prevalencia en el Perú.

La frecuencia de VPH de bajo riesgo es casi siempre baja, en la presente investigación se encontró un 15 % de casos con oncogenes de VPH 6/11, valores similares a los obtenidos por Sotlar et al.⁴¹ que mediante la PCR anidada múltiple en muestras de exudado cervico-vaginal de mujeres con diagnóstico histológico normal revelaron que solo el 6.7 % de mujeres presentan VPH 6/11.

Se encontró infecciones múltiples en un 25 % de pacientes evaluados los cuales son próximos o están dentro del rango establecido en otras investigaciones. Algunos estudios reportan que se estima que el 10-80 % de pacientes que desarrollan cáncer, lo adquieren por una coinfección por más de un genotipo de VPH. Esta importante variable en la prevalencia se ha atribuido a razones metodológicas en los sistemas de detección mediante PCR y a las características de la población estudiada (factores geográficos, demográficos y clínicos).⁴² Existe una mayor ocurrencia de infecciones múltiples de VPH de alto riesgo, según Wentzensen et al.⁴³ los 7 genotipos que forman combinaciones múltiples son de VPH 16, 18, 45, 33, 31, 52 y 58, Varía de 77,7 % (en infecciones simples) a 86,9 % (en infecciones múltiples). Son diversos los factores asociados a un mayor riesgo de adquirir una infección múltiple por VPH, la edad es uno de ellos, así entre las mujeres jóvenes por debajo

de los 30 años no sólo existe la probabilidad de adquirir mayor infección, sino también la probabilidad de que ésta sea producida por más de un tipo, el estado inmunológico de la paciente también es relevante, el comportamiento sexual es otro factor importante; la edad de inicio de las relaciones sexuales, el número de parejas sexuales y el comportamiento sexual de la pareja están asociados a un mayor riesgo de infección múltiple.⁴⁴

Estos resultados no restan el valor de sensibilidad de una prueba citológica como es el de Papanicolaou o colposcopia. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el VPH es muy frecuente aún en mujeres con Papanicolaou negativo. Por tanto, siempre y cuando existan factores de riesgo, será necesario recomendar una prueba altamente específica como es la PCR para la detección oncogénica de VPH inclusive antes que la célula presente cambios citopáticos, esto ofrecería la posibilidad de cubrir los resultados “falsos negativos” de la citología en cualquier etapa de la vida, más aun en mujeres de edad avanzada, en quienes el cáncer es más frecuente. De esta manera se puede hacer un buen control en las pacientes debido a que en muchos de los casos las lesiones no son perceptibles a estas pruebas, sin embargo, la infección está latente y no quita la posibilidad de desarrollar cáncer.

CONCLUSIONES

Se detectó regiones oncogénicas E6 y E7 de VPH 16, 18, 33, 52 y 6/11 mediante PCR en pacientes Papanicolaou negativo del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas de La Libertad.

Se identificó las regiones oncogénicas E6 y E7 de VPH 16 como la más incidente en un 75 % de las pacientes evaluadas y en menor grado el VPH 6/11

(20 %), VPH 52 (15 %), VPH 18 (10 %) y VPH 33 (5 %).

Se identificó infecciones simples predominantemente de VPH 16 y VPH 6/11 en 50 % y 20 % respectivamente. Además se encontró infecciones múltiples de VPH 16 y 18 (10 %), VPH 16 y 52 (10 %) y VPH 16, 33 y 52 (5 %).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Donoso E, Cuello M, Villarroel L. Reducción de la mortalidad por cáncer cervicouterino en Chile, 1990-2003. *Rev Chil Obstet y Ginecol.* 2006; 71(5):307-312.
2. International Agency for Research of Cancer. Estimated cancer, Incidence, mortality and prevalence worldwide. GLOBOCAN [Internet]. 2012. [Citado 10 Nov 2014]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>.
3. Franco L, Villa L, Sobrinho P. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical Human Papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect Dis.* 1999; 180(5):1415-1423.

