

TESIS DOCTORAL



**PREVALENCIA DE LA INFECCION POR
PAPILOMAVIRUS HUMANO EN UNA
POBLACION DE BAJA INCIDENCIA DE
CANCER DE CUELLO UTERINO**



CARMEN MUGICA van HERCKENRODE

ISBN: 978-84-694-9834-7

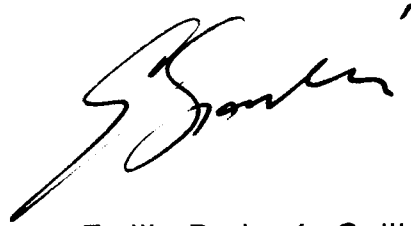
El Dr. EMILIO BARBERA GUILLEM, Catedrático del Departamento de Biología Celular y Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibersitatea.

CERTIFICA

Que el presente trabajo que lleva por título "PREVALENCIA DE LA INFECCION POR PAPILOMAVIRUS HUMANO EN UNA POBLACION DE BAJA INCIDENCIA DE CANCER CERVICO-UTERINO: Análisis de Muestras Citológicas Mediante Técnicas de Detección de DNA " ha sido realizado por Carmen Múgica van Herckenrode bajo mi dirección; considerando que reúne las condiciones adecuadas para la obtención del título de Doctor en Medicina y Cirugía General.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Leioa, Septiembre de 1991

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Barberá', written in a cursive style.

Emilio Barberá- Guillém

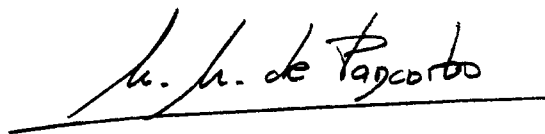
La Dra. MARIA DE LOS ANGELES MARTINEZ DE PANCORBO,
Profesora Titular Numeraria y Directora del Departamento de Biología
Celular y Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina y
Odontología de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko
Unibertsitatea,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo que lleva por título "PREVALENCIA DE
LA INFECCION POR PAPILOMAVIRUS HUMANO EN UNA
POBLACION DE BAJA INCIDENCIA DE CANCER DE CUELLO
UTERINO", ha sido realizado por Carmen Múgica van
Herckenrode en éste Departamento para optar al título de Doctora
en Medicina y Cirugía General.

Y para que así conste, expido la presente certificación en

Leioa, Marzo de 1992

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. M. de Pancorbo", is written over a horizontal line.

Fdo: Prof. Dra. M.A. Martinez de Pancorbo

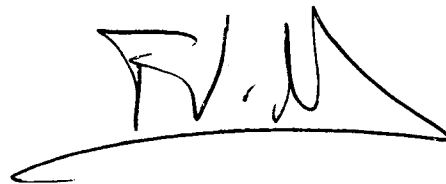
D. FERNANDO VIDAL VANACLOCHA, Profesor Titular Numerario del Departamento de Biología Celular y Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea, y actuando como PONENTE,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo que lleva por título "PREVALENCIA DE LA INFECCION POR PAPILOMAVIRUS HUMANO EN UNA POBLACION DE BAJA INCIDENCIA DE CANCER DE CUELLO UTERINO", ha sido realizado por Carmen Múgica van Herckenrode en este Departamento, y reúne las condiciones necesarias para ser defendido por la interesada para optar al título de Doctora en Medicina y Cirugía General.

Y para que así conste, expido la presente certificación en

Leioa, Marzo de 1992

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F.V. Vanaclocha', with a long horizontal flourish underneath.

Fdo: Prof. Dr. D. Fernando Vidal Vanaclocha

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A la Dra. Coleman y al Dr. Barberá, directores de este trabajo, por su constante apoyo.

A la Dra. Cañavate y al Dr. Vidal por la revisión del manuscrito y por sus opiniones y sugerencias.

A Milagros Portuondo y a Sacha Macansh por su ayuda en la preparación y estudio de las muestras citológicas, y a Isabel Fernandez, por su asistencia con las técnicas de Biología Molecular.

A Juan Urizar por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

A Ma. José Aldasoro, por su constante y abierta disposición para facilitar en lo posible cada gestión.

A Jon Darpon y Ma. Luz Marqués por su apoyo personal y su ayuda en la fase final de este trabajo.

A I. M. B. Arquitectos por su colaboración y ayuda en la edición de los ejemplares de esta tesis.

Y en general, a todos los miembros del Dpto. de Biología Celular y Ciencias Morfológicas de la UPV, del Dpto. de Citología del Hospital St. Mary's y del Dpto. de Biología Molecular del Hospital Charing Cross de Londres.

INDICE

INDICE DE ABREVIATURAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	ix
1. INTRODUCCION	1
1.1. BIOLOGIA MOLECULAR DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO.....	1
1.1.1. Clasificación, organización del genoma y funciones del papilomavirus.....	6
1.1.2. Biología de la infección por papilomavirus.....	13
1.1.3. Estado físico del DNA del papilomavirus en las células	14
1.1.4. Papilomavirus y genes celulares.....	16
1.2. METODOS DE DETECCION DE LA INFECCION POR PAPILOMAVIRUS	
1.2.1. Observación clínica.....	17
1.2.2. Microscopia óptica.....	18
1.2.3. Microscopia electrónica	19
1.2.4. Cultivo de tejidos.....	20
1.2.5. Identificación inmunohistoquímica de antígenos virales.....	20
1.2.6. Métodos de detección génica	22
1.3. PAPILOMAVIRUS Y SU ASOCIACION CON EL CANCER DE CERVIX.	
1.3.1. Estudios epidemiológicos.....	32
1.3.2. Sinergismo con otros factores de riesgo.....	40
1.3.3. Estudios “in vitro”	41
1.4. OTRAS LOCALIZACIONES ESPECIFICAS DEL PAPILOMAVIRUS....	43
2. HIPOTESIS, OBJETIVOS Y DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	49
2.1. PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS.....	50
2.2. OBJETIVOS.....	51
2.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	54

2.3.1. Muestra de mujeres de la población de bajo riesgo de cáncer de cérvix.....54

2.3.2. Tipo de muestra de la mucosa del cuello uterino.....54

2.3.3. Estudio de la prevalencia de la infección por HPV en mujeres asintomáticas y con neoplasia del cuello uterino. Elección del método de detección del DNA del HPV55

2.3.4. Estudio del riesgo de progresión hacia CIN o a CIN de grado superior asociado a la infección del epitelio cervical por los tipos específicos de HPV57

2.3.5. Estudio de la sensibilidad de detección de varios marcadores citológicos específicos e inespecíficos de infección por HPV57

3. MATERIAL Y METODOS58

3.1. MUESTRA DE MUJERES DE MUJERES DE LA POBLACION DEL PAIS VASCO.....59

3.2. METODOS DE OBTENCION Y ESTUDIO DE LAS MUESTRAS CLINICAS

3.2.1. Recogida, registro y almacenamiento de las muestras clínicas60

3.2.2. Estudio de las extensiones citológicas de cérvix.....61

3.3. METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....63

3.3.1. Sondas de DNA recombinante63

3.3.2. Amplificación de las sondas de DNA del HPV y de la gamma-actina64

 3.3.2.1. Transformación de células competentes RR1 de E. Colli con el plásmido recombinante (DNA del genotipo de HPV o de actina, clonado en pBR 322 o vector de Okayama)64

 3.3.2.2. Cultivo a gran escala de las células E colli transformadas y purificación del DNA del plásmido recombinante.....65

 3.3.2.3. Aislamiento del segmento de DNA de la sonda insertado en el vector. Digestión con enzimas de restricción de los plasmidos recombinantes y electroforesis en gel de agarosa.....67

3.3.3. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción del DNA de las sondas de HPV 6, 11, 16 y 18.69

3.3.4. Detección de secuencias específicas de ácidos desoxirribonucleicos de papilomavirus en células cervicales exfoliadas, mediante la técnica Slot-blot.....72

 3.3.4.1. Purificación del DNA de las muestras citológicas72

 3.3.4.2. Purificación del DNA humano para su utilización como control interno73

3.3.4.3. Slot-blot: Inmovilización del DNA purificado de las muestras en una membrana de nitrocelulosa.....	74
3.3.4.4. Hibridación del DNA de las muestras con sondas radiactivas	76
3.3.4.5. Marcaje de las sondas con p32, segun el método de extensión de cebadores oligoméricos (“random oligomeric primer extension”)	76
3.3.4.6. Autorradiografía	77
3.3.5. Detección de secuencias específicas de acidos desoxirribonucleicos de papilomavirus en células cervicales exfoliadas, mediante la técnica de la reacción en cadena de la DNA -polimerasa	78
3.3.6. Análisis cuantitativo del contenido de DNA viral y humano de las muestras mediante densitometría. Estimación del número de copias del genoma del HPV por célula.	80
3.4. ANALISIS ESTADISTICO	81
3.4.1. Prueba Chi 2 de independencia	81
3.4.2. Prueba Chi 2 de homogeneidad.....	81
3.4.3. Prueba Chi 2 de igualdad de proporciones de muestras de parejas.....	82
3.3.4. Estimaciones de proporciones de poblacionales. Intervalos de confianza	82
3.4.5. Fórmula de Bayes. Cálculo de probabilidades condicionadas.....	84
3.4.5. U de Mann-Whitney.....	84
3.4. 6. Análisis discriminante	85
4. RESULTADOS	86
4.1. ESTUDIO DE LAS EXTENSIONES CITOLOGICAS CERVICALES DE LAS MUJERES DE LOS CENTROS DE PLANIFICACION FAMILIAR Y DE LA CLINICA COLPOSCOPICA.....	87
4.2. PREVALENCIA DEL DNA DE LOS TIPOS 6, 11, 16 Y 18 DE HPV EN MUESTRAS DE CERVIX DE MUJERES CON CITOLOGIA NORMAL Y CON NEOPLASIA CERVICAL, MEDIANTE LA TECNICA DE HIBRIDACION SLOT-BLOT.	92
4.2.1. Prevalencia del DNA del HPV en muestras de cérvix de mujeres con carcinoma invasivo y Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	92
4.2.2. Prevalencia del DNA del HPV en muestras de cérvix de mujeres con citología normal	95
4.2.3. Prevalencia del DNA del HPV en muestras de cérvix de mujeres con citología	

normal de la población de alto riesgo de cáncer de cérvix.....101

4.3. PREVALENCIA DEL DNA DEL HPV 16 EN MUESTRAS DE CERVIX DE MUJERES CON CITOLOGIA NORMAL Y CON NEOPLASIA CERVICAL, MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA DNA-POLIMERASA.....103

4.4. CUANTIFICACION DEL CONTENIDO DE DNA VIRAL Y HUMANO PRESENTE EN LAS MUESTRAS NORMALES Y DE CIN.....106

4.4.1. Número medio de equivalentes del genoma del HPV 16 por célula, en muestras citológicas normales y de lesiones neoplásicas.....106

4.4.2. Número medio de equivalentes del genoma del HPV 18 por célula, en muestras citológicas normales y de lesiones neoplásicas.....110

4.5. RIESGO RELATIVO DE TRASFORMACION MALIGNA DE LAS CELULAS CERVICALES ASOCIADO A LA INFECCION POR EL GENOTIPO 16 DE HPV

4.6. INVESTIGACION DEL RIESGO DE EVOLUCION A CIN Y DE PROGRESION A LESION CIN DE ALTO GRADO DEL EPITELIO CERVICAL EN MUJERES PORTADORAS DEL DNA DEL HPV.....115

4.6.1. Seguimiento de mujeres asintomáticas portadoras del DNA del HPV y de controles con marcadores negativos de la infección.....115

4.6.2. Seguimiento de mujeres con CIN 1 portadoras del DNA del HPV, y de controles con marcadores negativos de la infección.....118

4.7. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE DETECCION DE VARIOS SIGNOS CITOLOGICOS ESPECIFICOS E INESPECIFICOS DE INFECCION POR HPV

4.7.1. Sensibilidad de los marcadores citomorfologicos “específicos “ de infección por papilomavirus120

4.7.2. Sensibilidad de los marcadores citomorfologicos “inespecíficos “ de infección por papilomavirus120

5. DISCUSION133

6. CONCLUSIONES147

7. BIBLIOGRAFIA.....150

INDICE DE ABREVIATURAS

At:	Atributo
bp:	Pares de bases
BPV1:	Papilomavirus bovino tipo 1
°C:	Grado centigrado
CIF:	Factór de interferencia celular
CIN:	Neoplasia Intraepitelial Cervical
CPF:	Centro de planificacion familiar
DAB:	Tetrahydrocloruro de diaminobenzidina
DNA:	Acido desoxirribonucleico
dNTPs:	Desoxirribonucleósido trifosfato
dpm:	Desintegraciones por minuto
<i>E.coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Acido etilen-diamino-tetracético
EV:	Epidermodisplasia verruciformis
Fig:	Figura
FISH	Hibridación en filtro in situ
g.:	Gramo
h.:	Horas
Ha:	Hipótesis alternativa
Ho:	Hipótesis nula
HPV:	Papilomavirus humano
HSV:	Virus del Herpes Simplex
Kb:	Kilobases
L.B.:	Medio L-Broth
µg.:	Microgramo
µl.:	Microlitro
µM.:	Concentración micromolar
M:	Concentración molar
mCi:	Microcurios
M.E.:	Microscopia electrónica
mg.:	Miligramo
min.:	Minuto
ml.:	Mililitro
mm.:	Milimetro
mM:	Concentración milimolar

M.O.:	Microscopia Optica
N:	Concentración normal
NCR:	Región no codificante
ng.:	Nanogramos
nm.:	Nanometros
ORF:	Open reading frames
PAP:	Peroxidasa-antiperoxidasa
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reaccion en cadena de la DNA-polimerasa
pg.:	Picogramos
PM:	Peso Molecular
PV	País Vasco
RNA:	Acido ribonucleico
RNAm:	Acido ribonucleico mensajero
rpm:	Revoluciones por minuto
RU	Reino Unido
seg.:	Segundo
TE:	Tris-EDTA
URR:	Upstream regulatory region
U.V.:	Ultravioleta
VIN:	Neoplasia Intraepitelial Vulvar

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapas de restricción de los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV.....8

Figura 2: Mapa de la organización del genoma del Papilomavirus Bovino y de los tipos 6b y 16 de papilomavirus humano12

Figura 3: Diagrama de la reacción en cadena de la DNA -polimerasa29

Figura 4: Separación de las sonda del plásmido recombinante mediante digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa67

Figura 5: Patrones electroforéticos de los fragmentos de restricción de las sondas de DNA de los tipos 6, 11, 16 y 18 de papilomavirus71

Figura 6: Detección del DNA del papilomavirus en muestras citológicas de cérvix mediante la técnica de hibridación Slot-blot75

Figura 7: Distribución por edades de las mujeres con diagnóstico citológico de CIN 1, CIN 2-3 y carcinoma invasivo.....91

Figura 8: Prevalencia de la infección por los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV en mujeres con diagnóstico citológico de CIN 1, CIN 2-3 y carcinoma invasivo.....94

Figura 9: Prevalencia de la infección por los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV en mujeres con citología normal, en relación con la edad. Rectas de regresión97

Figura 10: Prevalencia de la infección por HPV en relación con el diagnóstico citológico100

Figura 11: Detección del DNA del papilomavirus en muestras citológicas de cérvix mediante la técnica de PCR.....104

Figura 12: Análisis densitométrico de las autorradiografías para la cuantificación del contenido de DNA viral y humano de las muestra107

Figura 13: Número de copias del genoma del HPV 16 por célula infectada en muestras citológicas normales y de lesiones neoplásicas109

Figura 14: Número de copias del genoma del HPV 16 por célula infectada en muestras citológicas normales y de lesiones neoplásicas112

Figura 15: Frecuencia de varios signos citomorfológicos específicos e inespecíficos de infección por HPV en muestras citológicas positivas y negativas segun el test Slot-blot de hibridación.....123

Figura 16: Número de signos citomorfológicos específicos e inespecíficos de infección por HPV en muestras citológicas positivas y negativas segun el test Slot-blot de hibridación.....126

Figura 17: (A) Coilocitos clásicos. (B) Células con citoplasma claro.....128

Figura 18: (A) Célula disqueratósica. (B) Paraqueratosis129

Figura 19: (A) Células fusiformes. (B) Gránulos citoplasmáticos130

Figura 20: (A) Condensación de filamentos. (B) Anillo perinuclear131

Figura 21: (A) Binucleación. (B) Hiperchromasia nuclear132

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Asociación del HPV 6 y 11 con lesiones específicas del tracto genital femenino.....35

Tabla 2: Asociación del HPV 16 con lesiones específicas del tracto genital femenino36

Tabla 3: Asociación del HPV 18 con lesiones específicas del tracto genital femenino37

Tabla 4: Tipos de papilomavirus que infectan el epitelio cervical39

Tabla 5: Tipos de HPV identificados y sus manifestaciones clínicas.....45

Tabla 6: Secuencias de los cebadores de oligonucleótidos para amplificación de HPV 1678

Tabla 7: Resultados del estudio citológico de las muestras de cérvix de las pacientes de los CPF y clínica colposcópica88

Tabla 8: Distribución por edades de las pacientes con CIN y carcinoma invasivo..90

Tabla 9: Prevalencia de la infección por los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV en mujeres con CIN y carcinoma invasivo93

Tabla 10: Prevalencia de la infección por los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV en mujeres con citología normal, en relación con la edad.96

Tabla 11: Distribución de los diferentes genotipos de HPV en los tres grupos de edad con diferencias estadísticamente significativas.....99

Tabla 12: Estudio comparativo de la prevalencia de la infección por los genotipos de HPV de “alto”y “bajo” riesgo en dos poblaciones con diferente incidencia de cáncer de cérvix.....102

Tabla 13: Detección del DNA del HPV 16 en muestras de cérvix normales y de lesiones preneoplásicas con la técnica de PCR.....105

Tabla 14: Número medio de copias de HPV 16 por célula infectada en mujeres asintomáticas, con diagnóstico citológico de CIN y carcinoma invasivo.....108

Tabla 15: Número medio de copias de HPV 18 por célula infectada en mujeres asintomáticas, con diagnóstico citológico de CIN y carcinoma invasivo.....111

Tabla 16: Seguimiento de mujeres asintomáticas infectadas por HPV 6/11, HPV 16/18 y controles.....116

Tabla 17: Relación entre el número medio de copias de HPV 16/18 por célula infectada y la evolución hacia CIN, en mujeres asintomáticas.....117

Tabla 18: Seguimiento de mujeres con CIN 1 infectadas con HPV 6/11; HPV 16/18 y no infectadas.....119

Tabla 19: Sensibilidad de los marcadores citomorfológicos clásicos de la infección por HPV121

Tabla 20: Frecuencia de marcadores citomorfológicos específicos e inespecíficos de HPV en muestras citológicas positivas y negativas segun el test Slot-blot de hibridación122

Tabla 21: Número de criterios morfológicos inespecíficos de HPV en muestras citológicas de 100 mujeres infectadas y 100 controles125

Tabla 22: Análisis discriminante de la asociación de varios signos citológicos inespecíficos con la infección por papilomavirus127

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

El carcinoma epidermoide del cérvix uterino es uno de los tumores más frecuentes de la mujer. De acuerdo con una estimación reciente, el número de nuevos casos que aparecen cada año en el mundo es de 465.000. Constituye el tipo de cáncer más común en la mujer en los países en desarrollo y el décimo en frecuencia en los países desarrollados (Muñoz y Bosch, 1989; Parkin y cols., 1988). Se diagnostica generalmente en pacientes entre los 50 y 60 años de edad, pero puede aparecer a cualquier edad después de la pubertad y, en la última década, la incidencia ha aumentado entre las mujeres con menos de 35 años (Crawford, 1984). Por este motivo se han desarrollado en los últimos años numerosos trabajos de investigación sobre la etiología y epidemiología de la neoplasia de cérvix.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que existe una asociación entre determinadas conductas y hábitos sexuales de la mujer o su pareja y el cáncer de cérvix. En este sentido, se consideran factores de riesgo principales, el inicio de relaciones sexuales a una edad temprana, y la existencia de múltiples compañeros sexuales. Otros factores secundarios de riesgo son: los antecedentes de infecciones de transmisión sexual, la promiscuidad de la pareja y la multiparidad. (Ferenczy, 1977; Singer, 1982; Beral, 1984; Zunzunegui y cols., 1986).

Debido a la asociación demostrada entre el cáncer de cervix y los hábitos sexuales de la mujer, se ha sugerido que la neoplasia cervical está causada por un agente de transmisión sexual. En consecuencia, se ha investigado la posible implicación de varios agentes infecciosos (Alexander, 1973).

Entre los diferentes agentes causales sobre los que se ha especulado a lo largo de la última década, destacan dos tipos de virus, Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) y papilomavirus humano (HPV), como los candidatos con más posibilidades. El Herpes simplex tipo 2 es el causante del Herpes genital, y el papilomavirus humano induce una variedad de lesiones hiperplásicas (proliferativas) que se denominan papilomas.

El hipotético papel causal del HSV-2 ha sido propuesto en base a a los siguientes hechos:

(1) Se ha demostrado, mediante métodos histológicos, tests serológicos y técnicas de hibridación, que existe una asociación entre el HSV-2 genital y la neoplasia de cervix (Naib y cols.,1966; Nahmias y cols., 1974; Galloway y cols., 1983).

(2) Se han identificado secuencias específicas del HSV-2 capaces de transformar células in vitro (Galloway y cols., 1983).

(3) Se ha observado que los diferentes tipos de HSV humano inducen anomalías cromosómicas -delecciones y traslocaciones- similares a las que se asocian a otros tipos de cáncer (Hamper y cols.,1963). Por ejemplo, las células cancerosas de la mayor parte de los pacientes con linfoma de Burkitt tienen una traslocación específica entre los cromosomas 8 y 14 (Klein, 1981). En consecuencia, se ha especulado sobre la posibilidad de que el HSV-2 represente

un papel análogo en el proceso oncogénico de cérvix al del virus del Epstein-Barr en el linfoma de Burkitt (Nahmias y Sawanabori, 1978).

Sin embargo, la relación causal entre el HSV-2 y el cáncer de cérvix permanece sin confirmar, después de muchos años de estudio. En un amplio estudio prospectivo de reciente publicación, no se ha demostrado relación alguna entre la infección y el subsiguiente cáncer de cérvix (Vonka y cols., 1984).

Los resultados de los diferentes estudios epidemiológicos e "in vitro" efectuados en los últimos años indican que, con toda probabilidad, el HPV es el agente causal implicado en el proceso oncogénico del cérvix. Aunque esta hipótesis se planteó hace ya más de 15 años (zur Hausen, 1974), ha sido difícil de investigar, hasta fechas recientes, por las limitaciones de los diferentes métodos de diagnóstico de la infección.

El HPV ha sido implicado en el proceso oncogénico del cérvix, fundamentalmente, por las siguientes razones:

(1) Existen casos de transformación maligna de papilomas inducidos por el HPV, como papilomas laríngeos, lesiones cutáneas de la epidermodisplasia verruciformis y, de particular interés, condilomas genitales (zur Hausen, 1977).

(2) Se ha demostrado que existe una asociación entre el HPV y la Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN). Además, esta lesión premaligna puede progresar hasta convertirse en un cáncer invasivo de cérvix (Meissels., 1976; Purola y cols., 1977).

(3) Se ha demostrado el potencial oncogénico de ciertas variedades del papilomavirus no humano: la infección por el HPV de "Shope" produce tumores

malignos en la piel de los conejos (Shope, 1933). Además, se ha comprobado que el cáncer de esófago y de intestino del ganado vacuno se asocian al papilomavirus bovino tipo 4, aunque se considera que es necesaria la intervención de un cocarcinógeno (la quercina) para que se produzca la transformación maligna (Jarrets y cols., 1980).

(4) La trasmisión venérea de la infección por HPV del tracto genital femenino es muy común (Meisels y cols.,1982).

En definitiva, si el papilomavirus posee algún potencial para producir la transformación maligna de determinadas células, debe ser mediante la inducción de cambios a nivel molecular, y es en este campo, por tanto, donde se están realizando intensos esfuerzos para determinar los mecanismos implicados en el proceso. En este sentido, es necesario revisar la información que existe en la actualidad sobre la biología molecular del papilomavirus.

1.1. BIOLOGIA MOLECULAR DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO

1.1.1. CLASIFICACION, ORGANIZACION DEL GENOMA Y FUNCIONES DEL PAPILOMAVIRUS.

Los diferentes tipos de Papilomavirus constituyen, junto con los Polyomavirus, la familia Papovaviridae. El nombre de la familia deriva de las dos primeras letras de cada género, es decir, PApilomavirus y POliomavirus, más dos letras del término agente VAcuolante.

El papilomavirus está constituido por una doble cadena circular de DNA, envuelta por una cápside icosaédrica. El diámetro medio es de 50-55 nm. y la masa molecular relativa de 5×10^6 . Tiene una única proteína estructural principal con una Masa molecular de $5.3 - 5.9 \times 10^4$ (Pfister y cols., 1986).

El grupo de los papilomavirus es extraordinariamente heterogéneo. El primer tipo de papilomavirus descrito fue el HPV de "Shope" del conejo (Shope, 1933), y con posterioridad se han caracterizado los diferentes tipos de papilomavirus que se encuentran en una amplia variedad de vertebrados, incluido el Hombre. En la actualidad, se han identificado más de 60 tipos de HPV humanos. Todos inducen una serie de tumores benignos epiteliales (verrugas y papilomas) en localizaciones específicas de la piel y mucosas.

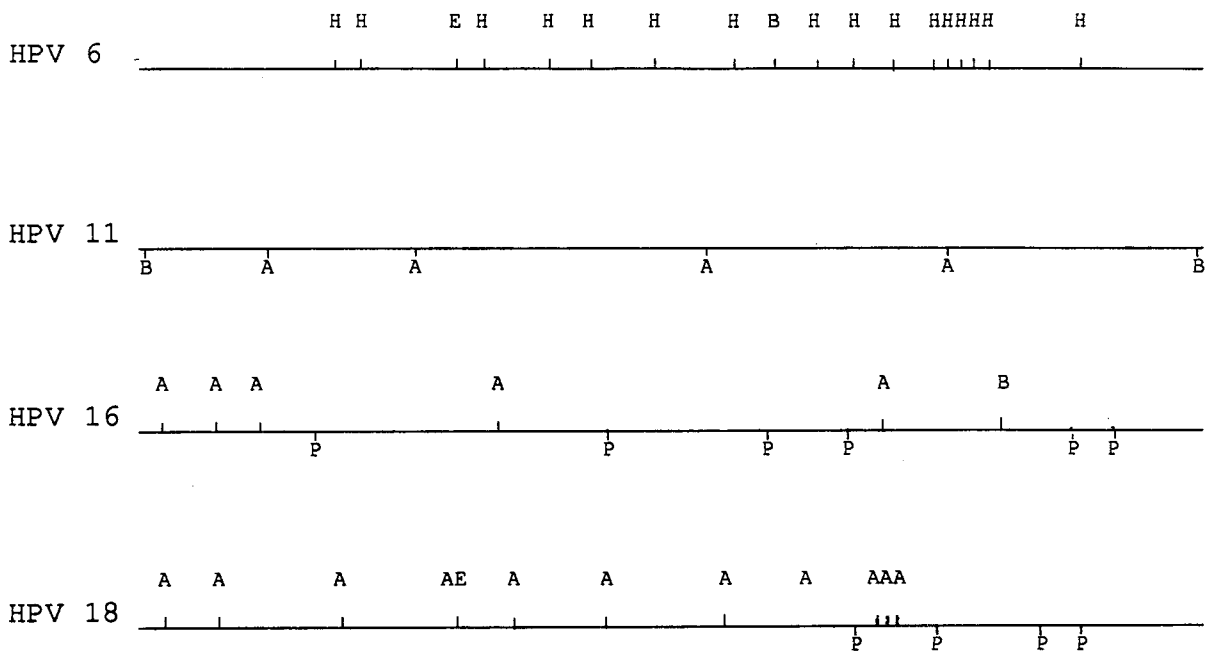
La mayoría de los tipos de papilomavirus caracterizados hasta el presente han sido aislados a partir de la lesión en que se encuentran y, a continuación, han sido clonados y amplificados en plásmidos bacterianos. (Pfister y cols., 1986).

La figura 1 ilustra los mapas de restricción publicados de los cuatro tipos de papilomavirus utilizados en el presente estudio. Aunque no fueron aislados a excepción del HPV 6 dentro de su cubierta proteica, como virus ensamblados, fueron considerados como víricos por satisfacer los siguientes criterios:

- 1) Un tamaño genómico dentro del rango de 7000 a 8000 pares de bases (bp) ;
- 2) persistencia en el tejido tumoral en forma física episomal (DNA no integrado, o extracromosómico), como una doble cadena de DNA circular cerrado (que puede ser ensamblado, teóricamente, en un virus completo);
- 3) homología parcial de sus secuencias con otros genotipos conocidos de papilomavirus; y
- 4) organización general del genoma semejante a otros papilomavirus no humanos (Gissmann y cols., 1984).

La clasificación de los diferentes genotipos de papilomavirus se efectúa en función de la especie en la que se aíslan, y en función del grado de homología de sus genomas con los de otros tipos ya caracterizados. El DNA de un posible nuevo tipo es hibridado en fase líquida con el DNA de otro genotipo conocido. De este modo se determina el grado de homología entre las dos cadenas de DNA: si es menor que el 50%, en relación con la longitud total de la cadena conocida de DNA, se considera que el DNA desconocido corresponde a un nuevo tipo de virus. Si hay más de un 50% de homología, pero la hibridación no es completa, el virus desconocido se considera como un subtipo del de referencia (Coggin y zur Hausen, 1979). El procedimiento es bastante grosero, y tiende a exagerar las diferencias entre los tipos. Sin embargo, a pesar de las limitaciones del método, se ha utilizado para clasificar la mayor parte de los genotipos de HPV conocidos hasta el presente. En la actualidad, se dispone de sistemas de análisis por ordenador, que permiten hacer determinaciones de secuencias con más precisión.

FIGURA 1: MAPAS DE RESTRICCIÓN DE LOS CUATRO TIPOS DE HPV UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.



A= Ava II; B= Bam HI; E= Eco RI; H= Hae III; P= Pst I.

Las líneas representan los genomas de los diferentes tipos de papilomavirus, que tienen una longitud total de 7.900 pares de bases (bp).

La homología entre las cadenas de DNA es el indicador más fiable de una relación evolutiva. Los tipos de virus del papiloma que comparten alguna o varias propiedades patogénicas tienen secuencias muy similares de DNA. Por ejemplo, los tipos 6 y 11 de HPV, muy próximos entre sí, muestran tropismo por las mucosas del tracto respiratorio y del tracto genital femenino, donde producen el mismo tipo de lesión. El HPV 13, que tiene una relación más distante, infecta la mucosa oral. (Pfister y cols., 1986). Si se comparan las secuencias de aminoácidos que potencialmente codificarían los tipos de HPV que infectan la mucosa genital (HPV 6, 11, 16 y 18), se comprueba que presentan semejanzas entre sí que no tienen con los tipos de HPV que se encuentran en otros tejidos, como por ejemplo, el HPV 1 del tejido cutáneo (Naghashfar y cols., 1985).

A pesar de la gran heterogeneidad de los genomas de los diferentes HPVs, los tipos individuales son muy estables desde el punto de vista genético (Pfister y cols., 1986). Los mismos genotipos aislados y clonados independientemente en diferentes partes del mundo tienen unos mapas de restricción muy similares; por ejemplo, el HPV 19 y 20 (Kremsdorf y cols., 1984; Gassenmaier y cols., 1984).

Las secuencias de nucleótidos del DNA de los tipos de HPV humanos o animales caracterizados hasta el presente revelan una organización del genoma muy similar. En general, el DNA genómico de los virus puede dividirse en dos regiones; la región temprana (E=early), que es expresada antes de la replicación viral y, la tardía (L=late), que es expresada una vez iniciada la replicación del DNA viral. Esta observación se ha efectuado en virus propagados en sistemas de cultivo de tejidos. Como el virus del papiloma humano no crece en cultivo, la subdivisión se efectúa en este caso por analogía con otros papovavirus. Gran parte de la información disponible en la actualidad sobre las funciones génicas

del HPV se ha obtenido en estudios realizados en virus de fácil manipulación en el laboratorio, como el papilomavirus bovino tipo 1 (BPV 1). La región temprana del genoma del BPV 1, responsable de la transformación, constituye un 69% del genoma, por lo que se le denomina región 69T (Lowy y cols., 1980). Ha sido dividida en ocho “marcos de lectura abierta” o secuencias codificadoras de proteínas (“open reading frames”, ORF) que se solapan, designados con las siglas E1 a E8 (Danos y Yaniv, 1983). Los ORF E1, E2, E4, E6 y E7 están representadas en los genomas de todos los papilomavirus secuenciados hasta el momento, y se supone que codifican proteínas funcionales. La región tardía ha sido subdividida en dos ORF, L1 y L2. Los equivalentes de L1 y L2 también se han encontrado en el resto de los papilomavirus secuenciados, y se considera que codifican las proteínas de la cápside (Pettersson y cols., 1986). A continuación de la región temprana hay una región no codificante, de aproximadamente 1000 bp de longitud, que contiene secuencias de control de la transcripción. Se reconoce a esta región por las siglas URR (“upstream regulatory region” o región reguladora en el extremo 5’), y se le asigna la función de estimular -por transactivación- la expresión de los ORF adyacentes. El RNA mensajero (RNAm) resultante de la transcripción del DNA viral se procesa según un patrón regular, pero tanto el transcrito primario como el RNAm procesado codifican proteínas víricas. La figura 2 ilustra la organización general del genoma del BPV 1, que sirve como modelo de la organización del genoma del papilomavirus humano (Chen y cols., 1982; Schwartz y cols., 1983; Seedorf y cols.,1985).

Se han asignado funciones a todos los ORF del papilomavirus humano, sobre el modelo del genoma del BPV 1 (Pfister, 1987). Únicamente la región temprana del virus se expresa en las células transformadas. Los genes de la región tardía, L1 y L2, que se expresan únicamente en las células con infección productiva, codifican las proteínas estructurales de la cápside viral. Las funciones de

transformación se atribuyen a los ORF E7, E6 y E5; E1 regula la persistencia episomal del virus (DNA viral no integrado en la célula huésped), y el mantenimiento de un alto número de copias del DNA viral depende de E6 y E7. La maduración de los viriones se asocia a E4. El E2 codifica las proteínas que modulan el nivel de transcripción viral, en sentido positivo o negativo, acoplándose a secuencias activadoras o inhibitoras específicas de URR. El ORF E2 del HPV 16 humano codifica, al menos, dos proteínas capaces de regular la transcripción (Chin y cols, 1988). El producto del transcrito primario (de la secuencia completa) de E2 tiene un efecto activador. Por el contrario, el producto del RNAm procesado induce el efecto inverso, al competir con el primero por los puntos específicos de unión del URR viral. El efecto total depende de los niveles relativos de ambas proteínas, y el equilibrio normal produciría un efecto inhibitor de la transcripción (Ward y cols., 1989).

Por otra parte, se ha planteado la posibilidad de que los productos de E2 regulen, además, la expresión de genes de la célula huésped, que respondan a activadores celulares similares a los de la región URR viral. Y, en el sentido inverso, se considera que URR contiene secuencias estimuladoras de la transcripción que no son reguladas por el ORF E2 viral, y que en cambio responden a estímulos hormonales o a determinados productos de la célula huésped (Chan y cols., 1989). Esto implicaría la existencia de un complejo sistema de control de la expresión de los genes tempranos y tardíos virales por factores específicos de la célula huésped, y viceversa.

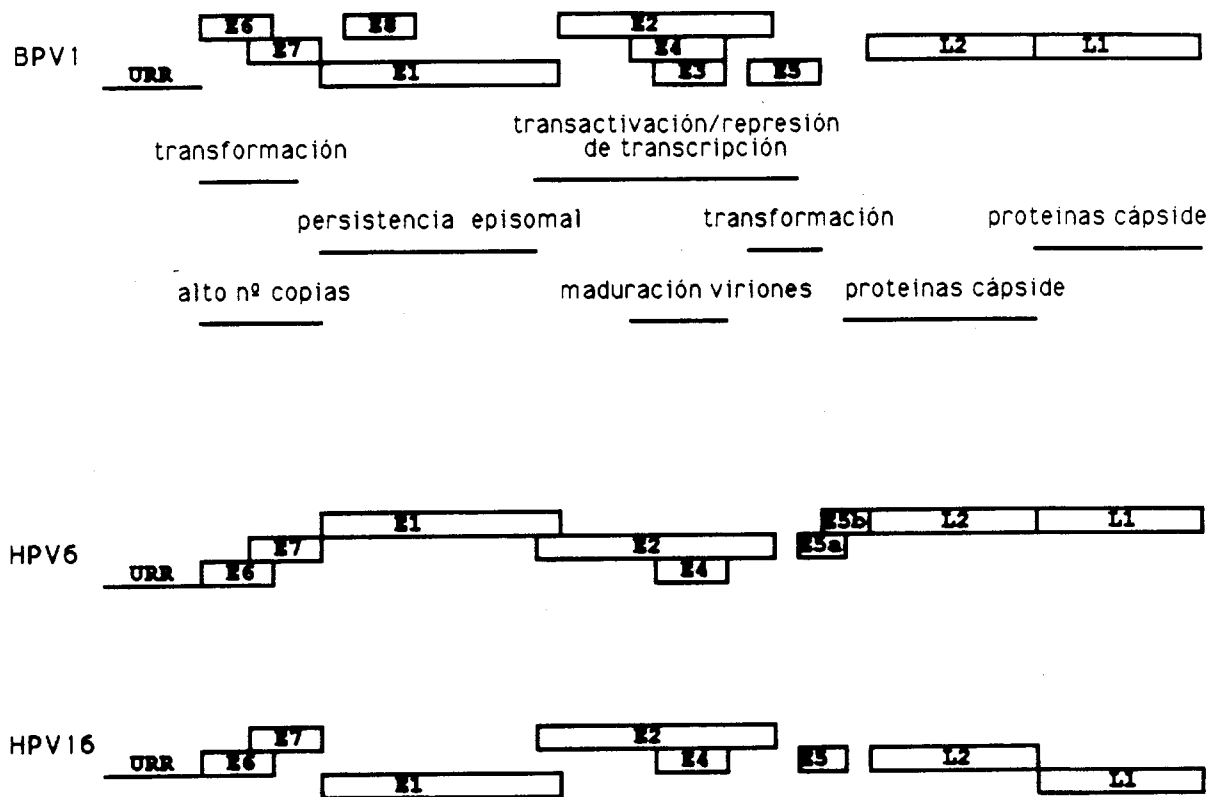


FIGURA 2: Mapa de la organización del genoma del Papilomavirus Bovino 1 (Chen y cols., 1982), y de los papilomavirus humanos 6b y 16 (Schwartz y cols., 1983, Seedorf y cols., 1985).

1.1.2..BIOLOGIA DE LA INFECCION POR PAPILOMAVIRUS.

El papilomavirus humano infecta el epitelio escamoso en lugares específicos de la piel y mucosas. Como consecuencia de la infección, se producen una serie de lesiones proliferativas, cuyo patrón de crecimiento depende del tejido y del tipo de HPV. El periodo de incubación varía de varias semanas a meses; algunas lesiones regresan espontáneamente, mientras que otras progresan (Rowson y Mahy, 1967).

El ciclo de replicación viral está estrechamente ligado al proceso de diferenciación del epitelio. Se considera que el HPV infecta inicialmente las células basales del epitelio, por contacto directo en áreas expuestas, como por ejemplo en los puntos de microabrasión, o en la zona de transformación de la mucosa cervical. La replicación independiente del virus parece estar bloqueada a este nivel por factores de la célula huésped (zur Hausen, 1987). A medida que avanza el proceso de diferenciación y queratinización del epitelio (en los sucesivos estratos), los mecanismos de bloqueo mediados por la célula se relajan, por lo que se produce la replicación viral, la síntesis de las proteínas estructurales y la maduración de las partículas virales. Los genes tempranos del virus (ORF E1-E8), que controlan la síntesis del DNA viral, se expresan únicamente en los estratos basales del epitelio mientras que los genes tardíos (L1 y L2), que codifican las proteínas de la cápside viral, se expresan en los estratos superficiales. Las infecciones por papilomavirus, por tanto, solo son productivas en los queratinocitos más diferenciados. La atipia coilocitótica de las células superficiales, que representa el efecto citopático inducido por el HPV, es el resultado de la acumulación de las proteínas víricas (Pfister, 1987).

1.1.3. "ESTADO FISICO" DEL DNA DEL PAPILOMAVIRUS EN LAS CELULAS.

Diferentes estudios han demostrado que el DNA de los tipos 16 y 18 de HPV se encuentra con frecuencia integrado en el DNA cromosómico de las células de los tumores malignos (Yee y cols., 1985; Schwarz y cols., 1985; Lehn y cols., 1985). Debido a este hecho, se ha propuesto que la integración, en su totalidad o en parte, del DNA del virus en la célula huésped es el acontecimiento clave que condiciona la progresión hacia la malignidad de las lesiones preneoplásicas. Los tipos 6 y 11 de HPV, generalmente asociados a tumores benignos, se mantienen por el contrario en las células infectadas como moléculas circulares de DNA extracromosómico (Gissmann y cols., 1982). Además, se ha comprobado que cuando el HPV 16 también está presente en los tumores benignos, su estado físico es siempre episomal (Durst y cols., 1983; McCance y cols., 1985).

Las células tumorales pueden contener una copia única del DNA viral integrado, o tandems de múltiples copias repetidas, unidas cabeza con cola, integrados en varios puntos del genoma de la célula huésped. Es significativo el hecho de que el patrón de integración del virus en el DNA de la célula huésped sea monoclonal. Esto sugiere que este acontecimiento tiene lugar con anterioridad a la expansión clonal del tumor. Además, el patrón de interrupción de la cadena de DNA viral también es relativamente constante: la recombinación del DNA viral con el DNA de la célula huésped se produce generalmente a nivel de los ORF E1 o E2, y con mucha menos frecuencia a nivel del ORF L2 (Pater y cols., 1986; Choo y cols., 1987).

El conocimiento de estos hechos proporciona claves importantes para la comprensión de los mecanismos moleculares mediante los cuales el HPV modifica las propiedades proliferativas de las células infectadas. La integración

del virus mediante la recombinación a nivel de E1 o E2 deja los ORF E6 y E7 -implicados en la transformación de la célula huésped-, directamente acoplados a las secuencias promotoras de URR (región controladora de la transcripción, figura 2), por lo que se produce su continua expresión. Los restantes genes del virus, por el contrario, quedan desacoplados de las secuencias promotoras de URR, de modo que se interrumpen las restantes funciones víricas. Por otra parte, y también como consecuencia de la integración del DNA viral, se produce la yuxtaposición de las secuencias E6 y E7 del virus con las secuencias adyacentes del DNA de la célula huésped, lo que puede dar lugar, con el sistema de control (E2) de finalización de la transcripción desactivado, a la producción de transcritos de fusión (RNAm codificado por E6 y E7 ligado a RNAm codificado por el DNA de la célula huésped). Teóricamente, los transcritos de fusión podrían tener unas propiedades alteradas, como por ejemplo, una vida media más larga, o una mayor estabilidad, lo que se traduciría en un incremento de la actividad de la proteína codificada por E6 y E7 (Durst y cols., 1985).

En resumen, la integración del DNA del HPV en la célula huésped puede representar un acontecimiento crítico en la progresión de la neoplasia cervical. La división celular incontrolada que resulta de la integración podría aumentar la susceptibilidad celular a otros factores carcinógenos exógenos que completarían el proceso de desarrollo neoplásico (Popescu y Dipaolo, 1989).

1.1.4. EL PAPILOMAVIRUS Y GENES CELULARES.

Se dispone de muy escasa información acerca del papel que desempeñan los oncogenes y antioncogenes celulares en la transformación maligna de las células epiteliales infectadas por el HPV. Se ha demostrado que los oncogenes c-myc y c-Ha-ras se encuentran activados en carcinomas cervicales que contienen el HPV, y en las líneas celulares derivadas de los mismos (Riou y cols., 1984). En los primeros estadíos tumorales, el nivel de expresión de c-myc parece estar estrechamente relacionado con el pronóstico: cuanto menor es éste, mayor es la tasa de supervivencia a los 18 meses (Riou y cols., 1987).

Hay también evidencia indirecta que sugiere la implicación de un antioncogén celular (factor de interferencia celular, o CIF) en la progresión de las lesiones preneoplásicas a carcinomas invasivos. Se ha propuesto que el desarrollo del cáncer es el resultado del fracaso de un mecanismo intracelular de control de la expresión del HPV, ante la presencia persistente del genoma de éste en la célula huésped. Determinados cofactores externos, como el tabaco, ciertos virus o metabolitos mutágenos producidos en las infecciones crónicas, podrían inducir cambios en un antioncogén celular (CIF). Como consecuencia, el CIF quedaría inactivado, lo que a su vez conllevaría la expresión incontrolada del DNA del papilomavirus (zur Hausen, 1989).

La comprobación de la hipótesis de la implicación del papilomavirus en el proceso oncogénico del epitelio cervical depende, lógicamente, de la disponibilidad de las técnicas para la demostración de la presencia del virus, que se revisan a continuación.

1.2. METODOS DE DETECCION DE LA INFECCION POR PAPILOMAVIRUS

La infección por el HPV fue reconocida inicialmente por la apariencia característica del condiloma acuminado. Con posterioridad, se confirmó la presencia del virus en este tipo de lesiones mediante la microscopía electrónica, después mediante la demostración de antígenos virales, y finalmente mediante las técnicas de detección génica. A medida que los métodos de diagnóstico de laboratorio fueron desarrollándose, se pudo comprobar que la infección podía existir sin manifestaciones clínicas, es decir, de forma latente. Las infecciones subclínicas podían ser detectadas mediante la identificación de células características en preparaciones citológicas e histológicas, y por colposcopia, mientras que las infecciones latentes solo eran detectables por métodos de hibridación de DNA. En este apartado se revisan los diferentes métodos diagnósticos desarrollados hasta el presente (observación clínica, citología/histología, inmunocitoquímica, técnicas de hibridación de DNA y PCR), y en particular, sus aplicaciones y limitaciones técnicas.

1.2.1. OBSERVACION CLINICA.

La infección por HPV del tracto genital femenino se manifiesta clínicamente por la presencia de una lesión característica, denominada condiloma acuminado (o papulosis bowenoide). La infección subclínica puede demostrarse mediante el examen colposcópico del tejido infectado. Sin embargo, las infecciones que se expresan clínicamente representan probablemente sólo un pequeño porcentaje

del total, por lo que los métodos clínicos de diagnóstico -exploración física y colposcopia- tienen una sensibilidad limitada. Además, no es posible la identificación de los diferentes tipos de papiloma sobre la base del aspecto de la lesión y, son precisamente las infecciones por los virus de "alto riesgo", el HPV 16 y 18, las que tienden a expresar manifestaciones menos floridas (Syrjanen, 1989).

1.2.2. MICROSCOPIA OPTICA.

Determinadas infecciones víricas pueden condicionar cambios en la morfología celular que son específicos de la enfermedad, y que pueden observarse en las muestras histológicas o citológicas. Las células infectadas por el papilomavirus tienen una apariencia característica. En los frotis de cérvix teñidos con la técnica de Papanicolaou, se considera como específico de la infección, la presencia de células de aspecto característico: los coilocitos y las células disqueratóticas. Los coilocitos son células epiteliales superficiales, con núcleo hipercromático, halo claro perinuclear, y con citoplasma denso, que se reduce a un delgado ribete periférico. Las células disqueratóticas proceden de estratos intermedios del epitelio cervical y se caracterizan por su núcleo hipercromático y citoplasma densamente queratinizado. Otros signos morfológicos, como la bi-multinucleación y la paraqueratosis, se asocian también a la infección por HPV, pero se consideran poco específicos (Coleman and Richman, 1985.; Meisels, 1976). En las muestras histológicas, el epitelio cervical infectado por HPV presenta una marcada proliferación celular, que ocasiona la formación de los pliegues característicos de las lesiones papilomatosas o condilomas. Ultimamente, se ha comprobado que el papilomavirus es también causante de lesiones no papilomatosas, denominadas condilomas planos, que pasaron

inadvertidas con anterioridad. La presencia de coilocitos y de células individuales queratinizadas permite reconocer la etiología vírica de estas lesiones.

Sin embargo, y a pesar de que los criterios para el diagnóstico cito/histológico de la infección por el virus están bien definidos, la utilidad de la microscopía óptica (M.O.) en la demostración de la infección es limitada. Fundamentalmente, porque existe un cierto grado de subjetividad en la interpretación de los cambios morfológicos inducidos por el virus, e incluso se han encontrado variaciones significativas entre los diagnósticos de diferentes observadores (Robertson y cols., 1989). Por otra parte, se considera que la M.O. no tiene aplicación para la identificación de los tipos específicos de HPV (Jenkins y cols., 1986). Se ha sugerido que la presencia de mitosis anormales en el condiloma plano es indicativo de infección por el tipo 16 de HPV (Crum y cols., 1984), pero otros autores no han podido confirmar esta observación.

No obstante, y a pesar de sus limitaciones, la M.O. es en la actualidad la base diagnóstico de la infección y del subsiguiente seguimiento/tratamiento de la paciente.

1.2.3. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

El virus del papiloma tiene un diámetro máximo de aproximadamente 54 nm, y al microscopio electrónico (M.E.) aparece como una partícula icosaédrica en el núcleo de las células con infección productiva. (Coleman y Richman, 1985). La M.E. se aplica en investigación clínica, y se ha utilizado para demostrar la presencia de HSV y HPV en muestras de cérvix uterino. Sin embargo, el

rendimiento de la técnica es muy limitado y se acepta en general que la M.E. tienen una aplicación mínima en el campo del diagnóstico de HPV (Ferenzy y cols., 1981).

1.2.4. CULTIVO DE TEJIDOS.

El cultivo de tejidos es un método sensible y específico para la identificación de algunos tipos de virus, como el HSV. Sin embargo, por el momento, no se ha desarrollado un sistema capaz de soportar el cultivo productivo del papilomavirus humano, a pesar del considerable esfuerzo invertido (Rowson y Mahy, 1967; Butel, 1972; Cubie, 1974 y Eisinger y cols., 1975).

1.2.5. IDENTIFICACION INMUNOHISTOQUIMICA DE ANTIGENOS VIRALES.

La inmunohistoquímica se ha utilizado con éxito en la detección de antígenos de HPV en cérvix y otros tejidos (Walker y cols., 1983; Kurman y cols., 1981).

La muestra de tejido a analizar se incuba con el anticuerpo obtenido frente al antígeno de interés (puede ser monoclonal o policlonal) en un animal inmunizado. El anticuerpo está marcado con una partícula fluorescente o coloreada que, bajo las condiciones adecuadas de iluminación, se puede identificar con el microscopio óptico. De este modo, se localiza el antígeno, y por tanto, al agente infeccioso por un procedimiento denominado método directo, ya que el marcador está atado directamente al anticuerpo específico. Las

partículas fluorescentes utilizadas comunmente son la rodamina y el isothiocianato de fluoresceína. Para la observación en condiciones normales de iluminación se emplea en general la enzima peroxidasa de rábano (Nakane y Kawaoi, 1974), que al reaccionar con un sustrato adecuado, como tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) produce una sustancia final coloreada, que marca la localización del antígeno. En los últimos años, se han desarrollado varios métodos inmunohistoquímicos indirectos. El que se utiliza comunmente es el denominado método "sandwich": el tejido de interés se incuba con el anticuerpo específico frente a antígenos de la cápsula viral. A continuación se añade el segundo anticuerpo, dirigido contra el primer anticuerpo, y marcado con una enzima o una partícula fluorescente. El método indirecto tiene como ventaja frente al directo su mayor sensibilidad (Heyderman 1979). Un tercer método, ampliamente utilizado, es el denominado de la peroxidasa-antiperoxidasa o P.A.P. Se trata también de un procedimiento indirecto; el primer y segundo anticuerpo no están marcados, y el tercero es un complejo inmune de peroxidasa-antiperoxidasa. El segundo anticuerpo actúa como un puente entre el primer anticuerpo y la antiperoxidasa (Heyderman 1979). Como alternativa, se ha desarrollado el método del complejo avidina-biotina, de mayor sensibilidad. Se emplea un segundo anticuerpo unido a una molécula de biotina, que a continuación se incuba con el complejo avidina-biotina-peroxidasa. La reacción se visualiza también con DAB.