4. Giuliano R, Harris R, Sedjo L. Incidence, prevalence and clearance of type specific Human Papillomavirus infections. The Young Women's Health Study. *J. Infect Dis.* 2002; 186(4):462-469.
5. Strauss J, Bunting H, Melnick L. Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas, *J Invest Dermatol.* 1950; 15:433-444.
6. Nobbenhuis A, Helmerhorst J, Van den Brule J, Rozendaal L, Voorhorst J, Bezemer D, et al. Cytological regression and clearance of high-risk Human Papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet*, 2001; 358:1782-1783.
7. De Villiers M, Ruhland A. Do specific Human Papillomavirus types cause psoriasis. *Arch. Dermatol.* 2001; 137(3):384-394.
8. De Villiers M, Fauquet C, Broker R, Bernard U, Zur Hausen H. Classification of Papillomaviruses, *Virology.* 2004; 324(1):17-27.
9. Broken R. Structure and genetic expression of Papillomaviruses. *Obstet Gynecol Pathol.* 2000; 19:16-28.
10. Yee C, Krishnan-Hewlen I, Berjer C, Schlegel R, Howley M. Presence and expression of Human Papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol.* 1985; 119:361-366.
11. Álvarez M, López E. Regulación genética de los Papilomavirus humanos genitales. *Salud Pública de México.* 1995; 37:240-247.
12. Jayshree S, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S. Cell intrinsic y extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *J Med Res.* 2009; 13:286-295.
13. Majewski S, Jablonska S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 36:659-685.
14. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kissel'jov F, Eienkel J, et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene.* 2003; 22:3977-3984.
15. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:342-350.
16. Winer L, Kiviat B, Hughes P, Adam E, Lee K, Kuypers M, et al. Development and duration of Human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dia.* 2005; 191(5):731-738.
17. Dobbs P, Asmussen T, Nunns D, Hollingworth J, Brown R, Ireland D. Does histological incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia following large loop excision of transformation zone increase recurrence rates a six year cytological following up. *Br J Obstet Gynaecol.* 2000; 107:1025-1030.
18. Hahn C, Weinberg A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:331-341.
19. Huibregtse M, Scheffner M, Howley M. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the Human Papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol.* 1993; 13:775-784.
20. Be X, Hong Y, Wei J, Androphy J, Chen J, Baleja D. Solution structure determination and mutational analysis of the papillomavirus E6 interacting peptide of E6AP. *Biochemistry.* 2001; 40:1293-1299.
21. Chen J, Hong Y, Rustamzadeh E, Baleja D, Androphy J. Identification of an alpha helical motif sufficient for association with Papillomavirus E6. *J Biol Chem.* 1998; 273:13537-13544.
22. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287(16):2114-2119.
23. Phelps W, Yee C, Munger K, Howley P. The Human Papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *cell.* 1988; 53:539-546.
24. Moody A, Laimins A. Human Papillomavirus oncoproteins pathways to transformation. *Nature reviews.* 2010; 550-560.
25. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules infection with high-risk vs low-risk Human Papillomaviruses. *APMIS.* 2010; 118:471-493.

26. Werness B, Levine A, Howley B. Association of Human Papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; 248:76-79.
27. Cox T, Cuzick J. "HPV DNA testing in cervical cancer screening: From evidence to policies". *Gynecol Oncol* 2006; 103:8-11.
28. Boulet G, Horvath C, Berghmans S, Bogers J. Human Papillomavirus in cervical cancer Screening: Important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(4):810-817.
29. Morris BJ. Cervical Human Papillomavirus screening by PCR: Advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43(11):1171-1177.
30. Lorincz T, Reid R, Jenson B, Greenberg D, Lancaster W, Kurman J. Human Papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79:328-337.
31. Muñoz N, Bosch X, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah V. Epidemiologic classification of Human Papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348:518-527.
32. Koutsky A, Holmes K; Crichtlow W, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327:1972-1976.
33. Roda Husman M, Walboomers M, van den Brule J, Meijer J, Snijders J. 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(4):1057-1062.
34. Gravitt E, Peyton Q, Alessi M, Wheeler F, Coutlee A, Hildesheim H, et al. Improved amplification of genital Human Papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38:357-361.
35. Sasagawa T, Minemoto Y, Basha W, Yamazaki H, Nakamura M, Yoshimoto H, et al. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal Human Papillomaviruses (HPV). *Virus Res*. 2000; 67:127-139.
36. Melo A, García P, Capurro I, Guzmán P, Brebi P, Ili C, et al. Genotipificación del virus papiloma humano en mujeres con adenocarcinoma cervical de la Región de La Araucanía-Chile. *Rev Chil Infect*. 2010; 27(4):297-301.
37. Zehbe I, Wilander E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for Human Papillomavirus detection in cervical biopsies: A study of sensitivity. *Hum Pathol*. 1996; 27(8):812-815.
38. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. Human Papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer*. 1996; 77(11):2275-2279.
39. Andersson S, Rylander E, Larson B, Sigurdardottir S, Backlund I, Sallstrom J, et al. Types of Human Papillomavirus revealed in cervical adenocarcinomas after DNA sequencing. *Oncol Rep* 2003; 10(1):175-179.
40. Weimin U, Jiang G, Cruz Y, Chang J, Ho Y, Klein S, et al. PCR detection of Human Papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(6):1304-1310.
41. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. Jul 2004; 42(7):3176-3184.
42. Mejlhede N, Bonde J, Fomsgaard A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from danish women. *Apmis*. 2009; 117:108-114.
43. Wentzensen N, Schiffman M, Dunn T, Zuna E, Gold A, Allen A, et al. Multiple Human Papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Int J Cancer* 2009; 125:2151-2158.
44. Rousseau C, Abrahamowicz M, Villa L, Costa C, Rohan E, et al. Predictors of cervical coinfection with multiple Human Papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003; 12:1029-1037.