La inmunohistoquímica, aplicada para la detección de antígenos del HPV, tiene dos inconvenientes fundamentales: no permite la identificación de los tipos específicos del virus, y es una limitada sensibilidad, ya que únicamente detecta las proteínas víricas codificadas por los genes tardíos (L1) del virus, que sólo pueden expresarse en las células epiteliales más diferenciadas. Por tanto, el porcentaje de muestras positivas desciende a medida que aumenta el grado de malignidad de la lesión, desde CIN 1 hasta carcinoma invasivo. De todos

modos, si se comparan las técnicas de detección de antígenos con la microscopía electrónica, utilizando como evidencia de la infección por HPV la presencia de coilocitos en muestras citológicas, se demuestra que tienen una mayor sensibilidad (Ferenczy y cols., 1981). La especificidad de las técnicas de detección inmunohistoquímica ha sido confirmada en varios laboratorios; virtualmente, en el 100% de las muestras positivas se identifican viriones con el microscopio electrónico (Kurman y cols., 1981).

En resumen, las diferentes técnicas mencionadas tienen un inconveniente en común: se requiere que el virus tenga actividad transcripcional, de traducción, y sintetice proteínas víricas, para que pueda ser detectado. Si se utiliza la microscopía electrónica es necesario, además, que se produzcan partículas víricas completas. Como la infección por HPV sólo es productiva en las células epiteliales diferenciadas, únicamente las células más superficiales contienen partículas víricas. Sin embargo, el genoma del virus sin actividad puede estar presente en otras células epiteliales. Por lo tanto, el procedimiento más fiable de detección del HPV será aquel que permita la identificación inequívoca del genoma viral.

1.2.6. METODOS DE DETECCION GENICA

En la actualidad, se emplean una variedad de técnicas de detección génica para demostrar la presencia de los tipos específicos de HPV en los tejidos. Algunas se aplican directamente a la muestra de células o tejidos (hibridación in situ, y su variante, hibridación in situ en filtro), y otras exigen el aislamiento previo del DNA de la muestra (Southern-blot, Dot/ Slot-blot, y recientemente, PCR).

Los diferentes métodos de detección génica desarrollados hasta el presente se basan, en definitiva, en la capacidad que tiene una cadena simple de DNA de ensamblarse con la correspondiente cadena complementaria, un proceso que se ha denominado hibridación. Se requiere que una de las cadenas, el DNA desconocido, se encuentre inmovilizada en un soporte sólido, y que la cadena complementaria, llamada sonda, esté marcada de forma que pueda ser detectada.

La capacidad que tiene el DNA de unirse de forma reversible a una membrana de nitrocelulosa fue descubierta hace más de 20 años (Nygaard y Hall, 1963). Poco tiempo después se demostró que tal unión se convertía en irreversible si el filtro era sometido a una temperatura de 80° C. durante un cierto tiempo (Gillespie and Spiegelman, 1965). La naturaleza de esta unión es desconocida, aunque se ha sugerido que implica la formación de puentes de hidrógeno o de interacciones hidrofóbicas entre las bases del DNA y la nitrocelulosa (Seed, 1982).

El Southern-Blot es la técnica de detección génica más comunmente utilizada (Southern, 1975). En primer lugar, el DNA se aísla de la muestra de interés para ser sometido, a continuación, a un tratamiento con enzimas de restricción. De esta forma, se producen una serie de fragmentos de una longitud determinada, específicos del genoma en estudio, que son separados en base a su tamaño, mediante electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida. El DNA fijado al gel se desnaturaliza en un medio alcalino, y se neutraliza. A continuación, se procede a efectuar la transferencia de las bandas de DNA a un filtro de nylon o de nitrocelulosa, mediante acción capilar. Las posiciones de los diferentes fragmentos de DNA se conservan en este proceso, de modo que el filtro se convierte en una réplica exacta del gel. Si se somete al filtro a una temperatura de 80° C, el DNA queda fijado de forma irreversible. Las secuencias específicas se detectan incubando el filtro con una cadena simple de la sonda de DNA marcada con un isótopo radioactivo, en unas condiciones adecuadas para que se produzca

la hibridación.

Aunque su utilización está muy extendida, tanto para la detección de determinadas secuencias del DNA genómico como para el análisis de secuencias clonadas de DNA, el Southern-Blot presenta algunas limitaciones técnicas. El principal inconveniente es que se requieren cantidades grandes de DNA -aproximadamente entre 5 y 10 microgramos- para la demostración del virus en una muestra de DNA genómico (Maniatis y cols., 1982). La sensibilidad de detección es de 0,1 copias del virus por célula huésped. Aparte de intentar mejorar la sensibilidad de las técnicas de detección, es poco lo que se puede hacer para superar este problema. Otra desventaja de la técnica es que los fragmentos largos de DNA -de más de 10 Kbp- no se transfieren de forma eficiente al filtro, y los fragmentos pequeños -de menos de 200 bp- no se unen con facilidad a las membranas de nitrocelulosa (Wahl y cols., 1979).

Cuando se trata de demostrar simplemente la presencia o ausencia de una secuencia particular en una muestra de DNA, la técnica de Dot-blot o Slot-blot se utiliza como alternativa a la de Southern-blot. Al igual que en el Southern-blot, se requiere el aislamiento previo del DNA a analizar. El DNA se transfiere directamente al filtro, donde se desnaturaliza y se fija a 80° C (Anderson y Young, 1985). Para efectuar la transferencia se utiliza un aparato de succión por vacío (Manifold). (Bowles y cols., 1986). El método de Slot-blot es con frecuencia más sensible que el Southern-blot, ya que tanto las secuencias intactas como las parcialmente degradadas pueden contribuir a la señal, con la ventaja adicional de que se requieren cantidades mucho menores de DNA -aproximadamente 500 nanogramos-. La sensibilidad de detección es de 1 copia del virus por célula huésped. Sin embargo, la especificidad es menor, y es necesario un diseño riguroso de los controles positivos y negativos, para evitar resultados falsos positivos. Además de información sobre la presencia o no de

una determinada secuencia de DNA, el Slot-blot permite obtener, mediante análisis por densitometría de la señal, una estimación del número de copias detectadas.

Al igual que otras muchas macromoléculas biológicas, los ácidos nucleicos ocupan posiciones determinadas dentro de las células. Cuando las células se rompen para extraer el DNA que contienen, se pierde información útil. Para evitar este inconveniente, se han desarrollado las técnicas de hibridación in situ (Pardue y Gall, 1969, Henning, 1980). Se utilizan sondas altamente radioactivas que hibridan in situ con el DNA del tejido, previamente desnaturizado por exposición a un medio de pH alto. La preparación se cubre a continuación con una película que se autorradiografía durante varias semanas. El inconveniente de la técnica es su baja sensibilidad, ya que el límite de detección está entre 50 a 200 copias del genoma del virus por célula huésped (Grody y cols., 1987). Sin embargo, puede detectar el DNA del HPV cuando sólo está presente en una subpoblación de células, si estas contienen un alto número de copias, mientras que el Southern o Slot-blot pueden resultar inadecuados.

La denominada hibridación in situ en filtro (FISH) representa una modificación de la técnica descrita, y permite la demostración de secuencias de DNA presentes en células exfoliadas, transferidas directamente a un filtro de nitrocelulosa, mediante un aparato de succión al vacío. El DNA celular se desnaturiza y a continuación se hibrida sobre el filtro. Aunque este método es rápido y técnicamente más simple que los anteriormente descritos, presenta el inconveniente de producir un elevado porcentaje de resultados falsos positivos.

Sea cual sea el procedimiento utilizado para inmovilizar el DNA, la detección de secuencias específicas depende de la hibridación del DNA de la muestra con una sonda marcada. La utilización de un determinado fragmento de DNA como

sonda, exige previamente su obtención en un estado puro, y en cantidad suficiente. Para ello se aísla la secuencia de interés y se inserta en un plásmido bacteriano o en un bacteriófago, como por ejemplo el fago lambda. Un plásmido bacteriano es una pequeña molécula circular de DNA dúplex que puede replicarse independientemente del DNA cromosómico de la bacteria. La célula bacteriana puede contener un gran número de copias del mismo. Las secuencias de interés se insertan en puntos específicos del plásmido que son identificados por las endonucleasas de restricción (Roberts, 1976), enzimas que rompen de forma específica el DNA, capaces de reconocer determinadas secuencias de bases -generalmente entre 1 y 4- y de unirse a ellas (Smith, 1979). En estos puntos se producen cortes y se inserta la cadena de DNA que se desea amplificar. La unión se completa mediante el tratamiento del DNA con una ligasa. A continuación, se procede a la transformación de una bacteria - *Escherichia Coli* casi siempre-con el plásmido. La bacteria se cultiva a gran escala, en un medio que contiene el antibiótico adecuado. Como los plásmidos transportan genes que confieren resistencia a determinados antibióticos, sólo las células que los portan sobreviven, y son seleccionadas de este modo (Hanahan, 1984). El procedimiento de separación del plásmido del DNA genómico de la bacteria es sencillo, y se basa en las diferentes propiedades físicas de ambos DNAs (plásmido y genoma de la bacteria) (Ish-Horowitz y Burke, 1981). La secuencia de DNA de interés se separa del plásmido mediante la endonucleasa de restricción apropiada, y a continuación se purifica mediante electroforesis en un gel de agarosa.

En general, se marca el DNA con un radioisótopo. Para ello, existen varios métodos. Uno de los más empleados es el denominado de "nick translation" (traducción por corte) (Rigby y cols., 1977). Mediante la acción de la DNA polimerasa 1 y la DNAasa 1, se incorporan nucleótidos marcados con p³² a una cadena doble de DNA. La DNAasa 1 hace cortes al azar en la cadena de DNA, y

por la acción exonucleasa de la DNA polimerasa, son retirados los nucleótidos del extremo fosforilado 5' del corte. Al mismo tiempo, y en presencia de los cuatro tipos de desoxirribonucleósido trifosfato (dNTPs), la DNA polimerasa 1 va añadiendo nucleótidos desde el terminal hidroxilado 3', mediante su acción polimerasa. Con este método se obtiene una variedad de fragmentos de DNA marcados (subfragmentos de la secuencia completa de la sonda, que hace óptima la sensibilidad de la sonda), con una actividad específica de hasta 108 desintegraciones por minuto (dpm) por microgramo.

En la actualidad, el método más utilizado es el denominado "random oligomeric primer extension" (extensión de cebadores o primeros oligoméricos) (Feinberg y Vogelstein, 1983). El procedimiento requiere la desnaturalización previa del DNA a marcar. A continuación, las dos cadenas de DNA vuelven a aparearse con hexanucleótidos del medio que actúan como cebadores para la síntesis de novo de cadenas complementarias de DNA, mediante la acción del fragmento Klenow (la subunidad larga) de la polimerasa 1 del DNA. Por este procedimiento se obtiene DNA marcado con una actividad específica de hasta 2×10^9 dpm por microgramo, y por lo tanto, el método tiene la ventaja respecto al anterior de precisar cantidades menores de sonda de DNA.

El filtro se incuba con la sonda marcada, que ha sido desnaturalizada previamente a alta temperatura, en un medio favorable para la hibridación (solución con alta concentración de sales). Una de las dificultades que plantea la utilización de sondas de doble cadena de DNA es su tendencia a reanillarse en solución, lo que limita su capacidad de hibridación con las secuencias diana del filtro. Para evitar este problema se utilizan sondas de cadena simple de DNA, obtenidas por clonación en un vector de cadena simple de DNA, como el bacteriófago viral M13 (Messing y cols., 1977). Para prevenir una posible unión inespecífica de la sonda al filtro, se añade a la solución de hibridación

DNA no relacionado con la secuencia de interés, que bloquea los puntos de potencial afinidad inespecífica.

Finalmente, el filtro hibridado es sometido a varios lavados con soluciones salinas de baja concentración, para favorecer la disociación del DNA. De este modo, únicamente se mantienen los enlaces altamente específicos. Cuanto más extremas sean las condiciones adversas para la hibridación, o lo que es lo mismo, cuanto menor sea la concentración de sales de los medios de lavado del filtro, mayor será la analogía de las secuencias de DNA que permanezcan hibridadas. Finalmente, las secuencias específicas unidas a la sonda marcada con el isótopo radioactivo se detectan por autorradiografía, mediante exposición de los filtros con una película sensible a la radiación X

En general, las técnicas de hibridación molecular desarrolladas por el momento presentan dos inconvenientes. En primer lugar que exigen mucho tiempo de dedicación, con el problema último de que la detección por autorradiografía de las sondas marcadas con el isótopo radioactivo dura varios días y, en el caso de la técnica in situ, varias semanas. En segundo lugar, que las sondas marcadas con un producto radioactivo tienen una "vida" limitada por la vida media del radioisótopo utilizado, que en el caso del ^{32}P es de 14.3 días únicamente. En la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas que tratan de obviar estos inconvenientes; en particular se están efectuando pruebas para sustituir los radioisótopos por otro tipo de marcadores no radioactivos (Figueiredo y cols., 1986).

La PCR (Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa) representa la última novedad técnica introducida para el diagnóstico de la infección por HPV (Young y cols., 1989). El objetivo de la reacción es aumentar la cantidad de DNA del virus, mediante ciclos sucesivos de

amplificación, de forma que el producto final resulte fácilmente visible en un gel de agarosa (Figura 1). Brevemente, cada ciclo de la reacción consta de tres etapas: (i) Fase de desnaturalización del DNA (94°C); (ii) Fase de anillamiento: donde fragmentos específicos de DNA del HPV, denominados “cebadores” o “primeros”, reconocen las secuencias complementarias del DNA (ya desnaturalizado) de la muestra a analizar y se unen a ellas formando dúplex. Los cebadores son oligonucleótidos de síntesis, de 20 a 25 bases, que limitan los dos extremos de la secuencia del DNA del virus a amplificar. De la especificidad de los cebadores en el reconocimiento del DNA diana, depende por completo la especificidad de la reacción. (iii) Fase de extensión: donde la enzima Taq-polimerasa sintetiza una nueva cadena de DNA, añadiendo nucleótidos al extremo 3’ del cebador unido a la cadena de DNA diana, y utilizando a ésta como patrón. Este ciclo se repite hasta 50 veces, de forma que el DNA del virus se amplifica exponencialmente. La secuencia de DNA comprendida entre ambos cebadores se convierte, rápidamente, en el producto preferente de la reacción. Después de 30 ciclos, se acumula aproximadamente un microgramo de DNA de la secuencia del virus amplificada. Finalmente, se procede al análisis



FIGURA 3: El diagrama muestra una doble cadena de DNA genómico (líneas horizontales paralelas) con las secuencias complementarias a los cebadores (triángulo y cuadrado) en negrita. La Taq-polimerasa dirige la síntesis de DNA en la dirección de las flechas. Los dos cebadores definen la secuencia a amplificar. Después del primer ciclo, las cadenas de DNA recién sintetizadas actúan también como patrón, lo que da lugar a la reacción en cadena. (De *Recent Advances in Histopathology*, nº 14, Edit. Churchill Livingstone).

electroforético de alicuotas de la mezcla de la reacción, para comprobar que el tamaño del DNA amplificado es el esperado de acuerdo con el diseño de los cebadores.

La ventaja fundamental de la técnica, su gran sensibilidad, representa también su principal inconveniente. La PCR permite detectar hasta una copia del genoma del virus por cada 100.000 células, lo que significa que, si el resultado es negativo, se puede tener prácticamente la certeza de que no hay infección por el virus. Sin embargo, se pueden producir falsos resultados positivos por contaminación de la muestra si no se extreman las precauciones, y este riesgo es elevado en los laboratorios en los que se manipula con plásmidos de HPV. Otra ventaja adicional es que no hay necesidad de utilizar marcadores radioactivos.

Hasta la fecha, las diferentes técnicas descritas se han utilizado fundamentalmente en investigación básica, pero su aplicación en el campo del diagnóstico histo-patológico es cada vez más frecuente.

1.3. EL PAPILOMAVIRUS Y SU ASOCIACION CON EL CANCER DE CERVIX.

A pesar de que las partículas víricas fueron detectadas en las verrugas hace ya más de 40 años (Strauss y cols.,1949), no se hicieron progresos significativos en el conocimiento de la biología del papilomavirus humano hasta la introducción reciente de la tecnología del DNA recombinante. El principal obstáculo para el estudio del HPV ha sido la imposibilidad de propagar el virus "in vitro". Unicamente las células más diferenciadas son capaces de soportar la replicación del virus, y el hecho de que las células epiteliales sean incapaces de diferenciarse en cultivo puede ser la razón del fracaso de los numerosos intentos realizados en este sentido. Hasta la introducción de las técnicas de clonación, sólo era posible la obtención del DNA viral a partir de material de biopsias. El virus, sin embargo, se encuentra presente en el tejido epitelial infectado en cantidades mínimas, que representan aproximadamente la centésima parte del DNA necesario para una sólo experiencia de hibridación. Las técnicas de clonación molecular han hecho posible la obtención del DNA viral en cantidades suficientes para su utilización en análisis posteriores.

Se han desarrollado dos líneas fundamentales de evidencia sobre la asociación entre el papilomavirus y el cáncer de cérvix, que se revisan a continuación. La primera se basa en estudios epidemiológicos practicados en diferentes áreas geográficas, y la segunda, en estudios "in vitro" realizados en los últimos años.

1.3.1. ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS

Los primeros estudios que demostraron la asociación que existe entre el papilomavirus y el cáncer de cérvix se basaron en métodos convencionales de diagnóstico de la infección.

En una revisión epidemiológica efectuada sobre una serie de 1.108 mujeres, se comprobó que había una correlación entre la infección por HPV y la presencia de CIN: un 8.1% de las pacientes con condilomas genitales mostraban lesiones preneoplásicas del epitelio cervical (Franceschi y cols. 1983). Por el contrario, no se encontró relación alguna entre la existencia de CIN y la infección por Herpes simplex, trichomonas vaginalis o gonorrea. Por otra parte, un porcentaje elevado de las mujeres infectadas por HPV, desarrollaron una lesión preneoplásica con posterioridad, como se comprobó en una revisión citológica realizada tres o cuatro años después, mientras que no se encontraron anomalías citológicas en ninguna de las mujeres infectadas por Herpes. Los autores concluyeron que la infección por Herpes simplex no podía considerarse un factor de riesgo de cáncer de cérvix, al contrario de la infección por algunos tipos de papilomavirus.

Otros investigadores habían demostrado con anterioridad la presencia de partículas del HPV en tumores de cérvix, mediante la utilización del microscopio electrónico (Stanbridge y cols., 1981). Sin embargo, estos resultados no fueron concluyentes, según destacaban los propios autores, debido a que la muestra era muy pequeña (10 mujeres), y la concentración de partículas víricas muy baja.

Las técnicas inmunocitoquímicas han sido ampliamente empleadas para la demostración de la presencia de antígenos de la cápside del HPV en muestras de tejido cervical. Walker y cols.(1983) utilizaron una técnica indirecta de fosfatasas alcalinas y un antisuero policlonal obtenido por inmunización de un

conejo con proteínas de la cápside del virus procedente de una verruga plantar. Demostraron la presencia del antígeno del papilomavirus en un 20.1% de las biopsias de las pacientes referidas a consulta por una citología cervical anormal, y en el 18.3% de los casos con un diagnóstico histológico de CIN. Como estas cifras eran mucho menores de las previstas, los autores sugirieron, como explicación, que el epitelio cervical era sólo parcialmente permisivo a la expresión del antígeno viral.

También se han publicado algunos estudios basados en métodos serológicos de detección del virus, que demuestran la relación entre la infección por papilomavirus y la neoplasia cervical. Baird (1983) comprobó que las pacientes con papilomas anogenitales, CIN o cancer invasivo, tenían un elevado título de anticuerpos específicos contra el HPV en comparación con un grupo control. Sin embargo, no se han realizado trabajos posteriores que confirmen estos resultados.

Aunque aporten información sobre la relación que existe entre el HPV y el cáncer de cérvix, todos los trabajos citados tienen una limitación en común: están basados en métodos de identificación del HPV que precisan que el genoma viral presente actividad transcripcional y de traducción. El virus, sin embargo, no necesariamente muestra esta actividad en el tejido infectado. De modo que, hasta la reciente introducción de las técnicas de hibridación del DNA y la identificación de los diferentes genotipos del virus, no se ha dispuesto de un método sensible para la demostración de la infección. Zur Hausen y sus colaboradores aislaron el DNA de los cuatro genotipos de papilomavirus que son más frecuentes en el tracto genital femenino: los tipos 6, 11, 16 y 18 de HPV (Gissmann y cols., 1980; Gismann y cols., 1982b; Durst y cols., 1983; Boshart y cols., 1984)(Figura 3). La clasificación se efectuó tanto en base a la extensión de la hibridación cruzada entre sus respectivos genomas, como se

describió en la sección *1.1.1*, como en base a las diferencias en sus puntos de restricción. El DNA del HPV 6 fue aislado a partir de una muestra de un condiloma acuminado (Gissmann y cols., 1980). Mediante la técnica de "Southern-blot", Gissman investigó la presencia del DNA del virus en una total de 44 condilomas y una serie de tumores genitales, que incluía 54 carcinomas cervicales, 10 carcinomas de pene y 2 carcinomas vulvares (Gissman y cols., 1982b). Un 93% de las muestras de condiloma resultaron positivas para el HPV 6, mientras que en ninguno de los tumores malignos se detectó DNA viral, incluso en condiciones muy favorables para la reacción de hibridación. A pesar de estos resultados, los autores no descartaron la posibilidad de que el HPV 6 estuviera implicado en las fases iniciales de la oncogénesis cervical, ya que algunos condilomas presentaban severas atipias celulares y figuras de mitosis anormales

El HPV 11, muy próximo al HPV 6, fue aislado y clonado originalmente a partir de una muestra de un papiloma laríngeo (Gissmann y cols., 1982a; Gissmann y cols., 1983). Los tipos 6 y 11 de HPV hibridan entre sí, en determinadas condiciones, debido a que tienen una homología del 25% de sus secuencias de DNA, por lo que en la literatura se informa a menudo de resultados mixtos positivos para HPV 6 o 11.

Los tipos 16 y 18 de papilomavirus fueron aislados y clonados a partir de biopsias de carcinomas de cérvix (Durst y cols., 1983; Boshart y cols., 1984). Cuando se confrontaron a una serie de tumores genitales mediante la técnica de Southern-blot, se comprobó que el 53% de las muestras de carcinoma in situ de cérvix (CIN 3) y el 57% de carcinoma invasivo resultaban positivas, mientras que sólo en el 6% de los condilomas acuminados y en el 16% de los condilomas planos se detectaba la presencia del DNA viral. Por lo tanto, se demostró la asociación preferente de los tipos 16 y 18 de HPV con los tumores malignos.

PAIS	TEST	MUESTRA				REFERENCIA	
		NORMAL	CONDILOMAS	CIN1-2	CIN3		CANCER
ALEMANIA	S	-	62/68	-	2/6	1/13	Gissmann 84
RU	S	1/3	-	7/12	5/7	-	McCance 83
ALEMANIA	FIS	4/36	-	6/13	4/22	-	Wagner 84
ALEMANIA	FIS	1/229	6/6	14/45	5/22	2/4	Schneider 85
RU	S	0/17	-	23/50	14/28	0/13	McCance 85
ALEMANIA	S	0/2	61/81	12/80	-	1/23	Villiers 86
ESCOCIA	S	0/3	0/4	-	1/16	0/3	Millan 86
RU	S	0/104	-	2/27	-	-	Toon 86
EE UU	S	2/6	7/12	2/12	0/18	-	Webb 87
SURAMERICA	FIS	7/51	-	-	-	9/46	Reeves 87
EE UU -	S	-	4/6	1/1	0/1	2/6	Dekmezian 87
EE UU	IS	-	20/43	-	-	2/12	Gupta 87
EE UU	D	-	8/10	-	1/2	8/23	Sutton 87
AUSTRALIA	S	0/5	-	5/11	3/12	12/54	Kuski 87
RU	D	77/202	-	-	-	-	Wickenden 87
AUSTRIA	S	0/31	-	13/76	10/140	4/44	Fuchs 88
EE UU	IS	-	-	-	-	-	Kaufman 88
EE UU/BRAS	S	-	-	19/124	1/32	0/58	Kurman 88

TABLA 1: Asociación del HPV 6 y 11 con lesiones específicas del tracto genital femenino. Los resultados para ambos genotipos se agrupan, debido a que muchos estudios no hacen distinción entre el HPV 6 y 11.. Técnica de detección del DNA: S, Southern blot, D, dot blot (slot blot), IS, hibridación in situ, FIS, hibridación in situ en filtro.

En un estudio posterior, se demostró que el 70% de los condilomas con figuras de mitosis anormales contenían el DNA del HPV 16 (Crum y cols., 1984), frente al 8% de los condilomas sin mitosis anormales. Los autores concluyeron que la presencia de figuras anormales de mitosis se correlacionaba estrechamente con la presencia del DNA del HPV 16, y que por lo tanto, esta variedad de condiloma debía ser considerada precursora del carcinoma invasivo de cérvix.

PAIS	TEST	MUESTRA				REFERENCIA	
		NORMAL	CONDILOMAS	CIN 1-2	CIN 3		CANCER
ALEMANIA	S	-	2/33	2/20	2/9	19/41	Durst 83
RU	S	3/17	-	40/50	27/28	12/13	McCance 85
JAPON	S	-	-	-	-	3/9	Tsunokawa 86
ALEMANIA	S	0/2	0/81	24/80	-	8/23	Villiers 86
ESCOCIA	S	1/3	1/4	-	7/16	1/3	Millan 86
CANADA	D	-	-	7/43	27/54	-	Pater 86
BRAZIL	S	-	-	-	-	8/19	McCance 86
RU	S	9/104	-	8/27	-	-	Toon 86
EE UU	S	1/6	2/12	7/24	11/18	-	Webb 87
TAIWAN	S	-	-	-	-	16/30	Choo 87
EE UU	S	-	0/6	1/1	1/1	3/6	Dekmezian 87
EE UU	IS	-	5/43	-	-	7/12	Gupta 87
EE UU	D	-	6/10	-	0/2	14/24	Sutton 87
AUSTRALIA	S	0/5	-	2/11	5/12	33/54	Kulski 87
RU	D	41/202	-	-	-	-	Wickenden 87
EE UU	S	-	-	-	-	14/30	Barnes 88
AUSTRIA	S	1/31	-	18/76	67/140	25/44	Fuchs 88
EE UU	IS	-	-	-	-	-	Kaufman 88
EE UU/BRAS	S	-	-	37/124	21/32	24/58	Kurman 88

TABLA 2: Asociación del HPV 16 con lesiones específicas del tracto genital femenino. Técnica de detección del DNA: S, Southern blot, D, dot blot (slot blot), IS, hibridación in situ, FIS, hibridación in situ en filtro.

En los últimos años se han practicado un gran número de estudios epidemiológicos, basados en diferentes técnicas de detección del DNA, que confirman la asociación entre el virus y el cáncer de cérvix. Las tablas 1, 2 y 3 resumen los resultados de las revisiones más amplias practicadas en diferentes áreas geográficas (HPV 6, 11, 16 y 18).

El HPV 16 es el genotipo más estrechamente asociado a las lesiones CIN y

PAIS	TEST	MUESTRA					REFERENCIA
		NORMAL	CONDILOMAS	CIN1-2	CIN 3	CANCER	
ALEMANIA	S	-	0/29	0/17	0/8	11/49	Boshart 84
JAPON	S	-	-	-	-	2/9	Tsunokawa 86
ALEMANIA	S	0/2	0/81	2/80	-	1/23	Villiers 86
ESCOCIA	S	1/3	1/4	-	3/16	0/3	Millan 86
CANADA	D	-	-	9/43	14/54	-	Pater 86
BRAZIL	S	-	-	-	-	0/19	McCance 86
RU	S	0/104	-	0/27	-	-	Toon 86
EE UU	S	1/6	2/12	7/24	3/18	-	Webb 87
TAIWAN	S	-	-	-	-	2/30	Choo 87
EE UU	S	-	1/6	0/3	1/2	2/7	Dekmezian 87
EE UU	IS	-	1/43	-	-	0/12	Gupta 87
EE UU	D	-	3/10	-	0/2	1/24	Sutton 87
AUSTRALIA	S	0/5	-	1/11	2/12	4/54	Kulski 87
RU	D	26/202	-	-	-	-	Wickenden 87
EE UU	S	-	-	-	-	6/30	Barnes 88
AUSTRIA	S	0/31	-	3/76	8/140	4/44	Fuchs 88
EE UU	IS	-	-	-	-	-	Kaufman 88
EE UU/BRAS	S	-	-	2/124	2/32	13/58	Kurman 88

TABLA 3: . Asociación del HPV 18 con lesiones específicas del tracto genital femenino. Técnica de detección del DNA: S, Southern blot, D, dot blot (slot blot), IS, hibridación in situ, FIS, hibridación in situ en filtro.

carcinomas invasivos, y su prevalencia en estas muestras oscila entre el 30 y el 87% (Durst y cols., 1983; McCance y cols., 1985), mientras que en las muestras normales varía entre el 0 y el 35% (Toon y cols., 1986; de Villiers y cols., 1987; Meanwell y cols., 1987; Wickenden y cols., 1987a). El HPV 18 es, después del HPV 16, el genotipo considerado de mayor riesgo, y ha sido detectado hasta en un 24% de las lesiones CIN y en el 22% de las muestras de carcinomas (Pater y cols., 1986, Boshart y cols., 1984). En las muestras normales, la prevalencia

oscila entre el 0 y el 20% (Kulski y cols., 1987; Wickenden. y cols.,1985). Por otra parte, se ha propuesto que el HPV 18 puede representar un papel en el desarrollo de cáncer cervical rápidamente progresivo. En un estudio sobre una serie de 214 pacientes, Kurman y cols.(1988) encontraron que la prevalencia de la infección por el genotipo 18 en las mujeres con CIN (3%) era mucho menor que la prevalencia en las mujeres con carcinoma invasivo (22%), lo que podría ser expresión del rápido tránsito hacia lesión invasiva de las lesiones precursoras asociadas al HPV 18.

Los tipos 6 y 11 han sido identificados preferentemente en las lesiones benignas de cérvix (condilomas) o en lesiones premalignas de bajo grado (CIN 1) (Gissmann y cols., 1984, McCance y cols., 1985).

En fechas más recientes, se han detectado nuevos tipos de papilomavirus (HPV 31, 33, 35, 39, 42, 45, 52b y 53) en tumores benignos y malignos de cérvix. Sin embargo, por el momento, no hay suficientes datos clínicos que permitan asignar un nivel de riesgo a estos genotipos. La tabla 4 recoge los tipos de papilomavirus identificados en lesiones benignas y malignas de cérvix.

Se han practicado muy pocas revisiones epidemiológicas amplias sobre la prevalencia del virus en poblaciones normales. El estudio más amplio realizado hasta la fecha se efectuó en Alemania, sobre una serie de 9295 pacientes de diferentes centros de planificación familiar. Se investigó la presencia de los tipos 6, 11, 16 y 18 de HPV en muestras de cérvix mediante una técnica de hibridación in situ en filtro (de Villiers y cols., 1987). El estudio citológico reveló una lesión CIN o un carcinoma en un 2% de las mujeres, y en el restante 98% no se encontraron anomalías citológicas.

TABLA 4: Tipos de papilomavirus que infectan el epitelio cervical

Tipo de HPV	Autor
6a-f	Gissmann and zur Hausen (1980).
11a,b	Gissmann y cols. (1982a).
16	Durst y cols. (1983).
18	Boshart y cols. (1984).
31	Lorincz y cols. (1986).
33	Beaudenon y cols. (1986).
35	Lorincz y cols. (1987).
39	Beaudenon y cols. (1987).
42	Beaudenon y cols. (1987).
45	Naghashfar y cols. (1987).
51	Nuovo y cols. (1988).

La presencia del virus se demostró en el 9% de las muestras normales, y en el 35% de las muestras de CIN o carcinoma. Los autores informaron que los tipos más prevalentes fueron el HPV 16 y 18 y que la tasa de infección estaba en relación con la edad de la mujer.

La introducción reciente de la técnica PCR para el diagnóstico de la infección ha dado lugar a que se planteen nuevas dudas acerca del carácter de la relación del HPV con el cáncer de cérvix. A lo largo de los dos últimos años, se han publicado los resultados de varios estudios practicados en diferentes áreas

geográficas con la técnica PCR de alta sensibilidad. Básicamente, todos los grupos han obtenido resultados similares para HPV 16 en las muestras de cáncer cérvix o CIN, donde las cifras de prevalencia de la infección oscilan entre el 80 y el 100%. Sin embargo, hay una gran disparidad en las cifras obtenidas en las muestras de mujeres con una citología normal, que varían de 0 hasta un 80% (Young y cols., 1989, Ward y cols., 1989, van den Brule y cols., 1990).

1.3.2. SINERGISMO CON OTROS FACTORES DE RIESGO

(i) Carcinógenos. Se considera que el proceso oncogénico del epitelio cervical consta de varias etapas. El papilomavirus actuaría como agente promotor del mismo, y otros carcinógenos físicos o químicos determinarían la transformación maligna de las células epiteliales (zur Hausen, 1989).

El tabaquismo es considerado como un factor significativo de riesgo de cáncer de cérvix (Vessey, 1986). Se ha demostrado la presencia de nicotina en el fluido vaginal, lo que indica que sustancias químicas derivadas de la misma (como la N-nitrosamina, considerada como un potente carcinógeno) pueden alcanzar las células cervicales (Sasson y cols., 1985). El Herpes Simplex podría actuar como un iniciador químico de la transformación maligna en las células infectadas (zur Hausen, 1982), aunque en la actualidad se considera que no tiene un papel etiológico clave en el proceso oncogénico del epitelio cervical. En la mucosa laríngea se ha demostrado el desarrollo de carcinomas a partir de papilomas benignos, tras la exposición a radiaciones X, lo que soporta el papel sinérgico de agentes mutágenos físicos con el HPV (zur Hausen, 1977). La transformación maligna de las lesiones cutáneas de epidermodisplasia verruciformis es un claro ejemplo de cooperación entre tipos específicos de HPV

(5 y 8) y un agente físico (radiaciones ultravioletas)(Orth, 1987). Los anovulatorios orales y el déficit de vitaminas han sido también propuestos como posibles cofactores (Swan y cols., 1981; Harris y cols, 1986)

(ii) Inmunosupresión. En una serie de mujeres sometidas a transplantes renales, se demostró que la prevalencia de condilomas cervicales era cinco veces superior a la población normal (Schneider y cols., 1982). De las 11 pacientes con condilomas cervicales, 5 desarrollaron carcinomas invasivos en el periodo de 3 años. Estos resultados sugieren que existe un aumento significativo del riesgo de progresión de las lesiones proliferativas inducidas por el HPV (condilomas) en condiciones de inmunodeficiencia.

1.3.3. ESTUDIOS IN VITRO

Varios de los genotipos de papilomavirus considerados de alto riesgo pueden inducir “in vitro” la transformación maligna de células epiteliales de roedores. Los tipos 5, 16 y 18 de papilomavirus transforman las líneas celulares de roedor C127 y NIH 3T3 (Watts y cols., 1984; Yasumoto y cols., 1986), y los tipos 16, 18, 31 y 33, transforman células epiteliales renales de roedor en cooperación con el oncogén c-Ha-ras (Storey y cols., 1988). Sin embargo, no se ha conseguido la transformación experimental de queratinocitos humanos, las células diana del virus “in vivo”. La transfección de estas células con los tipos de HPV 16, 18, 31 o 33 induce su inmortalización, pero no su transformación (Durst y cols., 1987; Woodworth y cols., 1989). No obstante, los queratinocitos transfectados pierden sus características normales de diferenciación in vitro, y presentan alteraciones morfológicas semejantes a las de las lesiones preneoplásicas cervicales (CIN) (McCance y cols., 1988). Además,

estas células retienen el DNA del HPV en estado integrado, y expresan las funciones tempranas del genoma viral. Sin embargo, no inducen tumores si son transplantadas en ratones desnudos, por lo que difieren claramente de las células derivadas de carcinomas. Si se añade c-Ha-ras activado al cultivo de células transfectadas, se produce la transformación maligna completa; inoculadas en ratones desnudos las células transformadas producen carcinomas de células escamosas (Di Paolo y cols., 1989).

Se considera que los ORF E6 y E7 del virus son los responsables de las funciones transformantes de los tipos 16 y 18 de HPV. Se ha comprobado que tanto los carcinomas cervicales humanos como las líneas celulares derivadas de estos expresan RNAm y proteínas de E6 y E7 (Smotkin y Wettstein, 1987). Por otra parte, como se comenta ampliamente en la sección 1.1.3., el patrón regular de integración del genoma viral en la célula maligna huésped implica la conservación de secuencias URR-E6-E7 intactas, lo que hace posible la continua expresión de los ORF E6 y E7.

1.4. OTRAS LOCALIZACIONES ESPECIFICAS DEL PAPILOMAVIRUS.

Una característica notable de los tipos específicos de papilomavirus es su marcado tropismo por la variedad de epitelio que infectan. La base molecular de este comportamiento es desconocida. Se ha propuesto como explicación una posible afinidad de los receptores de superficie de determinadas células epiteliales por las proteínas de la cápside del virus (Arends y cols., 1990). La tabla 5 recoge la relación de los tipos de HPV identificados hasta el presente y las lesiones clínicas a las que se asocian.

(i) Tumores del tracto genital. La mayor parte de la evidencia epidemiológica que existe sobre el potencial oncogénico del HPV se ha obtenido en estudios sobre la prevalencia del virus en diferentes tumores genitales. La información disponible sobre la asociación HPV/ cáncer de cérvix se revisa en la sección 1.3, por lo que en este apartado se hace referencia únicamente a los estudios sobre la relación del virus con otros tumores del tracto genital.

Se ha informado que existe una asociación entre los tipos de bajo (6 y 11) y alto riesgo (16 y 18) de papilomavirus y los tumores benignos y malignos de vulva, respectivamente (Pfister, 1987). Según los resultados de otros estudios, sin embargo, el HPV 6 (los diferentes subtipos) es más frecuente en los tumores invasivos de vulva que los tipos 16 y 18, por lo que el esquema de riesgo relativo, en términos de potencial oncogénico, asociado a la infección por determinados genotipos de HPV no se mantiene en el caso de los tumores vulvares (Sutton y cols., 1987).

El DNA del HPV se ha detectado también en algunas lesiones anales y perianales. En general, los tipos 6 y 11 se han identificado en los condilomas benignos, mientras que los tipos 16 y 18 predominan en las lesiones premalignas y en carcinoma invasivos (Gissmann y Schneider, 1986). No obstante, se ha informado de un caso de condiloma gigante anal que progresó a carcinoma invasivo (Wells y cols., 1988).

(ii) Tumores del tracto respiratorio y digestivo. La presencia de DNA del virus en papilomas benignos de la mucosa oral, laringe y esófago ha sido demostrada en varios estudios (Steinberg, 1986 y de Villiers y cols., 1986a). El HPV 11 se aisló por vez primera de un papiloma laríngeo (Gissmann y cols., 1982), y el DNA de este genotipo, junto con el del HPV 6, se ha detectado hasta en el 90% de los papilomas laríngeos juveniles y del adulto (Corbitt y cols., 1988). Se ha informado de un caso de papiloma laríngeo, positivo para HPV 6, que progresó a carcinoma invasivo (Zarod y cols., 1988), mientras que en algunos carcinomas de laringe se ha detectado DNA del HPV 16 (Brandsma y cols., 1986).

Se ha demostrado la presencia del HPV en diferentes lesiones de la mucosa oral. En una serie de 191 casos, se detectaron antígenos de la cápside del virus en un 85% de las muestras de "hiperplasia epitelial focal" (tipo Heck), en un 75% de los condilomas y en el 45% de los papilomas (Syrjanen y cols., 1984). Loning (1985) encontró DNA de un tipo desconocido de HPV en una proporción importante de casos de leucoplasia, papilomas y carcinomas invasivos de la cavidad oral.

(iii) Tumores de la piel. Más de 20 genotipos de HPV se han identificado en las lesiones cutáneas asociadas a una enfermedad infrecuente de la piel, de carácter hereditario, denominada Epidermodisplasia Verruciformis (EV).

TABLA 5: Tipos de HPV identificados y sus manifestaciones clínicas

Tipo HPV /	Manifestación clínica
HPV 1a	Verruga común.
HPV 3a,b	Verruga plana, ev.
HPV 4	Verruga palmar y plantar variedad hiperqueratósica.
HPV 5a,b	Lesiones maculares de ev, carcinoma epidermoide(ev).
HPV 6a-f	Condiloma acuminado, CIN, VIN, papiloma laríngeo, tumor de Buschke-Lowenstein.
HPV 7	Verruga de los manipuladores de carne.
HPV 8	Lesiones maculares de ev, carcinoma epidermoide (ev)
HPV 9	Lesiones maculares de ev.
HPV 10a,b	Verruga plana.
HPV 11a,b	Condiloma acuminado, CIN, papiloma laríngeo y nasal invertido.
HPV 12	Lesiones maculares y planas de ev.
HPV 13a,b	Hiperplasia epitelial focal de la mucosa oral (Heck).
HPV 14a, b	Lesiones maculares de ev, carcinoma epidermoide (ev)
HPV 15	Lesiones maculares y planas de ev.
HPV 16	Condiloma acuminado, CIN, VIN, papulosis bowenoide, carcinoma de cérvix, pene y bronquio.
HPV 17	Lesiones maculares de ev, carcinoma epidermoide (ev)
HPV 18	Condiloma acuminado, CIN, VIN, papulosis bowenoide, carcinoma de cérvix y pene.
HPV 19	Lesiones maculares de ev, carcinoma epidermoide (ev)
HPV 21	Lesiones planas de ev.
HPV 22	Lesiones maculares de ev.
HPV 23	Lesiones maculares y planas de ev.
HPV 24	Lesiones maculares y planas de ev.
HPV 25	Lesiones maculares y planas de ev.
HPV 26	Verrugas plana en inmunodeprimidos.
HPV 27	Verrugas plana en inmunodeprimidos.
HPV 28	Verruga plana.
HPV 29	Verruga común.

HPV 30	Carcinoma de laringe, CIN 1 y 2.
HPV 31	CIN, carcinoma de cérvix.
HPV 32	Hiperplasia epitelial focal de la mucosa oral, papiloma oral.
HPV 33	Papulosis bowenoide, CIN, carcinoma de cérvix.
HPV 34	Enfermedad de Bowen, CIN.
HPV 35	CIN, carcinoma de cérvix.
HPV 36	Queratosis actínica, ev.
HPV 37	Queratoacantoma.
HPV 38	Melanoma maligno.
HPV 39	CIN 1 y 2, Carcinoma de cérvix, papulosis bowenoide.
HPV 40	CIN.
HPV 41	Verruga plana, carcinoma epidermoide.
HPV 42	Papulosis bowenoide, condilomas planos, CIN.
HPV 43	CIN.
HPV 44	CIN.
HPV 45	CIN, carcinoma de cérvix.
HPV 46	EV benigna.
HPV 47	Lesiones maculares y planas de ev.
HPV 48	Carcinoma epidermoide de la piel.
HPV 49	Verrugas cutáneas múltiples.
HPV 50	Lesiones maculares y planas de ev.
HPV 51	CIN 1, carcinoma de cérvix.
HPV 52	CIN, carcinoma de cérvix.
HPV 53	CIN.
HPV 54	Condiloma acuminado.
HPV 55	Papulosis bowenoide.
HPV 56	CIN, carcinoma de cérvix.
HPV 57	CIN.
HPV 58	CIN.
HPV 59	CIN.
HPV 60	Verruga común.

CIN: Neoplasia intraepitelial cervical; VIN: neoplasia intraepitelial vulvar, EV: epidermodisplasia verruciformis.

caracteriza por el desarrollo de múltiples verrugas y placas eritematosas en la piel de pacientes jóvenes, que presentan una deficiencia inmunitaria celular. En aproximadamente un tercio de estos pacientes, se desarrollan lesiones bowenoides múltiples o carcinomas invasivos en zonas de la piel expuestas al sol. De los 20 genotipos asociados a la EV, dos en particular, el HPV 5 y el 8, están presentes en el 90% de las lesiones malignas (Orth, 1987). Es significativo el hecho de que los receptores de transplantes renales tengan tendencia a desarrollar lesiones cutáneas similares a las de la EV, y también carcinomas en las zonas expuestas de la piel, en los que se detecta (60%) la presencia de DNA de HPV 5 y 8 (Barr y cols.,1989).

A pesar de que los resultados de los numerosos estudios practicados hasta la fecha confirman la asociación entre el virus del papiloma humano y la neoplasia cervical, todavía existen muchas cuestiones sin aclarar. Por ejemplo, es significativo el hecho de que no se demuestre la presencia del DNA del virus en un cierto porcentaje de los tumores de cérvix. Son varias las posibles explicaciones a este hecho. Estos tumores podrían contener un tipo de HPV aún no caracterizado, o un número bajo de copias del genoma viral, de modo que éste no fuera detectable, pero también habría que considerar la posibilidad de que no estuvieran relacionados con el virus. Esta última alternativa implicaría que no es imprescindible la participación del papilomavirus en el proceso de transformación maligna del epitelio cervical.

Por otra parte, es interesante la observación que el papilomavirus bovino tipo 4, que causa lesiones verrucosas en el ganado, no esté presente en las mismas una vez que han sufrido la transformación maligna. El hecho se explicaría si no fuera necesaria la continua presencia del virus para el mantenimiento del estado de

transformación de la célula infectada (Campo y cols., 1985).

A menudo se argumenta que la introducción de la tecnología del DNA recombinante ha permitido realizar un gran avance en el conocimiento de la biología molecular del papilomavirus, y de su relación con el cáncer de cérvix. Sin embargo, los estudios epidemiológicos que se han practicado en diferentes áreas geográficas, basados en técnicas de detección de DNA, han producido un amplio espectro de cifras de prevalencia del HPV, de difícil interpretación. La evidencia epidemiológica obtenida hasta la fecha es limitada, por varias razones. En primer lugar, porque las diferentes técnicas de hibridación de DNA desarrolladas hasta el presente difieren en sensibilidad y especificidad, y no se han contrastado rigurosamente entre sí. Por esta razón, los resultados de los diferentes estudios no son directamente comparables. Desde la reciente introducción de la técnica PCR de alta sensibilidad, por otra parte, se han planteado nuevas dudas acerca del papel etiológico del HPV, ya que se ha informado sobre cifras de prevalencia de los genotipos 16 y 18 (alto riesgo) en mujeres sin anomalías cervicales de hasta el 70 y 80% (Young y cols., 1989). Además, el número de mujeres sin aparente patología cervical incluidas en la mayor parte de las series ha sido pequeño (entre 10 y 40), lo que no permite obtener conclusiones estadísticas firmes. Finalmente, se dispone únicamente de la información sobre la asociación HPV/ cáncer de cérvix que se ha obtenido en poblaciones con una incidencia media o alta de cáncer de cérvix, y prácticamente no hay datos sobre poblaciones de bajo riesgo (Roman, 1989). Es de gran interés, por lo tanto, obtener información sobre la prevalencia del HPV en poblaciones de baja incidencia de cáncer de cérvix.

**HIPOTESIS, OBJETIVOS Y DISEÑO DE LA
INVESTIGACION**

2.1. PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS.

Si el papilomavirus fuera un agente causal independiente implicado en el proceso oncogénico de la mucosa cervical, la tasa de prevalencia de infección por HPV determinaría la incidencia de cáncer de cérvix de una población. Si no existiera una correlación directa entre las tasas de prevalencia de infección por el virus y de incidencia de cáncer de cérvix, entonces sería necesario considerar la intervención obligada de cofactores adicionales en el proceso oncogénico.

Para abordar esta cuestión, se estudiará la prevalencia de infección por genotipos específicos de papilomavirus, mediante técnicas de detección de DNA, en una muestra de mujeres normales y con neoplasia cervical de la población del País Vasco (PV), cuya tasa de incidencia de cáncer de cérvix se encuentra entre las más bajas del mundo (7,3 por 100.000 habitantes, ajustada a la población mundial). Dicha información permitirá o bien demostrar la implicación del papilomavirus como agente etiológico independiente del proceso neoplásico, o bien establecer la importancia crítica de la participación de cofactores adicionales.

2.2. OBJETIVOS.

1) Investigar la asociación específica entre determinados genotipos de papilomavirus y los tumores de cuello uterino, en una población con una baja incidencia de cáncer de cérvix.

Con esta finalidad, se determinará, mediante técnicas de hibridación molecular, la prevalencia de infección por los genotipos específicos de papilomavirus en las muestras de cérvix de un grupo de mujeres con CIN o carcinoma invasivo de cuello uterino,

2) Determinar la relación entre la incidencia de cáncer de cérvix de la población del País Vasco -entre las más bajas del mundo, con una tasa ajustada a la población mundial de 7,3 por 100.000 habitantes- y la prevalencia de infección por HPV. Esto permitirá apoyar más aún la implicación del HPV en la carcinogénesis de la mucosa cervical como factor causal independiente o, por el contrario, reforzará la importancia de la implicación de otros cofactores.

Con este propósito, se investigará, mediante técnicas de hibridación molecular, la prevalencia de infección, en relación con la edad, de genotipos específicos de papilomavirus, en las muestras de cérvix de un grupo de mujeres con una citología normal.

3) Valorar el riesgo relativo de progresión hacia una lesión premaligna asociado a la infección del epitelio cervical por determinados tipos de HPV. Si la asociación HPV/ cáncer de cérvix, demostrada en otros estudios, es de naturaleza “causal” y no “casual”, la infección del epitelio cervical por determinados genotipos deberá condicionar un mayor riesgo de progresión hacia CIN que la no infección o la infección por genotipos de “bajo riesgo”.

Para comprobar esta hipótesis, se efectuará un seguimiento por un periodo de dos o 3 años de un grupo de mujeres portadoras del DNA de los tipos de papilomavirus considerados de “riesgo”, y de un grupo de portadoras de los tipos de “bajo riesgo”, junto con un grupo control de mujeres con marcadores negativos. Además, se investigará la relación entre el contenido de DNA viral de las muestras y el riesgo de progresión hacia CIN.

4) Valorar el riesgo relativo de progresión de las lesiones CIN a lesiones más avanzadas asociado a la infección por los tipos específicos de HPV.

Con este objetivo, durante un periodo de 2 o 3 años, se efectuará un seguimiento de un grupo de pacientes con un diagnóstico citológico de CIN y marcadores positivos para los diferentes genotipos de HPV, y de un grupo de pacientes con CIN no asociado al virus.

5) Investigar la especificidad y sensibilidad de la técnica Slot-blot de hibridación, en su aplicación para la detección del HPV, con referencia a la técnica PCR de alta sensibilidad.

Para esto, un porcentaje de las muestras que resulten positivas y negativas con la técnica Slot-blot de hibridación molecular se analizarán con la técnica de PCR, y se contrastarán los resultados obtenidos con ambos test.

6) Investigar la sensibilidad y especificidad de los marcadores citopáticos específicos e inespecíficos de la infección por HPV. Es decir, valorar la eficacia del método citológico en la detección de la infección por HPV, tomando como evidencia de la infección la presencia del DNA viral demostrada por las técnicas de hibridación molecular.

Con este propósito, se realizará el estudio citológico de una serie de muestras de mujeres con marcadores moleculares de infección por HPV y de otra serie de muestras negativas, correspondientes a mujeres homologadas por su edad a las del grupo anterior, para determinar la frecuencia de los signos citomorfológicos “específicos” e “inespecíficos” de la infección por HPV.

2.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.

2.3.1. MUESTRA DE MUJERES DE LA POBLACION DE BAJO RIESGO DE CANCER DE CERVIX.

La investigación se practicará sobre una serie de mujeres asintomáticas de las consultas de diferentes Centros de Planificación Familiar, y sobre una segunda serie de mujeres con antecedentes de anomalías citológicas de cérvix, de la consulta de Ginecología de un hospital local.

2.3.2. TIPO DE MUESTRA DE LA MUCOSA DEL CUELLO UTERINO.

Se utilizarán muestras citológicas del epitelio cervical, porque presentan las siguientes ventajas, con respecto a las biopsias:

- (a) Se obtienen por un procedimiento incruento, a diferencia de las biopsias. Por razones éticas obvias, en un estudio a gran escala sobre población sana es necesario emplear un método no invasivo de obtención de muestras
- (b) Contienen células epiteliales que representan toda la superficie de la zona de transformación, donde se originan el 95% de los carcinomas de cérvix.
- (c) Se obtienen por barrido de toda la superficie cervical, por lo que tienen mayores probabilidades que una muestra biopsica de contener células representativas de un pequeño foco de infección.

(d) El resultado del estudio de DNA puede ser contrastado con el diagnóstico citológico del mismo material.

De todas las mujeres incluidas en el estudio, se obtendrá una muestra del cuello uterino: se practicará una extensión citológica para diagnóstico de rutina y el resto del material se empleará en los estudios de DNA.

2.3.3. ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE INFECCION POR HPV EN MUJERES ASINTOMATICAS Y CON NEOPLASIA DE CUELLO UTERINO. ELECCION DEL METODO DE DETECCION DEL DNA DEL HPV.

Las muestras de cérvix de las mujeres de las diferentes series de estudio se analizarán con la técnica Slot-blot de hibridación, para determinar la prevalencia del DNA de los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV. El contenido de DNA viral de las muestras infectadas se cuantificará por densitometría

Un subgrupo de las muestras, correspondientes a mujeres con y sin anomalías citológicas, se analizarán además con la técnica de alta sensibilidad PCR, ajustada para detectar DNA del HPV 16, con el propósito de verificar los resultados del Slot-blot.

adicionalmente, se investigará la frecuencia de la infección por los mismos genotipos en un grupo control de mujeres de una población de alto riesgo de cáncer de cérvix, para averiguar si la variación en la incidencia de cáncer entre ambos grupos se correlaciona con una variación en la frecuencia de la infección por el virus.

Aunque por su elevada sensibilidad y especificidad el Southern-blot es el test de hibridación de DNA considerado como el standard de referencia, no resulta, sin embargo, el más adecuado para estudios a gran escala sobre población normal. La técnica requiere una cantidad relativamente grande de muestra, suficiente para obtener 10 microgramos (μg) de DNA de las células infectadas. La masa del DNA que se extrae de una muestra citológica media varía entre 400 nanogramos (ng) y 20 μg , y está, por lo tanto, en el límite de aplicación del Southern-blot.

Para la detección del DNA viral mediante la técnica de Slot-blot de hibridación se requiere una cantidad mucho menor de muestra -suficiente para obtener 500 ng de DNA-, por lo que el test es aplicable al 100% de las muestras citológicas. Si bien la especificidad del Slot-blot es algo menor que la del Southern-blot, este inconveniente se puede resolver con un diseño adecuado de los controles positivos y negativos. El Slot-blot permite, además, la identificación precisa de los diferentes genotipos de HPV, y la cuantificación aproximada de la cantidad del DNA viral presente en cada muestra. Se trata, por otra parte, de una técnica algo menos compleja técnicamente que el Southern-blot y más económica, por todo lo cual la consideramos idónea para el presente estudio.

Aunque en la actualidad existen varios Kits comerciales de detección del HPV, ninguno de ellos ha sido rigurosamente testado en diferentes laboratorios, por lo que su utilidad general permanece sin confirmar. Por este motivo, decidimos utilizar, como sondas del HPV, las secuencias de DNA correspondientes al genoma completo de los diferentes genotipos de HPV, originalmente aisladas y clonadas por el Prof. H. zur Hausen, en el Instituto de Virología de Heidelberg.

2.3.4. ESTUDIO DEL RIESGO DE PROGRESION HACIA CIN O A CIN DE GRADO SUPERIOR ASOCIADO A LA INFECCION DEL EPITELIO CERVICAL POR LOS GENOTIPOS ESPECIFICOS DE HPV.

Se efectuará un seguimiento en el tiempo de las mujeres normales o con CIN1 portadoras del DNA de los genotipos “de riesgo” 16 y 18 de HPV, junto con el grupo de mujeres portadoras de los genotipos 6 y 11 de “bajo riesgo”, para evaluar la aparición de CIN o de CIN de mayor grado. Además se seguirá a un grupo control de mujeres con marcadores negativos de la infección, homologadas por su edad a las de los grupos anteriores .

2.3.5. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE DETECCION DE VARIOS MARCADORES CITOLOGICOS ESPECIFICOS E INESPECIFICOS DE INFECCION POR HPV.

Con el objetivo de investigar nuevos criterios de diagnóstico citológico de la infección por HPV, se evaluará la utilidad de un panel de siete signos “inespecíficos” de infección, además de los clásicos, en una serie de 100 extensiones citológicas de muestras en las que se detecte el DNA del virus con el test Slot-blot de hibridación. Como control, se seleccionarán otras 100 muestras citológicas de mujeres, homologadas por su edad con las del primer grupo.

MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. MUESTRA DE MUJERES DE LA POBLACION DEL PAIS VASCO.

La investigación se practicó sobre una serie de 1.245 mujeres que acudieron a la consulta de diferentes Centros de Planificación Familiar (CPF) de la provincia de Vizcaya, y a la Unidad de Colposcopia del Servicio de Ginecología de la Residencia Sanitaria Enrique Sotomayor de Baracaldo.

El grupo procedente de los CPF comprendió un total de 1.219 mujeres no seleccionadas, que acudieron a consulta, básicamente, por cuestiones de planificación familiar. El segundo grupo de estudio incluyó un total de 26 pacientes, que fueron derivadas a la unidad de colposcopia debido a que tenían algún informe citológico anormal previo. La tasa de incidencia de cáncer de cérvix de la población del País Vasco (PV), ajustada a la población mundial, es de 7,3 por 100.000 habitantes (Dirección de Información Sanitaria y Evaluación del Dpto. de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco).

Para la serie control se seleccionaron 51 mujeres con citología de cérvix normal de un CPF (Reino Unido, RU), donde existe una alta incidencia de cáncer de cérvix (tasa ajustada a la población mundial de 17 por 100.000 habitantes: Office of Population Censuses and Surveys).

3.2. METODOS DE OBTENCION Y DE ESTUDIO DE LAS MUESTRAS CLINICAS.

3.2.1. PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA, REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLINICAS.

Los ginecólogos de los centros recogieron las muestras citológicas de cérvix de las pacientes que acudieron a consulta, como parte del protocolo de exámen ginecológico. En cada caso se practicó un frotis de cérvix para diagnóstico citológico de rutina, que fue enviado a la Unidad de Citodiagnóstico del Departamento de Biología Celular y Ciencias Morfológicas de la UPV/EHU.

Las espátulas con las que se obtuvieron las muestras se guardaron en tubos universales de 50 ml con 10 ml de una solución estéril de tampón fosfato salino (PBS: 8 gr 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 el estudio con DNA recombinante. Las muestras fueron almacenadas en este estado a 4º C, durante 24-48 horas, sin deterioro visible, hasta el envío al laboratorio. Una vez en el laboratorio, los tubos con las muestras se agitaron con vortex, para descargar las células de las espátulas, que se desecharon a continuación. Se centrifugaron los contenedores a 1.500 G durante 2 min para obtener un pellet celular, y el sobrenadante se decantó. Las células se resuspendieron finalmente en Tris-EDTA (TE), y se guardaron a -20º C hasta su utilización en el estudio de DNA.

Al tiempo que tomaron las muestras, los ginecólogos recogieron los datos de filiación, edad, y la información relevante sobre la historia ginecológica y obstétrica de las paciente

3.2.2. ESTUDIO DE LAS EXTENSIONES CITOLOGICAS DE CERVIX.

Las extensiones citológicas se procesaron según la técnica de Papanicolaou y se examinaron con un microscopio óptico para identificar la presencia de células discarióticas (CIN 1, 2 y 3) y malignas (carcinoma invasivo) (Buckley y cols., 1982), y los signos citomorfológicos específicos de infección por papilomavirus. El diagnóstico citológico de la infección por HPV se efectuó en las muestras en las que se identificaron coilocitos y/o células disqueratósicas o células fusiformes, que representan una variante de las anteriores (Meisels y Fortin, 1976).

En el estudio de correlación entre marcadores citológicos y moleculares de infección por HPV, se valoraron los siguientes signos citológicos “inespecíficos” (Schneider y cols., 1987) (Figuras 11 a 16):

- 1) Células con “*citoplasma claro*”, que se distinguen del clásico coilocito porque el núcleo es de tamaño normal, y porque el límite entre la cavidad central y el citoplasma periférico está menos definido.
- 2) *Paraqueratosis* en células superficiales o intermedias. El núcleo de estas células, a diferencia de la clásicas células disqueratósicas, es de aspecto normal, o está ausente. Suelen aparecer en grupos.
- 3) *Gránulos citoplasmáticos*: condensaciones basófilas o eosinófilas de un tamaño aproximado de 1 μm , que corresponden a queratohialina o a productos proteicos específicos del HPV.
- 4) *Condensación de filamentos citoplasmáticos*: agregados focales de

tonofilamentos citoplasmáticos, que confieren a las células un aspecto “agrietado”.

5) *Hipercromasia nuclear*, que consiste en un aumento de la basofilia del núcleo, en ausencia de irregularidades en el patrón cromatínico o en la membrana nuclear, lo que diferencia este criterio de la atipia nuclear.

6) *Bi y multinucleación*.

7) Presencia de *anillos claros perinucleares*.

3.3. METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

3.3.1. SONDAS DE DNA RECOMBINANTE.

Los plásmidos de DNA de los tipos 6, 11, 16 y 18 de HPV fueron proporcionados por el Prof. H. zur Hausen del Instituto de Virología de Heidelberg. La sonda del HPV 6 corresponde a un fragmento subgenómico de 5,3 Kilobases (Kb), clonado en los sitios Bam HI y Eco RI del plásmido pBR 322. Las sondas de los tipos 11, 16 y 18 corresponden a los genomas completos, de 7,9 Kb, las dos primeras clonadas en el sitio Bam HI del plásmido pBR 322, y la tercera en el sitio Eco R1.

La sonda de gamma-actina, utilizada para control interno en las experiencias de hibridación, fue proporcionada por el Prof. Alan Malcom, del Hospital Charing Cross de Londres. La longitud del fragmento de DNA de la sonda es de 1,6 Kb, que se recibió clonado en vector Okayama (3 Kb).

3.3.2. AMPLIFICACION DE LAS SONDAS DE DNA DEL PAPILOMAVIRUS Y DE LA GAMMA-ACTINA.

3.3.2.1. Transformación de células competentes RR1 de *E. Coli* con el plásmido recombinante (DNA del genotipo de HPV o de actina, clonado en pBR 322 o vector de Okayama).

Básicamente, se procedió según el método descrito por Hanahan (1985). Se empleó la cepa RR1 de *E. coli* (Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc.). En un tubo de polipropileno de 1,5 ml, se mezclaron 50 ng del plásmido recombinante (DNA del genotipo de HPV clonado en pBR 322), resuspendido en tampón TE (Tris-ClH 10 mM a pH 8, EDTA 1 mM), con una alícuota de 40 µl de las células *E. coli* competentes. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Las células se sometieron a continuación a un shock térmico (42° C durante 45 seg.) en un baño de agua, para provocar la apertura de los poros de la membrana y facilitar la entrada de las moléculas del plásmido. Después de una segunda incubación en hielo durante 2 min., se añadieron 0,9 ml de medio L-broth (LB; 10 g/l Bacto-tryptona, 5 g extracto de levadura, cloruro sódico 85 mM, glucosa 5 mM a pH 7.2) al tubo eppendorf. Las células se mantuvieron en este medio durante 1 hora a 37° C, para permitir su recuperación y la expresión de la resistencia a la ampicilina adquirida por la incorporación del plásmido. A continuación, se procedió a la siembra de las células *E. coli* transformadas en placas de agar (tryptona 10 g, extracto de levadura 5 g, cloruro sódico 170 mM, agar 1.5%, a pH 7.2) con ampicilina a la concentración de 100 µg/ml. Las placas se cultivaron a 37° C durante una noche. Se seleccionaron colonias de crecimiento individuales, que se inocularon en 10 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37° C,

hasta que el medio de crecimiento alcanzó una D.O._{550 nm} de 0,5. Se prepararon alícuotas del medio de crecimiento en la fase de saturación, a las que se añadió glicerol estéril, hasta una concentración final del 15%, que se guardaron en un congelador a -70° C hasta su utilización.

3.3.2.2. Cultivo a gran escala de las células E. coli transformadas y purificación del DNA del plásmido recombinante.

Se procedió según el protocolo de Ish-Horowicz y Burke (1981), con modificaciones menores. Los cultivos líquidos de células *E. coli* se propagaron en LB, con ampicilina a una concentración de 50 µg/l. Se descongelaron las células transformadas almacenadas en glicerol, y se inocularon en 10 ml de LB. A continuación, se procedió a la incubación de las células en un baño con agitación a 37° C, hasta que el medio alcanzó una D.O._{550nm} de 0,5. De este cultivo inicial, se tomó 1 ml, que se inoculó a 500 ml de LB, y se procedió a una segunda incubación, a 37° C, con agitación, hasta que el medio alcanzó la saturación (fase de crecimiento logarítmica). A continuación, se efectuó una última incubación durante 12 horas, en las mismas condiciones, después de incorporar al medio cloranfenicol hasta una concentración final de 170 µg/ml, con el objeto de amplificar el número de copias del plásmido en las células transformadas.

Tras una centrifugación a 4.100 rpm durante 10 min., se retiró el sobrenadante, y se practicó un doble lavado del pellet celular con 100 ml de la solución STE (ClNa 0.1 M, Tris 10 mM a pH 7,8, EDTA 1 mM), a 4° C. Finalmente, se efectuó una centrifugación a 4.100 rpm durante 5 min., se decantó el sobrenadante, y el pellet celular se congeló a -70° C.

Se procedió, a continuación, a la digestión de las células transformadas para extraer el DNA del plásmido, según el método de lisis alcalina. Las bacterias, una vez descongeladas, se incubaron, durante 5 min. a temperatura ambiente, en 10 ml (cantidad ajustada para un cultivo en 500 ml de medio) de una solución de glucosa 1 M, Tris-Cl 2 M, EDTA 0,5 M, y lisozima hasta una concentración final de 5 mg/ml. La lisis celular iniciada en esta solución se completó mediante la adición de 15 ml de una solución de SDS al 20% y NaOH 10 N, y la incubación en hielo durante 10 min. Durante este tiempo, se sometió a agitación a la suspensión. Se efectuó una última incubación, en las mismas condiciones que la anterior, después de añadir 10 ml de solución de acetato potásico 3 M a pH 4,8, con el objeto de precipitar el DNA de alto peso molecular y las proteínas. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min., y se recogió el sobrenadante, que fue filtrado a través de una gasa para eliminar los últimos desechos celulares. Tras una nueva precipitación del DNA en isopropanol (0,6 volúmenes), se efectuó una centrifugación a 7.000 rpm durante 15 min. Después de decantar el sobrenadante, el DNA se resuspendió en 15 ml de TE, 15 g de cloruro de cesio y 0.9 ml de bromuro de etidio (concentración 10 mg/ml). y la mezcla se introdujo en tubos de polietileno, que fueron centrifugados en una ultracentrífuga Beckman (rotor vTi 80), a 48.000 rpm, y 17° C de temperatura, durante 36 horas. Se formaron dos bandas (DNA unido al bromuro de etidio) claramente visibles con luz ultravioleta. Se recogió la inferior, correspondiente al DNA del plásmido, introduciendo una aguja hipodérmica en el interior del tubo. Después de una precipitación en etanol frío con acetato de sodio, se resuspendió el DNA recuperado en 25 µl de TE, y se calculó el radio $D.O._{260} / D.O._{280}$ en una alícuota para determinar su grado de pureza. Cuando se demostró contaminación con proteínas, se procedió a efectuar una extracción en fenol/ cloroformo, seguida de una precipitación en etanol frío durante 12 horas, y resuspensión en TE. Finalmente, se procedió a la precipitación en etanol frío de la muestra, y a la resuspensión en 25 µl de TE.

3.3.2.3. Aislamiento del segmento de DNA de la sonda insertado en el vector. Digestión con enzimas de restricción de los plásmidos recombinantes y electroforesis en gel de agarosa.

Los plásmidos recombinantes (sondas de HPV y actina clonadas en pBR 322 y Okayama) se sometieron a digestión con las endonucleasas de restricción adecuadas. Los sitios de clonación de las diferentes sondas se describen en sección 3.3.1. A la suspensión de DNA del plásmido, se añadió la cantidad adecuada de la enzima de restricción correspondiente, a razón de dos unidades de enzima por cada μg de DNA, el buffer de reacción especificado por el fabricante, y agua desionizada hasta el volumen final deseado. La mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C . Finalizado este tiempo, se retiró una pequeña

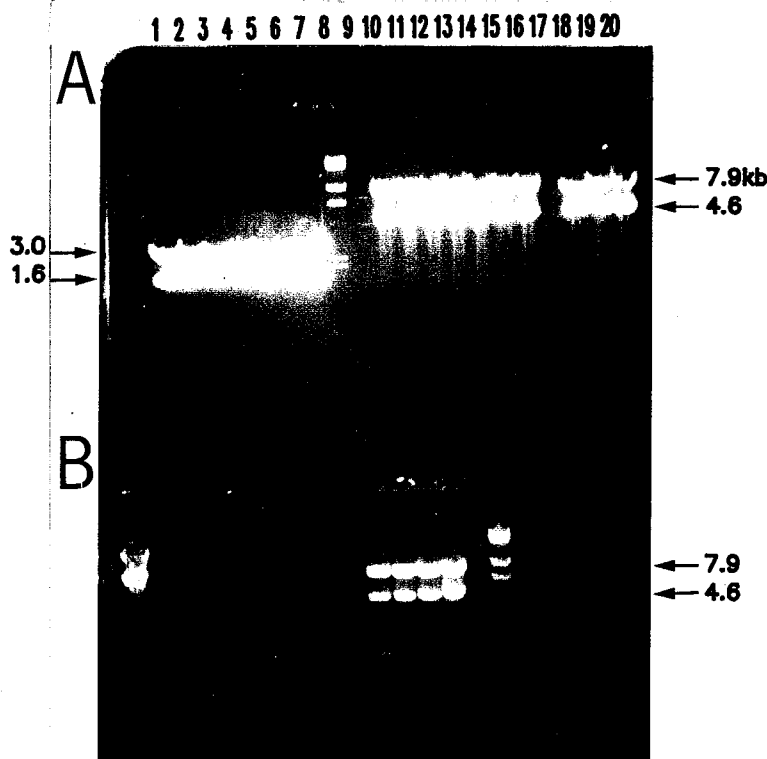


FIGURA 4 .Separación de la sonda del plásmido recombinante mediante digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

A/ Calles 1-7: la banda inferior corresponde al segmento de DNA de actina de 1.6 Kb y la banda superior al vector Okayama de 3.0 Kb.

Calle 8: marcador de PM.

Calles 10-16: DNA de HPV 11 de 7.9 Kb y vector pBR 322 de 4.6 Kb.

Calles 18-20: DNA de HPV 16 de 7.9 Kb y pBR 322 de 4.6 Kb.

B/ Calle 1: DNA de HPV 16 de 7.9 Kb y pBR 322 de 4.6 Kb.

Calles 11-14: DNA de HPV 18 de 7.9 Kb y pBR 322 de 4.6 Kb.

Calle 16: marcador de PM

alícuota (1 µg) del producto de la reacción, que se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa, para comprobar que la digestión se había completado. Se frenó la reacción añadiendo a la mezcla 0,1 volúmenes de una solución de "freno" (Ficoll al 20%, SDS al 1%, EDTA 10 mM y azul de bromofenol al 0,1%).

A continuación, se procedió a separar el segmento de DNA del HPV del vector, mediante electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se preparó un gel al 1% disolviendo la cantidad correspondiente de agarosa en buffer "E" (Tris-ClH 40 mM, acetato de sodio 20 mM, y EDTA 2 mM, pH 7,6). Se cargó el gel con los productos de la digestión enzimática de los plásmidos, y se efectuó la electroforesis a 40 voltios, durante 4 horas, en una cámara fría. Transcurrido este tiempo, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/ml en buffer E), y las bandas de DNA se visualizaron bajo exposición a la luz ultravioleta en un transiluminador (Figura 4). Las bandas que contenían los fragmentos deseados se recortaron con una cuchilla. Los recortes del gel se fundieron a 37° C, y se almacenaron en alícuotas a -20° C hasta su utilización en las experiencias de hibridación.

3.3.3. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCION DEL DNA DE LAS SONDAS DE HPV 6, 11, 16 Y 18.

Se determinaron los patrones de restricción de las sondas de DNA recombinante de los tipos 6, 11, 16 y 18 de HPV, para comprobar que las secuencias amplificadas se correspondían con las previstas. Las digestiones enzimáticas se practicaron según protocolo descrito en sección 3.3.2.3, y los patrones de restricción obtenidos para las diferentes sondas se compararon con los mapas de restricción publicados de las mismas.

La sonda del HPV 6 corresponde a un fragmento subgenómico de 5.300 pares de bases, clonado en los puntos Bam HI/ EcoRI del vector pBR 322. Una vez separada del vector, se procedió a la digestión con HaeIII. Los segmentos de restricción obtenidos correspondieron a los valores esperados (de Villiers y cols., 1981): la primera banda fue de un peso molecular de aproximadamente 2.400 pares de bases (bp), y la segunda y tercera, de aproximadamente 800 y 700 bp, respectivamente (Figura 5).

La sonda de HPV 11 corresponde al genoma completo del virus, clonado en el punto Bam HI del vector pBR 322. Una vez aislada del vector, se procedió a la digestión con HaeIII y Pst I. Las bandas obtenidas fueron: la primera compuesta por un fragmento de 1.400 bp, y la segunda por un fragmento de 900 bp, ambas correspondientes a los valores previstos (Gissmann y cols., 1982a).

Las sondas de HPV 16 y 18 corresponden a los genomas completos del virus, clonados en los puntos Bam HI y Eco RI, respectivamente, del plásmido pBR

322. Una vez separadas del vector, ambas sondas fueron sometidas a digestión con Pst I y Ava II. El tamaño de las bandas obtenidas para HPV 16 correspondieron a los valores previstos: la primera fue de aproximadamente 1.700 bp, y la segunda de 900 bp, compuesta por un doblete (Seedhorf y cols., 1985). Para HPV 18 se obtuvo, además de los dos dobletes previstos de 1.200 y 800 bp, una banda adicional de aproximadamente 1.700 bp, resultante de una digestión parcial (Cole y cols., 1987) (Figura 5).

En conclusión, el análisis de los patrones de restricción de las diferentes sondas amplificadas confirmó la autenticidad de las mismas, por lo que procedió a su utilización en las experiencias de hibridación del presente estudio.

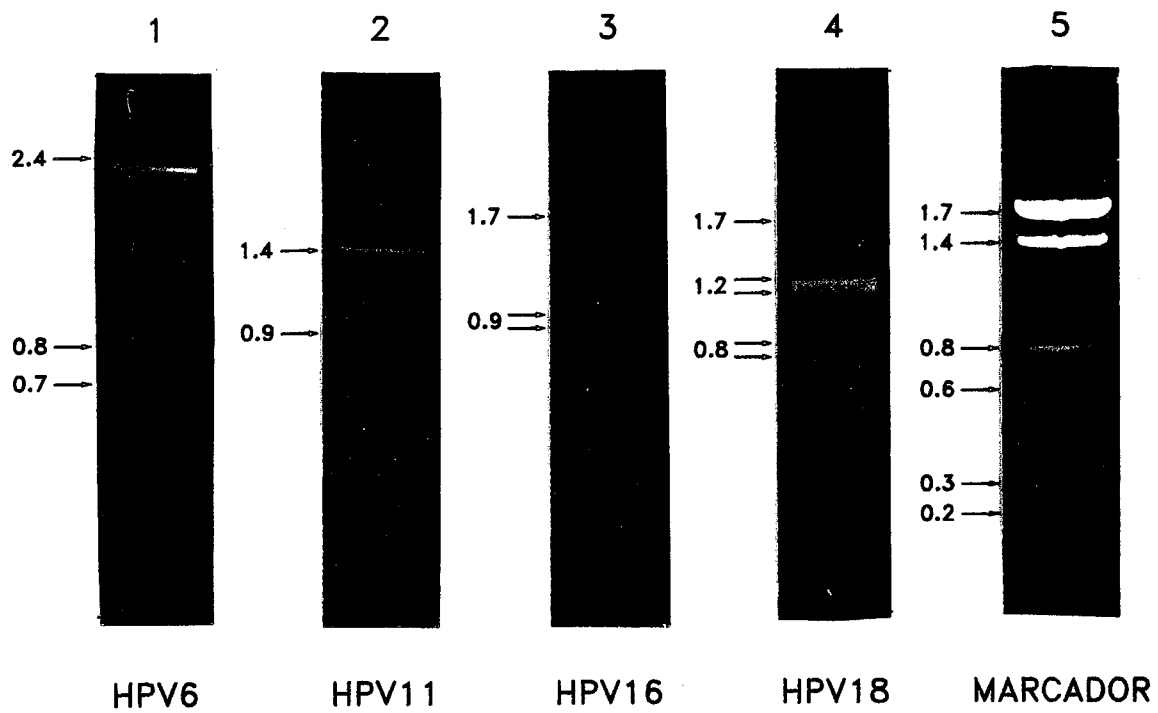


FIGURA 5: Patrones electroforéticos de los fragmentos de restricción de las sondas de DNA de los tipos 6, 11, 16 y 18 de papilomavirus:

Calle 1: DNA del HPV 6 digerido con Hae III. *Calle 2:* HPV 11 digerido con HaeIII y Pst I. *Calle 3:* HPV 16 digerido con Pst I y Ava II. *Calle 4:* HPV 18 digerido con Pst I y Ava II. *Calle 5:* el marcador de peso molecular. Se indican los pesos moleculares en Kilobases.

3.3.4. DETECCION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE ACIDOS DESOXIRRIBONUCLEICOS DE PAPILOMAVIRUS EN CELULAS CERVICALES EXFOLIADAS, MEDIANTE LA TECNICA DE HIBRIDACION "SLOT-BLOT".

3.3.4.1. Purificación del DNA de las muestras citológicas.

Se descongelaron las muestras y se procedió a la digestión de las células en 500 ml de una solución Tris 50 mM a pH 7,5, ClNa 50 mM, EDTA 10 mM, y SDS al 0,2%, a la que se añadió proteinasa K hasta una concentración final de 0,1 mg/ml. La reacción de digestión se llevó a cabo a una temperatura de 37° C, durante 12 horas.

Los contaminantes proteicos se eliminaron mediante extracción con fenol/ cloroformo. Finalizada la reacción de digestión, se añadió a la solución de DNA un volumen equivalente de fenol saturado con TE (Tris-ClH 10 mM a pH 8, EDTA 1 mM). El tubo se agitó con un vortex, para dispersar el fenol, y las dos fases líquidas se separaron de nuevo mediante una centrifugación a 11.000 rpm durante 1 min., en una centrífuga eppendorf. Se recogió la fase acuosa (superior), de la que se eliminó cualquier posible resto de fenol mediante una doble extracción con un volumen equivalente de cloroformo/ isoamilalcohol (24:1), siguiendo un procedimiento idéntico al descrito para la extracción con fenol. A continuación, se añadieron a la fase acuosa recuperada dos volúmenes de etanol frío (-20° C) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 4,5), y se dejó reposar la mezcla durante 12 horas, para conseguir la precipitación del DNA. Se efectuó a continuación una centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min., en una centrífuga eppendorf. El sobrenadante se eliminó por aspiración y

el pellet de DNA se resuspendió en etanol al 70%. Tras una última precipitación por centrifugación en las mismas condiciones que la anterior, el pellet de DNA se resuspendió en 550 µl de TE.

3.3.4.2. Purificación del DNA humano para su utilización como control interno.

El DNA genómico humano que se utilizó como control interno en las experiencias de hibridación se obtuvo a partir de células de la sangre periférica de un donante voluntario. La extracción de DNA se efectuó según el método de Kunkel y cols. (1977). La muestra de sangre fue diluida en EDTA 5 mM. Por cada 10 ml de sangre se añadieron 90 ml de buffer de lisis (sucrosa 0,32 M, Tris-ClH 10 mM pH 7,5, Cl₂Mg 5 mM y Tritón X-100) a 4° C. Los núcleos se recogieron mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. a 4° C. El pellet se resuspendió en 4,5 ml de una solución ClNa 75 mM, EDTA 24 mM pH 8, a la que se añadió SDS y proteinasa K hasta una concentración final de 0,5% y 0,2 mg/ml respectivamente. La digestión de los núcleos se efectuó a 55° C durante 2 horas. Seguidamente, se hizo una extracción en fenol y cloroformo y una precipitación en etanol frío. Después de un lavado en etanol al 70%, el DNA precipitado se resuspendió en TE.

3.3.4.3. Slot-blot: Inmovilización del DNA purificado de las muestras en una membrana de nitrocelulosa.

El DNA purificado de las muestras fue desnaturalizado en 0,1 volúmenes de NaOH 3 M, hasta una concentración final de 0,3 -0,4 M, a la temperatura de 60° C, durante 1 hora. Las muestras se neutralizaron con un volumen equivalente de acetato de amonio 2 M a pH 7, y se separaron en 5 partes iguales. Cada alícuota fue filtrada a continuación en una membrana de nitrocelulosa, previamente humedecida con acetato de amonio 1 M, utilizando un aparato de succión al vacío (72 wells Slot-blotter suction manifold de Schleicher and Schuell Ltd.). Se prepararon, por lo tanto, un total de 5 filtros, cada uno calibrado para cada tipo de sonda (de HPV 6, 11, 16, 18 y de actina). Cada filtro incluyó una serie de *controles de sensibilidad y especificidad* de la reacción de hibridación (figura 6). Se transfirieron una serie de cantidades decrecientes de DNA del genotipo de HPV correspondiente a la sonda -desde 200 hasta 12,5 picogramos (pg)-, que proporcionaron referencias para obtener una estimación del número de copias del genoma viral presente en las muestras positivas. Para calibrar el contenido de DNA celular de las muestras, se transfirieron al filtro preparado para la sonda de actina una serie similar de cantidades de DNA humano. Cada filtro incluyó, además, una muestra de DNA de cada genotipo de HPV, para controlar la especificidad de las reacciones de hibridación con las diferentes sondas.

Efectuada la transferencia del DNA, los filtros se sometieron a una temperatura de 80° C durante 1 ó 2 horas, para fijar el DNA de forma permanente.

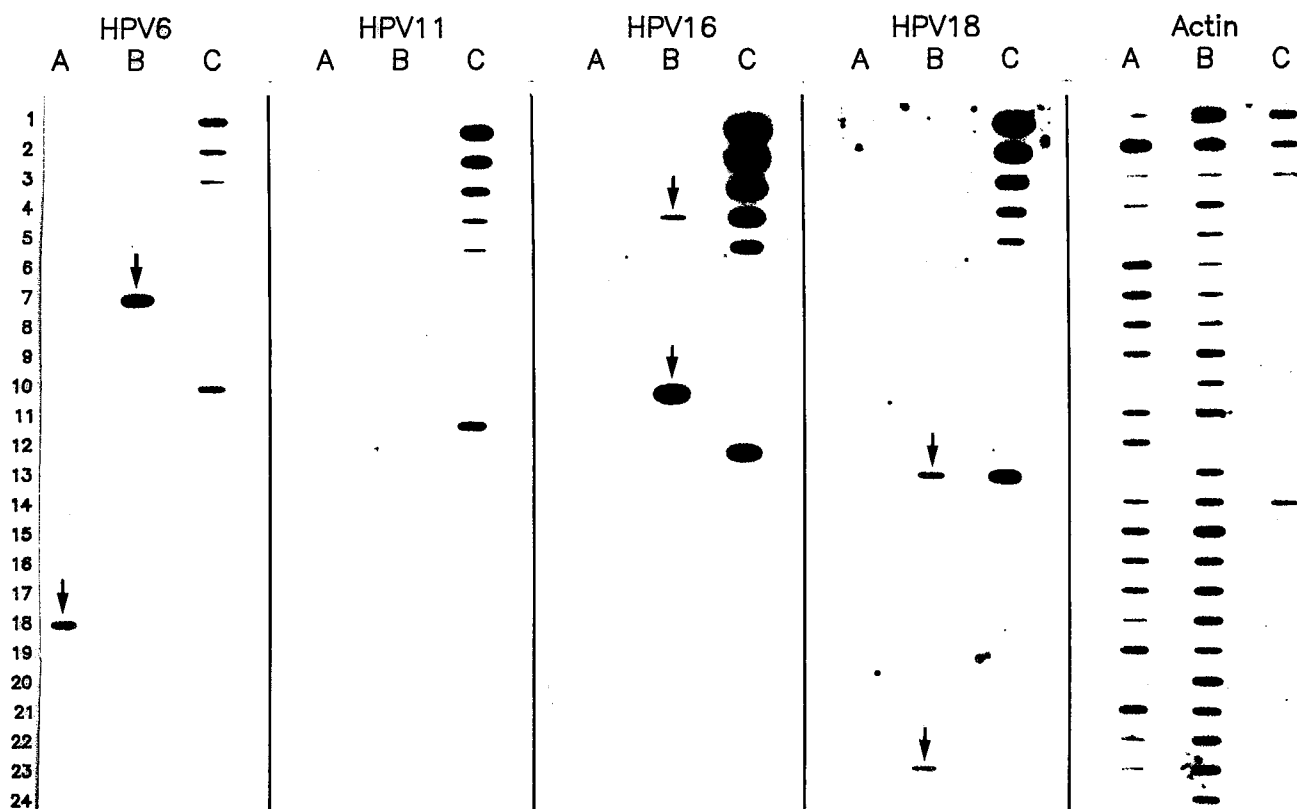


FIGURA 6: Detección del DNA del papilomavirus en muestras citológicas de cérvix mediante la técnica de hibridación slot-blot.

Se preparan 5 filtros para cada serie de muestras: 4 calibrados para cada genotipo del virus, y uno para el DNA humano. Los DNAs purificados de las diferentes muestras de estudio se transfieren al filtro de nitrocelulosa en las columnas A y B; las muestras en las que se detecta DNA del HPV son señaladas con flechas. Cada filtro incluye controles de dos tipos:

(i) *controles del número de copias (C1 a C5)*: se transfieren al filtro una serie de cantidades conocidas del DNA del genotipo de HPV (de 200 a 12,5 picogramos), para obtener una estimación del número de copias del genoma viral presente en las muestras positivas. Una serie similar de diferentes cantidades de DNA humano son transferidas al filtro calibrado para la sonda de actina.

(ii) *controles de hibridación cruzada (C10 a C14)*: para confirmar la especificidad de las diferentes sondas, se incluye en cada filtro una cantidad de DNA de cada tipo específico de HPV, y de DNA humano.

3.3.4.4. Hibridación del DNA de las muestras con sondas radioactivas.

Con el objeto de bloquear los puntos de potencial afinidad inespecífica de las muestras por el DNA de las sondas, los filtros fueron prehibridados durante 12 horas, a 42° C, en la siguiente solución: SDS al 0,05%, tris-ClH 0,08 M a pH 7,5, EDTA 0,004 M, ClNa 0,75 M y solución de Denharts (5x) que contenía DNA de esperma de salmón desnaturalizado (0,1 mg/ml).

La reacción de hibridación se efectuó en la misma solución (10 ml), a 42° C de temperatura, durante 12 horas. Se utilizaron 20 ng de las sondas de DNA (tipos 6, 11, 16 y 18 de HPV y actina), marcadas con p³² por el método de extensión de primeros oligoméricos (3.3.4.5.), hasta una actividad específica de al menos 10⁹ dpm/ µg. Los filtros se lavaron después de la hibridación en las siguientes soluciones: 2x SSC/0,1% SDS, 1xSSC/ 0,1% SDS, y finalmente 0,1x SSC/0,1% SDS. Los tres lavados se realizaron en un baño con agitación, a 65° C, y durante 1 hora.

3.3.4.5 Marcaje de las sondas con p³², segun el método de extensión de cebadores oligoméricos ("random oligomeric primer extension").

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas se marcaron segun el procedimiento descrito por Feinberg y Vogelstein (1984). El marcaje se efectuó a 15° C durante 12 horas, en un volumen total de 50 µl: 40 ng del DNA de la sonda disuelta en 34 µl de TE, y previamente desnaturalizada en un baño de agua a 95-100° C, se incubaron con 4 unidades del fragmento Klenow (1 µl),

y 50 μCi de (α p^{32}) dCTP (5 μl), en una solución acuosa tamponada (10 μl) que contenía HEPES 200 mM, Tris-ClH 50 mM, cloruro de magnesio 5 mM, mercaptoetanol 10 mM, dATP, dGTP y dTTP 20 mM, 5 unidades de D.O. de hexadesoxirribonucleótidos y 400 μg /ml de seroalbúmina bovina. Una vez terminada la reacción de polimerización, el DNA marcado fue separado de los nucleótidos no incorporados mediante filtración en una columna de sephadex G-50.

La actividad específica de las sondas se determinó en un contador de centelleo. Los valores obtenidos se expresaron en unidades de desintegración por min. y mg de DNA.

3.3.4.6. Autorradiografía.

Se utilizó la película X-OMAT AR de Kodak para la detección por autorradiografía de las señales radioactivas de los filtros. La exposición se efectuó por contacto directo del filtro con la película sensible, en una cassette de autorradiografía con pantallas intensificadoras, a la temperatura de -70°C , durante 72 horas.

3.3.5. DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE ACIDOS DESOXIRRIBONUCLEICOS DE PAPILOMAVIRUS EN CELULAS CERVICALES EXFOLIADAS, MEDIANTE LA TECNICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA DNA-POLIMERASA (PCR).

Se procedió según el protocolo de Saiki y cols. (1985). Las condiciones de la reacción fueron ajustadas para detectar una secuencia subgenómica del genotipo 16 de HPV.

Se utilizaron cebadores o primeros de síntesis (Bio-synthesis Inc.) complementarios a cadenas opuestas de DNA, específicos para detectar un segmento de 250 pares de bases comprendido entre la región NCR (región no codificante) y el ORF E6 del genoma del virus (comunicación personal del Prof Pfister, Instituto de Virología de Nuremberg):

Tabla 6. Secuencias de los cebadores de oligonucleótidos para amplificación de HPV 16.

<i>cebador</i>	<i>Secuencia 5' a 3'</i>	<i>Localización genómica</i>
A:	TCA CCC TAG TTC ATA CAT GAA CTG TG	7778-7803.
B:	TCC TGT GGG TCC TGA AAC ATT GCA G	123-98.

Se tomaron alícuotas del DNA aislado de las muestras (sección 3.3.4.1.), que se sometieron a 35 ciclos de amplificación en un Ciclador Térmico de DNA (“DNA Thermal Cycler”, Cetus Corp., Emeryville, CA).

Se utilizó para la reacción el Kit de amplificación “Gene Amp” de Perkin Elmer Cetus, CA. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: para un volumen final de 100 μ l, se utilizaron 2 unidades de *Taq-polimerasa*, DNA de la muestra a una concentración de 10 pg a 1 μ g, cada cebador a una concentración de 0,5 μ M, cada desoxirribonucleótido a una concentración 200 μ M (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), Cl₂Mg 1,5 mM, Tris-ClH 10 mM a pH 8,3; Cl₂Mg 1,5 mM y gelatina al 0.01%.

Las condiciones térmicas de cada ciclo fueron las siguientes: a) fase de desnaturalización, a 94° C durante 60 seg. b) fase de apareamiento, a 55° C durante 30 seg. y, c) fase de extensión de los primeros, a 72° C durante 30 seg. Al mismo tiempo que las muestras, se procesaron los controles positivos y negativos de la reacción : DNA humano de una muestra negativa, DNA humano de una muestra positiva para HPV 16, DNA de los diferentes genotipos de HPV, y alícuotas de cada uno de los componentes de la reacción.

Después del último ciclo, las muestras se incubaron a 4° C durante 5-10 min. Finalizada la reacción, se analizaron alícuotas de cada mezcla de reacción mediante electroforesis en un gel de agarosa, para comprobar que el tamaño de los productos amplificados era el previsto, de acuerdo con el diseño de los cebadores.

3.3.6. ANALISIS CUANTITATIVO DEL CONTENIDO DE DNA VIRAL Y HUMANO DE LAS MUESTRAS MEDIANTE DENSITOMETRIA. ESTIMACION DEL NUMERO MEDIO DE COPIAS DEL GENOMA DEL HPV POR CELULA.

Para la cuantificación de las señales positivas de las autorradiografías se ha utilizado un Video Densitómetro (modelo 620 de Cultek S. L.), acoplado a un ordenador, con un programa de integración que determina las áreas de los picos que se obtienen tras la lectura de las bandas. El área de cada pico está en relación con la intensidad de la señal, y por lo tanto, con la masa absoluta de DNA viral y humano presente en cada muestra.

Los valores obtenidos de las muestras han sido relacionados con los valores de la serie de cantidades standard incluídas en cada filtro (sección 3.3.4.3.). De este modo se obtiene una estimación precisa de la cantidad relativa de DNA viral y humano que contiene cada muestra. Para determinar la media del número de copias del genoma viral por célula que contiene cada muestra, se aplica la fórmula siguiente:

$$\text{Número de copias} = \frac{V/VM}{H/HM}$$

Donde:

V= masa del DNA viral en pg en cada muestra,

VM= masa del genoma viral (HPV 16 y 18= 0,0000087 pg),

H= masa de DNA humano en ng en cada muestra,

HM= masa de DNA celular (0,009 ng).

3.4. ANALISIS ESTADISTICO

3.4.1. PRUEBA χ^2 DE INDEPENDENCIA.

Hipótesis Nula (H_0): X e Y son variables Independientes.

Hipótesis Alternativa (H_a): X e Y están relacionadas (son dependientes).

Estadístico:

$$\sum_{i=1}^F \sum_{j=1}^C \frac{\left[n_{ij} - \left(\frac{n_{i0} n_{0j}}{n} \right) \right]^2}{\left(\frac{n_{i0} n_{0j}}{n} \right)}$$

Distribución del estadístico: (si H_0 es cierta):

$$\chi^2(K), \text{ con } K=(F-1).(C-1)= \text{“Grados de libertad”}.$$

Región de rechazo: ($\chi^2_{\alpha, \infty}$), siendo α el nivel de significación de la prueba.

Ejemplo: X= Infección por HPV $X_1=SI$ $X_2=NO$: F=2

Y= Edad

Y_1, Y_2, Y_3 son los tres intervalos de edad (16-20), (21-30),

y (31+): C=3

X_1, X_2, \dots, X_f valores de X.; Y_1, Y_2, \dots, Y_c valores de Y.

n, tamaño de la muestra; n_{ij} , frecuencia absoluta de (X_i, Y_j);

n_{i0} , frecuencia absoluta marginal de X_i ; n_{0j} , frecuencia absoluta marginal de Y_j .

3.4.2. PRUEBA χ^2 DE HOMOGENEIDAD.

Hipótesis nula: Y se distribuye igual en F poblaciones.

Hipótesis alternativa: La distribución de Y es diferente según la población.

Ejemplo: comparación de la prevalencia de la infección por HPV entre dos poblaciones: PV y GB

Y= Infección por HPV 6 $Y_1=SI$ $Y_2=NO$

3.4.3. PRUEBA χ^2 DE IGUALDAD DE PROPORCIONES EN MUESTRA DE PAREJAS.

Hipótesis nula: Las proporciones de 2 atributos (A_t) que se observan conjuntamente son iguales.

Estadístico:
$$\frac{(n_{12}-n_{21})^2}{n_{12}+n_{21}}$$

Distribución del estadístico.: χ^2 con 1 grado de libertad.

Región de rechazo: (χ^2_a, ∞) .

Ejemplo: A_{t1} = HPV 6 y A_{t2} =HPV 11.

n_{11} , frecuencia absoluta de presencia de ambos atributos; n_{12} , frecuencia absoluta de presencia de primer atributo y no del segundo; n_{21} , frecuencia absoluta de presencia de segundo atributo y no del primero; n_{22} , frecuencia absoluta de ausencia de ambos atributos.

3.4.4. ESTIMACIONES DE PROPORCIONES POBLACIONALES. INTERVALOS DE CONFIANZA.

1) Muestra única. Estimación de la proporción poblacional de un atributo (A_t) con una muestra única.

(i) Estimación por punto: $\hat{p} = \frac{n(A_t)}{n}$, proporción muestral.

(ii) Estimación por Intervalo de Confianza del 95%:

a) n grande: aproximación a la normal.

$$p \in \left(\hat{p} \pm 1,96 \sqrt{\frac{\hat{p} \hat{q}}{n-1} \left(\frac{N-n}{N} \right)} \right)$$

b) n pequeña: distribución binomial.

$p \in (p_1, p_2)$ con confianza del 95%.

$\Pr (X \leq n(A_t)) = 0,025$ con $X \in b(p_2, n)$.

$\Pr (n(A_t) \leq X) = 0,025$ con $X \in b(p_1, n)$.

Ejemplo: At= Infección por HPV.

p= proporción de dicho atributo en las mujeres del intervalo de edad 16-20.

n, tamaño de la muestra.

n(At), número de individuos de la muestra que presentan el atributo.

N, tamaño de la población muestreada sin reemplazamiento.

p, proporción poblacional del atributo.

q= 1-p; Pr=probabilidad; b= binomial.

2) Muestreo Estratificado. Estimación de la proporción poblacional media de un atributo con varias muestras (cada una de una subpoblación). La población consta de estratos (subpoblaciones) con diferentes proporciones del atributo At: p_1, p_2, \dots, p_k . Cada una de estas p_i se estima por punto y por intervalo, con muestras grandes, como en el apartado anterior.

La proporción total de At en la población es:

$$p = \sum_{i=1}^k \left(\frac{N_i p_i}{N} \right), \text{ media ponderada de las } \\ \text{proporciones de los estratos.}$$

$$\hat{p} = \sum_{i=1}^k \left(\frac{N_i \hat{p}_i}{N} \right), \text{ por punto.}$$

$$N = \sum_{i=1}^k N_i \quad p \in \hat{p} \pm 1,96 \sqrt{\sum_{i=1}^k \left(\frac{N_i^2}{N} \right) \left(\frac{\hat{p}_i \hat{q}_i}{n_i - 1} \right) \left(\frac{N_i - n_i}{N_i} \right)}$$

Intervalo de confianza del 95%.

Ejemplo: At.= Infección por HPV.

Población= mujeres del País Vasco con edad 16+.

Estratos= intervalos de edad en que se particiona la población: (16-20), (21-30) y (31+).

n_i , tamaño de la muestra i-ésima; N_i , tamaño del estrato i-ésimo.

3.4.5. FORMULA DE BAYES. CALCULO DE PROBABILIDADES CONDICIONADAS.

Conocida la probabilidad de que ocurra un determinado suceso si ha ocurrido otro, se calcula la probabilidad de que ocurra el último si ha ocurrido el primero:

$$\Pr(A_i/S) = \frac{\Pr(S/A_i)\Pr(A_i)}{\Pr(S)}$$

siendo $\Pr(S) = \Pr(S/A_1) \Pr(A_1) + \Pr(S/A_2) \Pr(A_2)$

Ejemplo: Suceso A_1 = Cáncer de cérvix en la población.

Suceso A_2 = No cáncer de cérvix en la población.

Suceso S= Infección por HPV 16 en la población.

$\Pr(A_i/S)$, probabilidad (Pr) de un determinado suceso (A_i) condicionado por otro suceso (S). $\Pr(S/A_i)$, probabilidad del suceso S condicionado por A_i .

3.4.6. U DE MANN-WHITNEY.

Hipótesis nula: Y se distribuye igual en dos poblaciones.

Hipótesis alternativa: La variable Y tiene diferentes “medidas de tendencia central” en las dos poblaciones.

Estadístico:

$$U = \text{Mín}\{U_1, U_2\}$$

Considerando ambas muestras como única, se ordenan los valores de Y, y se les asigna un número de orden (r).

$$U_1 = (\text{Máximo valor posible de } R_1) - R_1$$

siendo $R_1 = \sum_{i=1}^{n_1} r_{i1}$,

r_{i1} = nº de orden que ocupa el valor i-ésimo de la muestra 1, y

n_1 = tamaño de la muestra 1.

U_2 y R_2 corresponden a la muestra 2.

Región de rechazo: $(-\infty, U_{1-\alpha})$

Ejemplo: $Y = n^\circ$ de copias de HPV 16 por célula epitelial.

Muestra 1, mujeres infectadas con cáncer de cérvix.

Muestra 2, mujeres infectadas sin cáncer de cérvix.

3.5.7. ANALISIS DISCRIMINANTE.

Para establecer las combinaciones más valiosas de una serie de variables que permitan identificar si una muestra corresponde a una población determinada. Para ello se construye una regla de decisión, a partir de una serie de observaciones muestrales efectuadas en las diferentes poblaciones.

Regla: $\frac{f_1(x_1, \dots, x_K)}{f_2(x_1, \dots, x_K)} > \frac{p_2 c(1/2)}{p_1 c(2/1)}$, se asigna a P_1 .

Y en caso contrario, se asigna a P_2 .

P_1 y P_2 son las dos poblaciones; p_1 y p_2 son sus respectivas proporciones ($p_1 + p_2 = 1$).

x_1, \dots, x_K , son las variables que se miden en cada observación.

$f_1(x_1, \dots, x_K)$ es la probabilidad de la observación, si es de P_1 , $f_2(x_1, \dots, x_K)$ si es de P_2 .

$c(2/1)$ es el coste de clasificar una observación de P_1 en P_2 , y $c(1/2)$ el coste del error contrario.

Regla: Si $\sum_{i=1}^{i=k} (a_i \times x_i) > D$ se asigna a P_1 , y en caso contrario a P_2 .

Los coeficientes a_1, \dots, a_k de la función discriminante, así como su nivel de significación, se obtienen con programas de ordenador. D es función de $p_1, p_2, c(1/2)$ y $c(2/1)$.

Ejemplo: P_1 : HPV positivos, P_2 : HPV negativos.

x_1, x_2, \dots, x_7 : signos citológicos no clásicos.

$x_i = 1$ si presente, $x_i = 0$ si ausente.

El valor de D se fija de acuerdo con la especificidad y la sensibilidad deseadas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LAS EXTENSIONES CITOLÓGICAS CERVICALES DE LAS MUJERES DE LOS CENTROS DE PLANIFICACION FAMILIAR Y DE LA CLINICA COLPOSCOPICA.

De las 1.245 mujeres incluidas en el presente estudio, 67 presentaron atípicas citológicas correspondientes a lesiones premalignas o carcinomas: en 27 casos el diagnóstico citológico fue CIN 1, en 26 CIN 2 o CIN 3, y en 14, carcinoma invasivo (12 casos carcinoma epidermoide y 2 casos adenocarcinoma). No se detectaron atípicas en las 1.178 mujeres restantes (Tabla 7).

El estudio de las extensiones citológicas de cérvix de las 1.219 mujeres de los CPF reveló la existencia de anomalías citológicas en 72 de los casos . En 33 (2,7%) muestras se identificaron signos morfológicos de infección por papilomavirus, en 26 (2,1%) atípicas correspondientes a CIN 1, en 13 (1%) a CIN 2 o 3, y en dos (0,2%) se identificaron células malignas, correspondientes a carcinoma invasivo. En 3 de las muestras de CIN, además, se detectaron signos de infección por HPV. En las restantes 1.148 muestras no se identificaron anomalías citológicas.

TABLA 7: Resultados del estudio citológico de las muestras de cérvix de las pacientes de los Centros de Planificación Familiar (CPF) y de la Clínica Colposcópica (CC). Los criterios citológicos de diagnóstico se describen en sección 3.2.2.

	NEM		CIN1		CIN 2-3		Carcinoma	
	<i>HPV-</i>	<i>HPV+</i>	<i>HPV-</i>	<i>HPV+</i>	<i>HPV-</i>	<i>HPV+</i>	<i>HPV-</i>	<i>HPV+</i>
CPF n=1219	1148	33	24	2	12	1	2	-
CC n=26	-	-	1	-	10	3	9	3

Las extensiones citológicas de cérvix de las 26 mujeres de la Clínica Colposcópica se clasificaron del siguiente modo: 10 carcinomas epidermoides, dos adenocarcinomas, 13 CIN 2 o 3, y un caso de CIN 1. En 3 de los casos de CIN 2 o 3 y en 3 carcinomas se detectaron signos de infección por HPV.

En todos los casos en que se detectó un CIN 2/3 o carcinoma invasivo, se practicó una toma biopsica, y el estudio histológico confirmó el diagnóstico citológico.

La edad media de las mujeres con citología normal fue de 34 años, y el rango de edades fué de 16 a 82 años. La edad media de las mujeres con CIN 1, CIN 2-3 y carcinoma invasivo fue de 31, 39 y 54 años respectivamente, y los rangos de edad correspondientes, de 20 a 58 años, de 29 a 75 años, y de 31 a 76 años (Tabla 8).

TABLA 8: Distribución por edades de las pacientes con diagnóstico citológico de CIN y carcinoma invasivo. La edad media de las mujeres con CIN 1, 2/3 y cáncer fue de 31, 39 y 54 años respectivamente, y los correspondientes rangos de edad de 20 a 58 años, de 29 a 75 años y de 31 a 76 años respectivamente.

	GRUPOS DE EDAD									
	16/20	21/25	26/30	31/35	36/40	41/45	46/50	51/55	56/60	61+
CIN1	1	8	8	4	4	1	-	-	1	-
CIN 2-3	-	-	3	8	7	4	2	1	-	1
Carcinoma	-	-	-	1	1	2	1	4	1	4

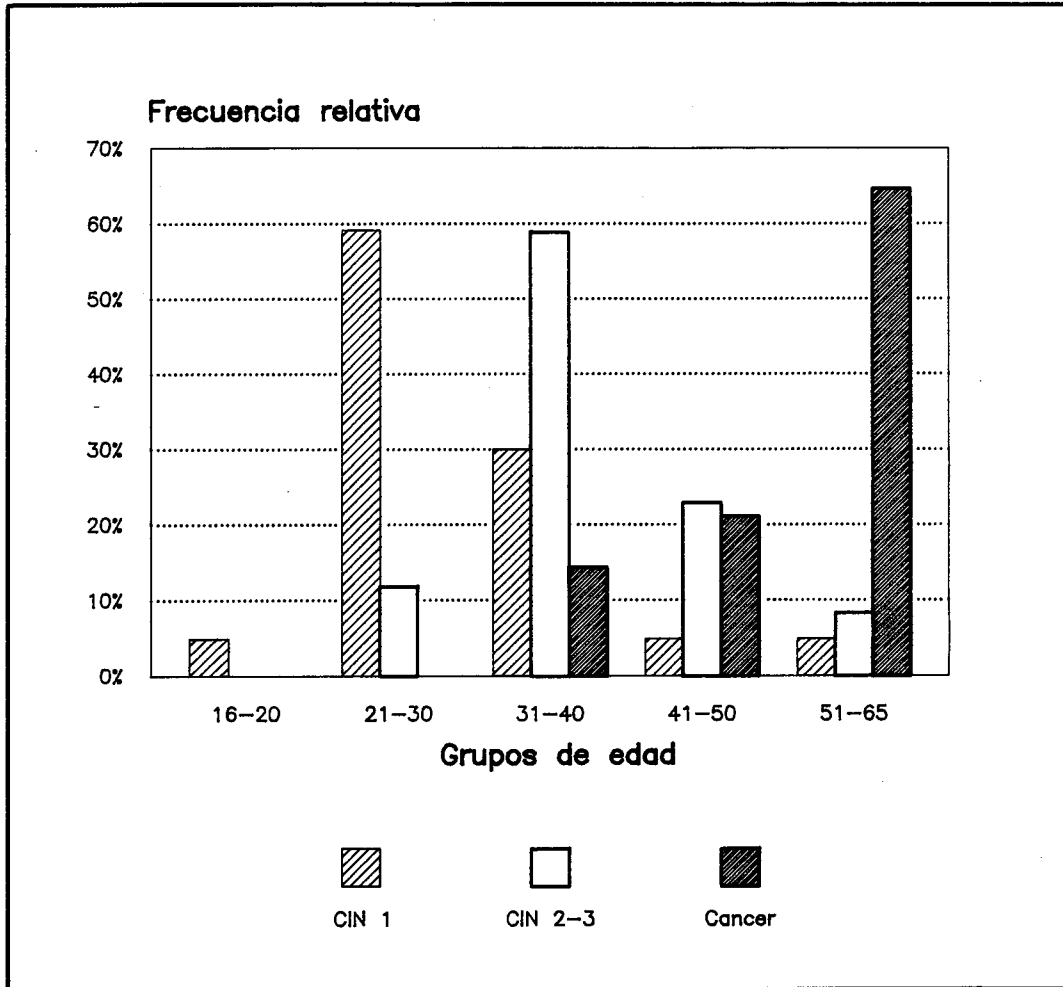


FIGURA 7: Distribución por edades de las mujeres con un diagnóstico citológico de CIN 1, CIN 2-3 y carcinoma invasivo.

4.2. PREVALENCIA DEL DNA DE LOS TIPOS 6, 11, 16 Y 18 DE HPV EN MUESTRAS DE CERVIX DE MUJERES CON CITOLOGIA NORMAL Y CON NEOPLASIA CERVICAL, MEDIANTE LA TECNICA DE HIBRIDACION SLOT-BLOT.

4.2.1. PREVALENCIA DEL DNA DEL HPV EN LAS MUESTRAS DE CERVIX DE MUJERES CON CARCINOMA INVASIVO Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL.

Se detectó la presencia del DNA del HPV en el 54% (IC 95%: 41%-66%) de las muestras de las pacientes de ésta serie. No se demostraron variaciones significativas en la tasa total de prevalencia del virus en relación con el grado histológico de la lesión. El HPV 16 fue el genotipo más frecuente en este grupo, con una tasa de prevalencia del 45% (95% IC: 32%-35%). La tabla 9 recoge las cifras de prevalencia de los diferentes genotipos, en relación con el grado histológico de la lesión.

Se identificó el DNA del papilomavirus en 15 de las 27 muestras clasificadas como CIN 1 (56%; IC 95%: 35%-75%) y en 14 de las 26 muestras de CIN 2/3 (54%; IC 95%: 33%-74%). El patrón de distribución de los 4 genotipos en ambos grupos de muestras fue similar: el HPV 16 resultó ser el genotipo más frecuente ($p < 0,0003$). Se detectó en el 48,5% de las muestras de CIN 1 (IC 95%: 22%-68%) y en el 38,5% (IC 95%: 20%-60%) de las muestras de CIN 2/3. La prevalencia de los genotipos HPV 6, 11 y 18 fue menor, sin diferencias significativas entre las correspondientes tasas.

TABLA 9: Prevalencia de la infección por los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV en mujeres con CIN y carcinoma invasivo.

Se ha empleado la técnica Slot-blot de hibridación para la detección del DNA del HPV. Los intervalos de confianza del 95% se han calculado por aproximación a la distribución normal, y en las muestras pequeñas, a la binomial.

GRUPO	HPV 6	HPV 11	HPV 16	HPV 18	Más de 1	DNA HPV
CIN 1 95% CI (n=27)	15% 4%-34%	18.5% 6%-38%	48.5% 22%-68%	15% 4%-34%	19% 6%-38%	56% 35%-75%
CIN 2-3 95% CI (n=26)	31% 14%-52%	19% 7%-39%	38.5% 20%-60%	15.5% 4%-35%	20% 7%-39%	54% 33%-74%
Carcinoma 95% CI (n=14)	0	0	50% 23%-77%	0	0	50% 23%-77%

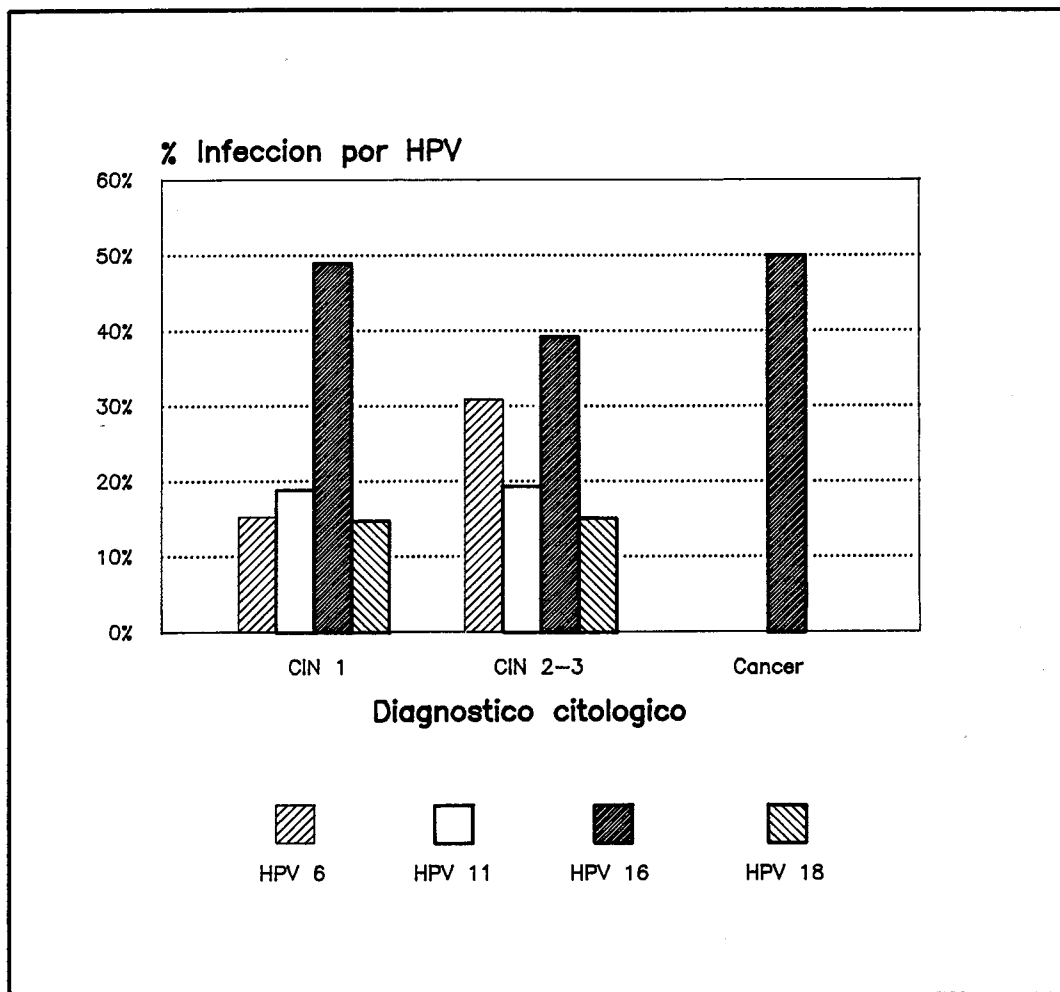


FIGURA 8: Prevalencia de la infección por los genotipos 6, 11, 16 y 18 en mujeres con un diagnóstico citológico de CIN 1, CIN 2-3 y carcinoma invasivo.

El HPV 16 fue el único genotipo presente en la muestras de las pacientes con cáncer, y se detectó en 7 de las 14 muestras (50%; IC 95%: 23%-77%). De las dos muestras correspondientes a adenocarcinoma, una resultó positiva.

4.2.2. PREVALENCIA DEL DNA DEL HPV EN LAS MUESTRAS DE CERVIX DE MUJERES CON CITOLOGIA NORMAL.

Se detectó la presencia del DNA del papilomavirus en las muestras de 189 de las 1178 mujeres con una citología normal. Las tasas de prevalencia de los diferentes genotipos, para los diferentes grupos de edad, se recogen en la tabla 10.

Se comprobó que la frecuencia de la infección por HPV estaba en relación con la edad (Chi^2 , $p < 0,001$). La tasa de prevalencia más elevada correspondió al grupo de mujeres más jóvenes, con un pico de prevalencia del 38% en el intervalo de edad entre 16 y 20 años. La prevalencia del virus fue menor en los grupos de 21 a 25 y 26 a 30 años (21,5% y 17%), y descendió de nuevo (13%) en el grupo de 31 a 35 años. A partir de esta edad, se mantuvo constante para los sucesivos grupos. Los dos aparentes picos de frecuencia encontrados en los grupos de edad de 46 a 50 años y 61 o más no resultaron estadísticamente significativos. En la figura 9 se representa gráficamente la correlación entre la frecuencia de la infección y la edad.

Por lo tanto, los 10 intervalos de edad iniciales, se reclasificaron en 3, que mostraban diferencias estadísticamente significativas (Chi^2 , $p < 0,005$) entre sí en cuanto a la frecuencia de infección por HPV: en el intervalo de 16/20 se

TABLA 10: Prevalencia de la infección por los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV en las mujeres con citología normal, en relación con la edad. Se ha empleado la técnica Slot-blot de hibridación para la detección del DNA del HPV, según se describe en sección 3.3.4.

TIPO HPV	GRUPOS DE EDAD									
	16/20 n=48	21/25 n=168	26/30 n=248	31/35 n=260	36/40 n=202	41/45 n=114	46/50 n=54	51/55 n=38	56/60 n=29	+ 61 n=17
HPV 6	8 17%	11 6.5%	14 5.5%	19 7%	8 4%	5 4%	5 9%	3 8%	1 3.5%	3 17%
HPV 11	9 19%	20 12%	21 8.5%	22 8.4%	13 6.4%	8 7%	6 11%	3 8%	2 7%	2 12%
HPV 16	10 21%	24 14%	29 12%	23 8.5%	15 7.5%	8 7%	9 16.5%	3 8%	2 7%	2 12%
HPV 18	11 23%	24 14%	27 11%	23 8.5%	15 7.5%	6 5%	8 15%	3 8%	2 7%	2 12%
Más de 1 tipo	13 27%	24 14.5%	23 8.5%	23 9%	13 6.5%	7 6%	9 17%	3 7.5%	2 7%	2 12%
HPV DNA	18 38%	36 21.5%	43 17%	34 13%	23 11.5%	13 11.5%	11 20%	5 13%	3 10%	3 17%

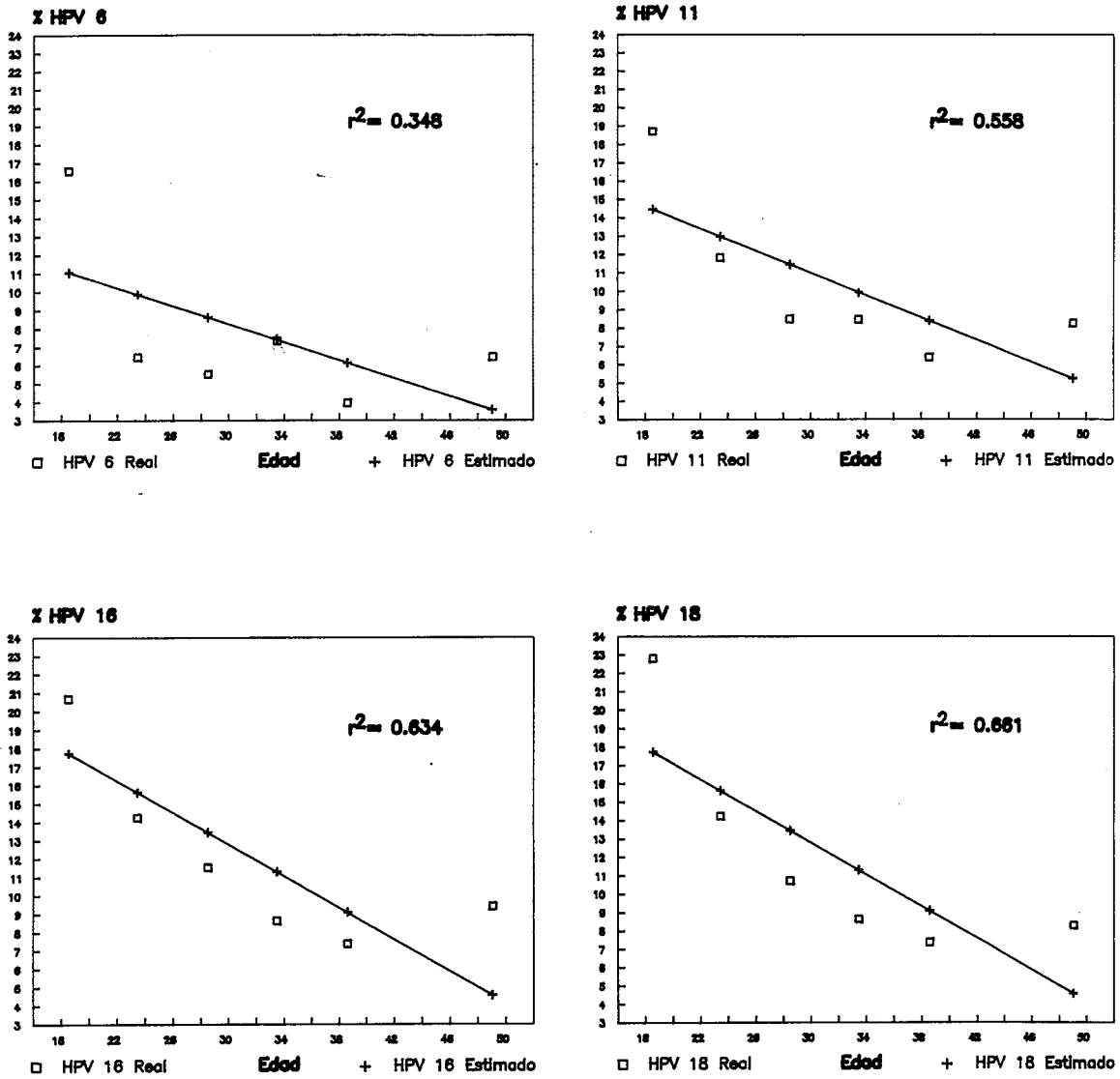


FIGURA 9: Prevalencia de la infección por los genotipos 6, 11, 16 y 18 de HPV en las mujeres con citología normal, en relación con la edad. Se representan las rectas de regresión con sus correspondientes coeficientes de determinación.

demonstró una tasa de infección del 38% (IC 95%: 24%-51%), en el intervalo de 21/30 años del 19% (IC 95%: 15%-23%), y en el intervalo de 30 años o más del 13% (IC 95%: 10%-15%)(Tabla 11). La prevalencia de cada genotipo particular de HPV resultó igualmente dependiente de la edad ($p < 0,05$).

El patrón de distribución de los cuatro tipos de virus (expresado como la frecuencia relativa de cada uno de ellos) fue constante para todos los grupos de edad: los genotipos 16 y 18 fueron los más prevalentes, mientras que el genotipo 6 resultó el menos frecuente. HPV 16 fué más frecuente que HPV 6 (Chi^2 ; $p < 0,005\%$), HPV 18 más frecuente que HPV 6 ($p < 0,005\%$), HPV 16 más frecuente que HPV 11 ($p < 0,005\%$), y HPV 11 más frecuente que HPV 6 ($p < 0,001\%$). No se demostró diferencia significativa entre la proporción de mujeres infectadas con HPV 16 y 18.

Con el fin de obtener una estimación del porcentaje de mujeres de la población general de Vizcaya infectadas por el HPV, se calcularon, a partir de los porcentajes obtenidos en la muestra de mujeres con citología normal, las tasas totales de prevalencia de los diferentes genotipos ajustadas a la estructura de edad de la población, según se describe en la sección 3.5.4. (Fuente de información sobre la población de mujeres de Vizcaya : Dirección de Información Sanitaria y Evaluación del Dpto. de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco). Los resultados se recogen en la Tabla 11: la tasa total de prevalencia de la infección por HPV que se obtuvo para la población general de mujeres de Vizcaya fué del 17% (IC 95%: 14%-19%) (Tabla 11). Los genotipos más prevalentes fueron el HPV 16 y 18. Para ambos se obtuvo una tasa de infección del 11% (95% IC: 9%-13%), mientras que a los genotipos 6 y 11 correspondió una tasa del 7% (IC 95%: 5%-9%) y del 10% (IC 95%: 8%-12%), respectivamente.

TABLA 11: Distribución de los diferentes genotipos de HPV en los tres grupos de edad con diferencias estadísticas significativas (Chi²; p<0,005), y tasa total de prevalencia en la población del Vizcaya, ajustada a la estructura de edad de la población.

TIPO HPV	GRUPOS DE EDAD			POBLACION GENERAL
	16/20 n1=481	21/30 n2=416	31+ n3=714	
HPV 6	17%	6%	6%	7%
95% IC	6%-27%	4%-8%	4%-8%	5%-9%
HPV 11	25%	10%	8%	10%
95% IC	13%-37%	7%-13%	6%-10%	8%-12%
HPV16	21%	13%	9%	11%
95% IC	9%-32%	1%-16%	7%-11%	9%-13%
HPV 18	23%	12%	8%	11%
95% IC	11%-35%	9%-15%	6%-10%	9%-13%
HPV DNA	38%	19%	13%	17%
95% IC	24%-51%	15%-23%	10%-15%	14%-19%
	N1=48.571	N2=99.438	N3=337.762	

ni= tamaño de la muestra de mujeres en edades comprendidas en el intervalo.

*Ni= tamaño de la población de mujeres de Vizcaya en edades comprendidas en el intervalo.

*Fuente= Dirección de Información Sanitaria y Evaluación del Dpto. de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco

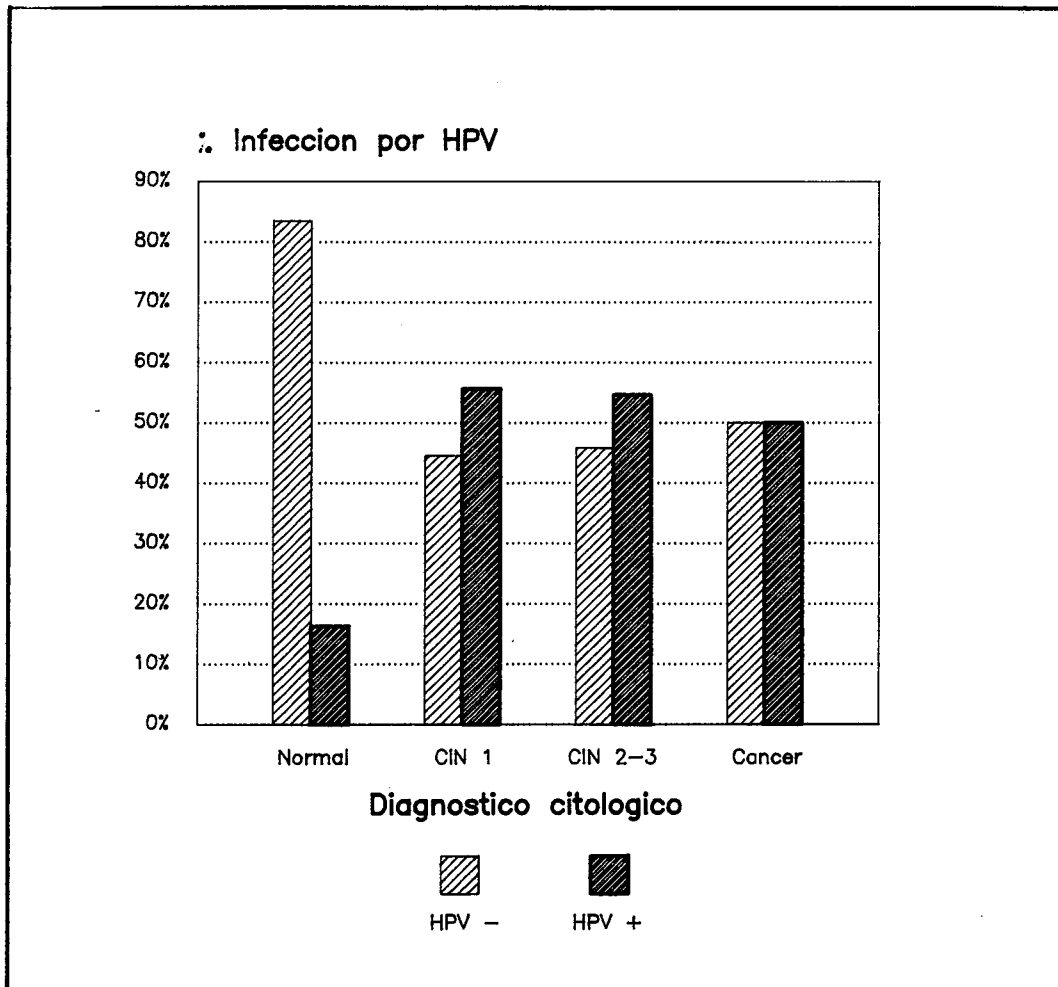


FIGURA 10: Prevalencia de la infección por HPV en las mujeres con citología normal, CIN 1, CIN 2-3 y carcinoma invasivo.

En resumen, se demostró una mayor prevalencia del DNA del HPV en las muestras de CIN/ cáncer que en las muestras normales. El tamaño de la muestra obligó a restringir el análisis de significación estadística de los resultados a dos grupos: al conjunto de las mujeres con diagnóstico citológico de cáncer de cérvix o CIN, frente a las mujeres sin anomalías citológicas (sección 3.5.2.). Los genotipos 6 y 16 de HPV se detectaron con mayor frecuencia en las muestras de lesiones neoplásicas que en las normales ($p < 0,001$), y también el genotipo 11 ($p < 0,008$). La frecuencia de la infección por HPV 18 no resultó significativamente diferente en ambos tipos de muestras.

4.2.3. PREVALENCIA DEL DNA DEL HPV EN LAS MUESTRAS DE CERVIX DE MUJERES CON CITOLOGIA NORMAL DE LA POBLACION DE ALTO RIESGO DE CANCER DE CERVIX.

Se detectó la presencia del DNA del papilomavirus en las muestras de 12 de las 51 mujeres del CPF del Reino Unido (RU) con una citología normal. Los resultados para los 4 genotipos se recogen en la tabla 12. El HPV 6 resultó ser el genotipo más frecuente, con una tasa de prevalencia del 21% (IC 95%: 11%-35%); el genotipo 16 se detectó en el 17% (IC 95%:8%-31%) de las muestras, y el HPV 18 en el 11% (IC 95%:4%-24%). No se demostró la presencia del DNA del HPV 11 en ninguna de estas muestras. Cuando se compararon los resultados obtenidos para el grupo del RU con los obtenidos para la población de “bajo riesgo” del País Vasco (sección 3.5.2.), se comprobó que no existía diferencia significativa entre la tasa total de prevalencia del HPV o las tasas de prevalencia de los HPV 16 y 18 de ambas poblaciones. En cambio, la tasa de infección por el HPV 6 resultó mayor en el RU ($p < 0,001$), mientras que la tasa del HPV 11 fué mayor en el País Vasco ($p < 0,05$).

TABLA 12: Estudio comparativo de la prevalencia de la infección por los genotipos de HPV de "alto" (16 y 18) y "bajo" (6 y 11) riesgo en dos poblaciones con diferente incidencia de cáncer de cérvix.

	POBLACION		p.
	RU=Alta Inc. cc. (17/ 100.000)	PV=Baja Inc. cc. (7,3/ 100.000)	
HPV 6 95% IC	21% 11%-35%	6% 4%-8%	<0,001
HPV 11 95% IC	0% 0%-6%	10% 7%-13%	<0,05
HPV 16 95% IC	17% 8%-31%	13% 1%-16%	n.s.
HPV 18 95% IC	11% 4%-24%	12% 9%-15%	n.s.
HPV DNA 95% IC	23% 13%-38%	19% 15%-23%	n.s.

PV= País Vasco; RU= Reino Unido; cc= cáncer de cérvix; p= nivel de significación con el test Chi 2, y n.s.= no significativo.

4.3. PREVALENCIA DEL DNA DEL HPV 16 EN MUESTRAS DE CERVIX DE MUJERES CON CITOLOGIA NORMAL Y CON NEOPLASIA CERVICAL, MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA DNA-POLIMERASA.

Se analizaron con PCR un total de 118 muestras citológicas, de las cuales 43 correspondían a mujeres con neoplasia cervical (CIN y cáncer) y 75 a mujeres sin anomalías citológicas.

Se separaron alícuotas del DNA extraído de las muestras (sección 3.3.4.1.), que se sometieron a amplificación con la técnica de PCR, ajustada para detectar una secuencia subgenómica del HPV 16 (sección 3.3.5.).

El análisis electroforético de los productos de la reacción demostró que se había producido amplificación del HPV 16 en 16 de las 21 muestras de neoplasia cervical, y en 4 de las muestras normales (Tabla 13). En todos los casos, las secuencias amplificadas fueron específicas: el tamaño del DNA se correspondió con el esperado (250 bp), de acuerdo con el diseño de los cebadores (Figura 11).

La tabla 13 muestra la correlación entre los resultados obtenidos para el HPV 16 con la técnica de Slot-blot y con la PCR: 20 muestras resultaron positivas y 84 negativas con ambos test; en 5 muestras que fueron negativas con el Slot-blot se demostró la presencia del DNA viral con la PCR, y 9 muestras positivas con el Slot-blot resultaron negativas con la PCR.

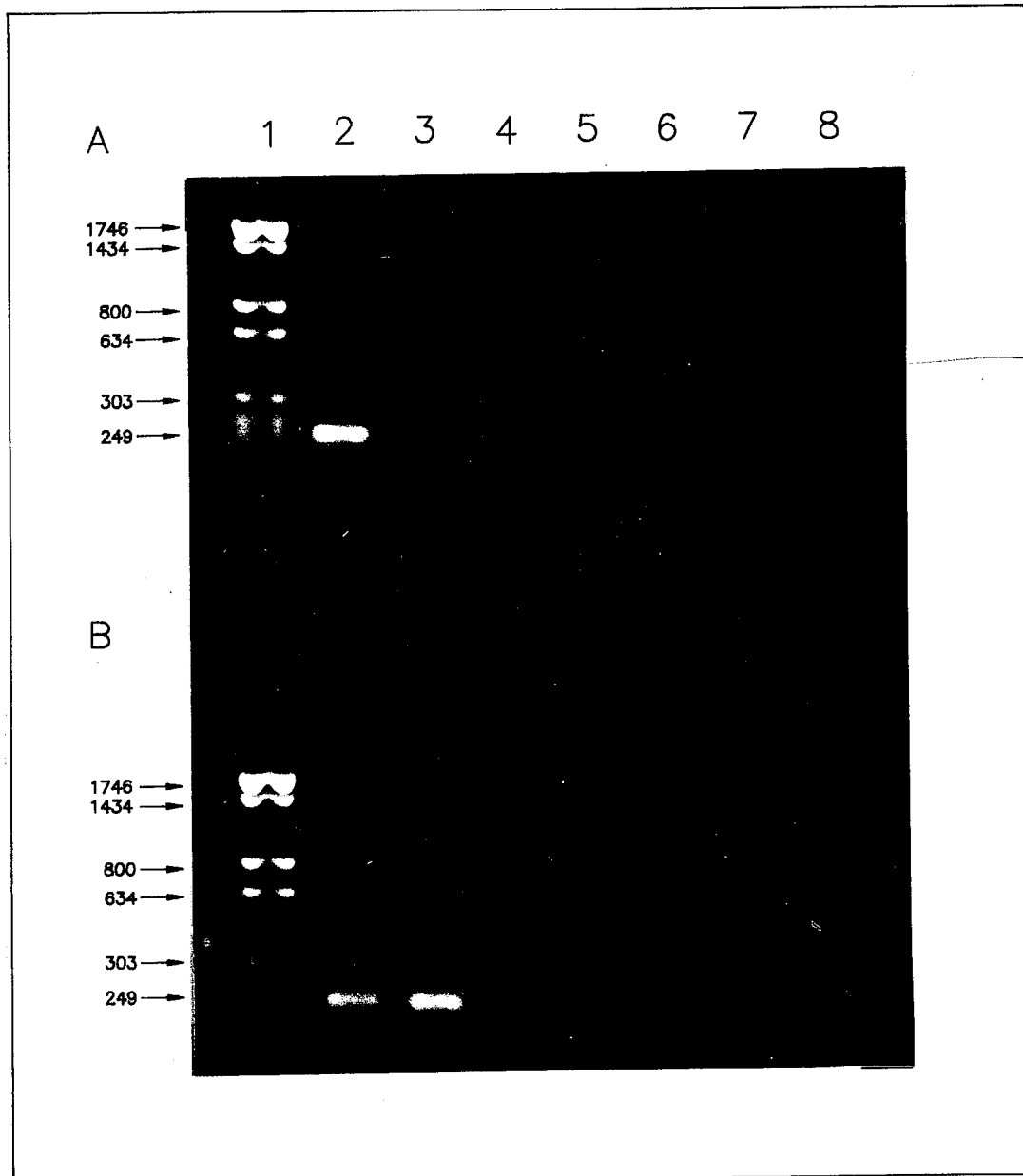


FIGURA 11: Detección del DNA del papilomavirus tipo 16 en muestras citológicas de cérvix mediante la técnica de PCR. Análisis en gel de agarosa de los productos específicos de la reacción de amplificación del DNA del HPV 16:
Calle nº 1 (A y B): Marcador de tamaño de DNA. *Calle nº 2 (A y B):* Banda amplificada de 250 bp correspondiente a control positivo.
Calles nº 3 a 8 (A): controles negativos. *Calles 3, 6 y 8 (B):* productos de amplificación del DNA extraído de las muestras, que corresponden al tamaño esperado de 250 bp.

TABLA 13: Detección de DNA del HPV 16 en muestras de cérvix normales y de lesiones neoplásicas con la técnica PCR. Correlación entre los resultados obtenidos con la técnica de hibridación Slot-blot y la PCR.

<i>SLOT-BLOT</i>	<i>PCR</i>			
	DNA HPV -		DNA HPV +	
	NORMAL	CIN/ CANCER	NORMAL	CIN/ CANCER
DNA HPV -	65	19	3	2
DNA HPV +	6	3	1	19

4.4. CUANTIFICACION DEL CONTENIDO DE DNA VIRAL Y HUMANO PRESENTE EN LAS MUESTRAS CITOLOGICAS NORMALES Y DE LESIONES NEOPLASICAS.

4.4.1. NUMERO MEDIO DE EQUIVALENTES DEL GENOMA DEL HPV 16 POR CELULA, EN MUESTRAS CITOLOGICAS NORMALES Y DE LESIONES NEOPLASICAS.

Se procedió según el método descrito en sección 3.3.6. El número medio de equivalentes del genoma del HPV 16 por célula que se estimó para las muestras citológicas normales (n=101) fue de 227,5 (+ 1349,34 SE), con un amplio rango de 0,5 hasta 13.631 copias/célula (Tabla 14).

La media decreció para las muestras de CIN y cáncer, de forma proporcional al grado de la lesión. Las muestras de cáncer contenían el menor n° medio de copias del HPV 16 : 24,71 (+25,01 SE) equivalentes/célula, con un rango muy estrecho que se extendió desde 0,8 hasta 79,1 copias del virus por célula.

En resumen, el n° medio de copias del HPV 16 por célula en las muestras normales fue significativamente más elevado que el de las muestras de cáncer (U de Mann-Whitney; $p < 0,03$), y también que el del conjunto de muestras con lesiones neoplásicas.(U de Mann-Whitney; $p < 0,02$).

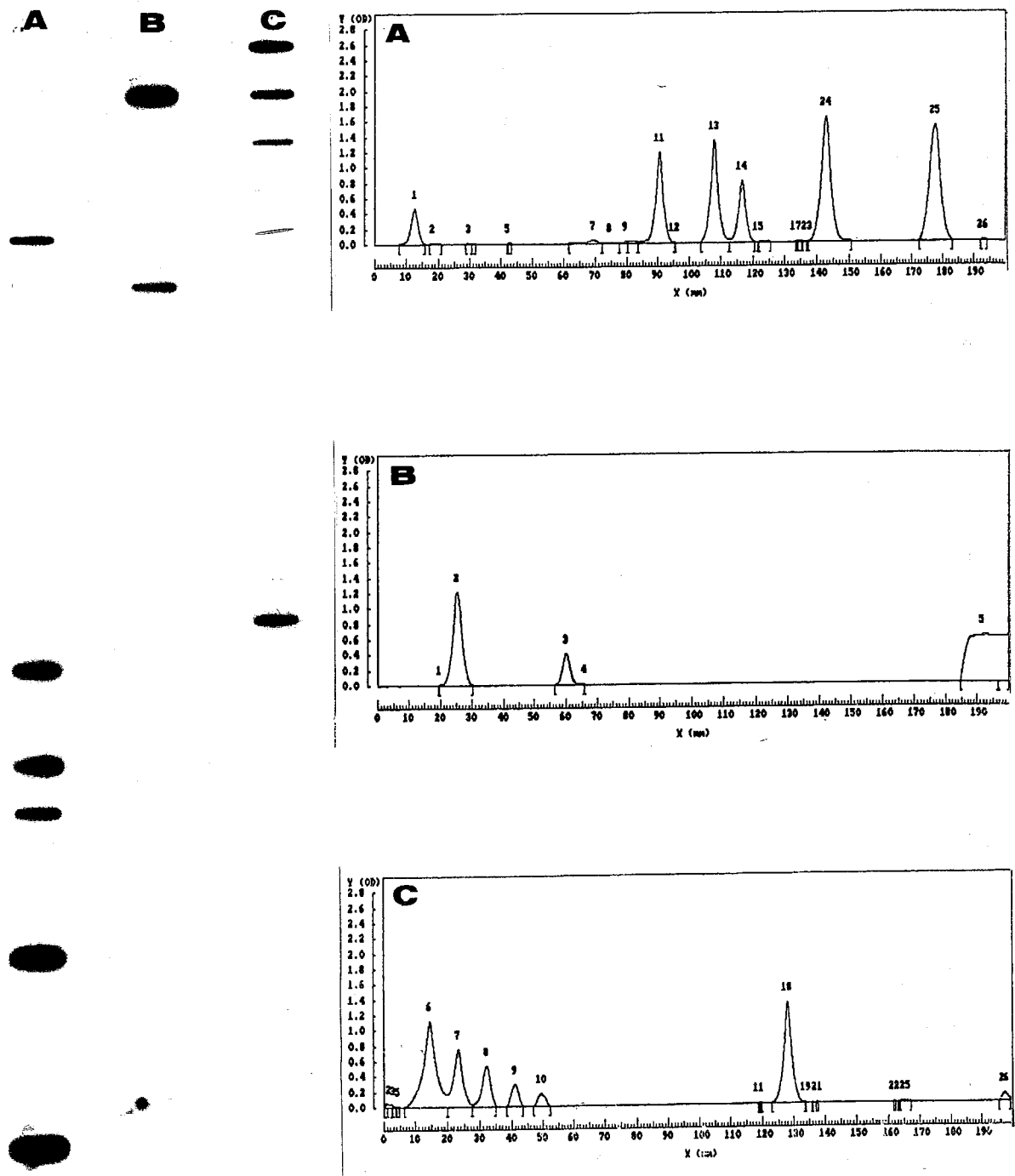


FIGURA 12: Análisis densitométrico de las autorradiografías para la cuantificación del contenido de DNA viral y humano de las muestras. Autorradiografía típica de un filtro hibridado con la sonda del HPV 18, que contiene muestras citológicas normales (filas A y B, slots 1 al 24) y controles (C), y correspondientes trazados densitométricos de las señales de las 3 filas de "slots" (A, B y C). La masa total de DNA viral presente en cada muestra (filas A y B) se calculó a partir del valor de la curva de absorción correspondiente, por comparación con el valor obtenido para las cantidades standard de la fila C, según se describe en la sección 3.3.6. La masa total de DNA humano de cada muestra se cuantificó en el filtro calibrado para la sonda de actina.

TABLA 14: Número medio de copias de HPV 16 por célula infectada en mujeres asintomáticas, con diagnóstico citológico de CIN y carcinoma invasivo. El n° medio de copias/célula infectada resulta significativamente mayor en las muestras de mujeres normales que en mujeres con CIN y/o con carcinoma invasivo según el test "U de Mann-Whitney" (p<0,03).

	n	RANGO	MEDIA + SE	MEDIANA
NORMAL	101	0,5-13.631	227,5+1349,34	53,8
CIN 1	13	0,24-431	110,67+151,66	20,5
CIN 2-3	10	5,7-139,8	42,87+46,37	23,7
CARCINOMA	7	0,8-79,1	24,71+25,01	20,01

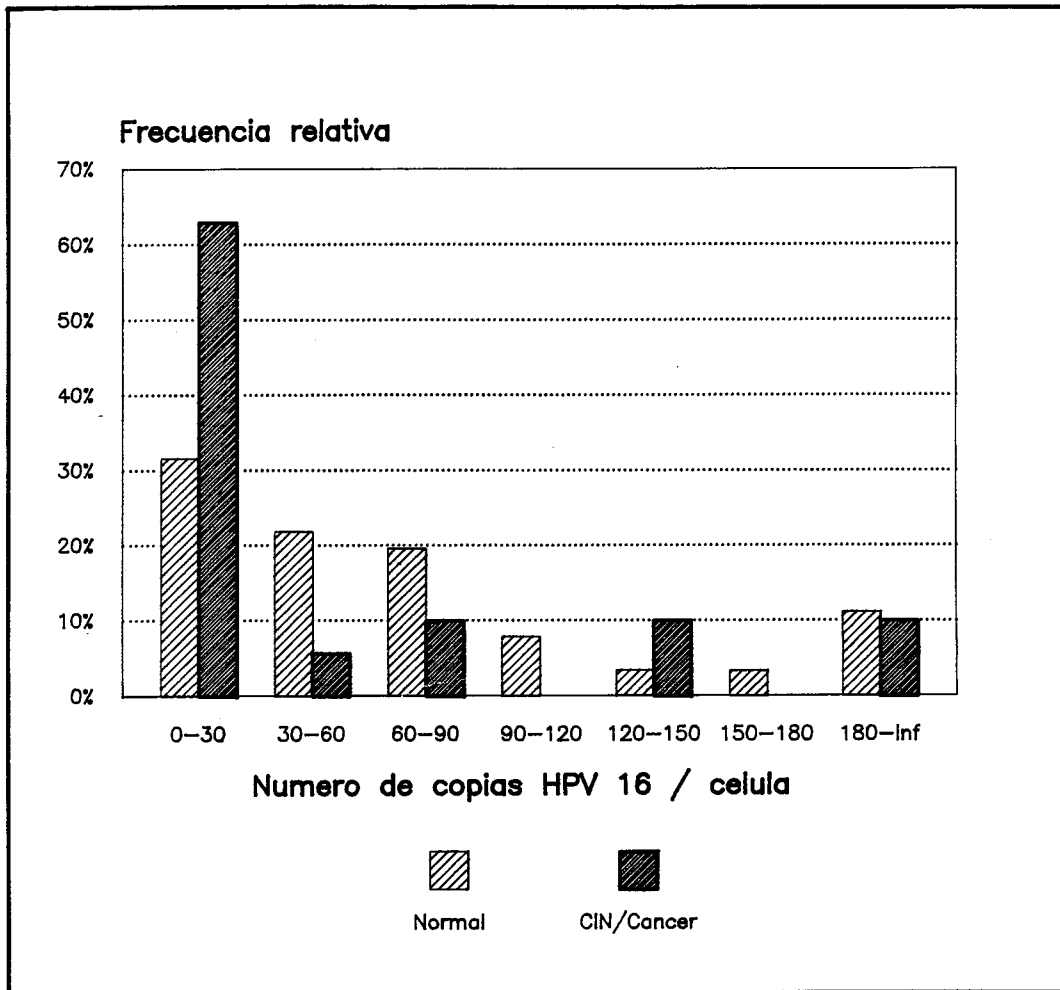


FIGURA 13: Número de copias del genoma del HPV 16 por célula infectada en muestras citológicas normales y de lesiones neoplásicas.

4.4.2. NUMERO MEDIO DE EQUIVALENTES DEL GENOMA DEL HPV 18 POR CELULA EN MUESTRAS CITOLOGICAS NORMALES Y DE LESIONES NEOPLASICAS.

Los resultados del estudio se resumen en la tabla 15. El número medio de copias del genoma del HPV 18 por célula más alto se encontró en las muestras normales: 168,95 (+ 475,12 SE). El rango de copias/ célula se extendió desde 0,8, en el límite de detección de la técnica Slot-blot, hasta 4.519. El número menor correspondió a las muestras de la lesión neoplásica de mayor grado, que en ésta serie fué CIN 2-3: 8,55 (+3,65 SE) copias del genoma del HPV 18 por célula infectada (U de Mann-Whitney; $p < 0,02$).

TABLA 15: Número medio de copias de HPV 18 por célula infectada en mujeres asintomáticas, con diagnóstico citológico de CIN y carcinoma invasivo. El n° medio de copias/célula infectada resulta significativamente mayor en las muestras de mujeres normales que en las de mujeres con CIN y/o con carcinoma invasivo según el test "U de Mann-Whitney" ($p < 0,02$).

	n	RANGO	MEDIA + SE	MEDIANA
NORMAL	99	0,8-4.519	168,95+475,12	60,2
CIN 1	4	2,12-102,3	93,63+103,39	56,55
CIN 2-3	4	1-25,9	8,55+10,11	3,65
CARCINOMA	0	-	-	-

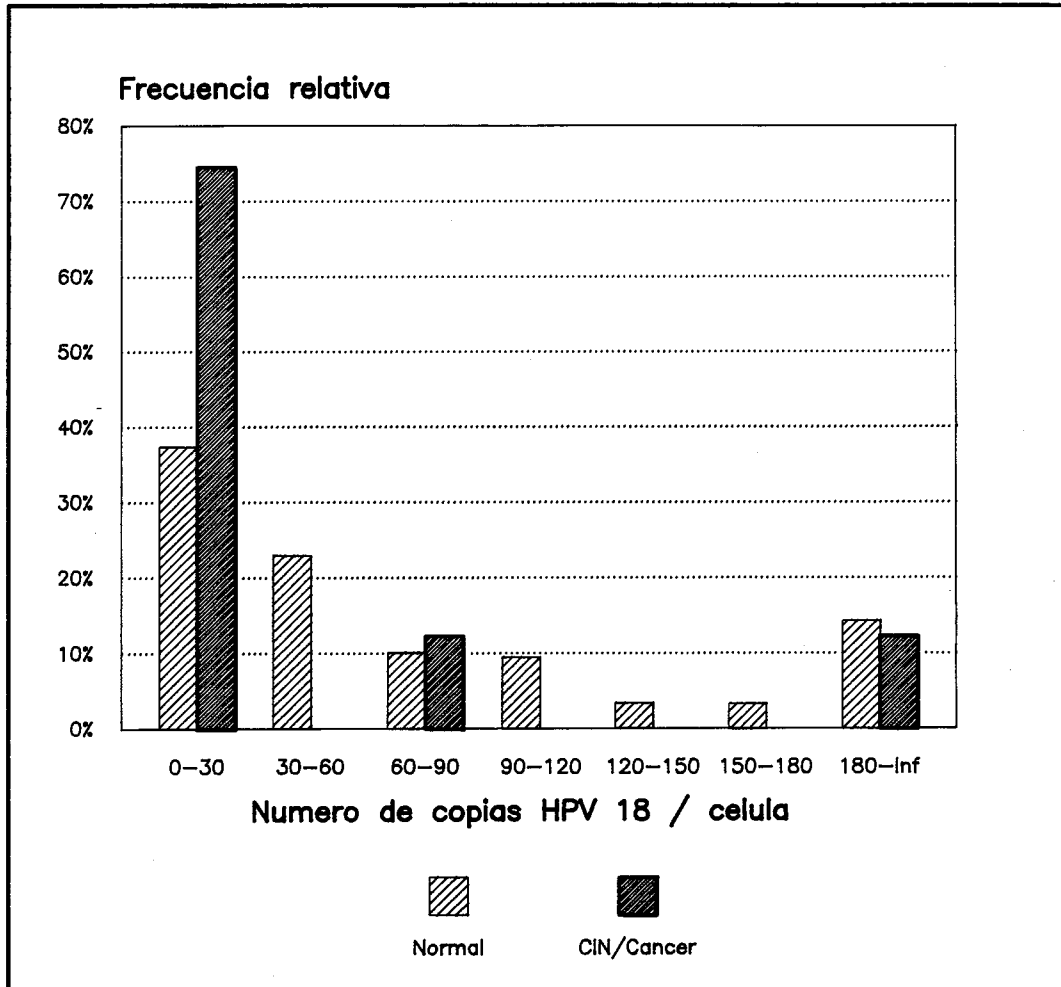


FIGURA 14: Número de copias del genoma del HPV 18 por célula infectada en muestras citológicas normales y de lesiones neoplásicas.

4.5. RIESGO RELATIVO DE TRANSFORMACION MALIGNA DE LAS CELULAS CERVICALES ASOCIADO A LA INFECCION POR EL GENOTIPO 16 DE HPV.

Conocido el porcentaje de mujeres con cáncer de cérvix infectadas por HPV 16, y el porcentaje de mujeres infectadas por HPV 16 de la población normal, se calculó el riesgo de cáncer condicionado por la infección viral, aplicando la fórmula de Bayes (sección 3.5.5.).

La probabilidad de que una mujer infectada por el virus desarrolle cáncer ($Pr(C/16)$) -de acuerdo con el porcentaje de mujeres cancerosas que están infectadas por el virus-resultó:

$$Pr(C/16) = \frac{Pr(16/C)Pr(C)}{Pr(16)} = \frac{0,50 \cdot 0,00017}{0,50 \cdot 0,00017 + 0,09(1-0,00017)} = 0,00094$$

siendo $Pr(16) = Pr(16/C) \cdot Pr(C) + Pr(16/no C) \cdot Pr(no C)$

$Pr(16/C)$ = porcentaje de infectadas entre las mujeres con cáncer = 0,50 (IC del 95%: 0,23-0,77).

Segun los datos proporcionados por la Dirección de Información Sanitaria y Evaluación del Gobierno Vasco, en el año 1988 se produjeron 56 nuevos casos de cáncer de cérvix en Vizcaya, que correspondieron a pacientes en edades comprendidas entre los 30 y 85 años. $Pr(C)$ es el porcentaje de mujeres con cáncer entre la población de Vizcaya de éste grupo de edad (337.762 mujeres entre 30 y 85 años).

$Pr(16)$ es la probabilidad de infección por HPV 16 en la población total (normal o con cáncer) de más de 31 años.

$Pr(16/no C)$ es el porcentaje de infectadas entre las mujeres sin cáncer del mismo grupo de edad (0,09; Tabla 11)

$Pr(no C)$ es el porcentaje de mujeres sin cáncer entre la población de Vizcaya de más de 30 años ($1-Pr(C)$).

La probabilidad de que una mujer no infectada por el virus desarrolle cáncer ($Pr(C/no 16)$) -de acuerdo con el porcentaje de mujeres con cáncer no infectadas por el virus- se calculó según la fórmula:

$$Pr(C/no 16) = \frac{Pr(no 16/C) Pr(C)}{Pr(no 16)} = \frac{0,50 \cdot 0,00017}{0,50 \cdot 0,00017 + (1-0,09)(1-0,00017)} = 0,0000934$$

siendo $Pr(no 16) = Pr(no 16/C) \cdot Pr(C) + Pr(no 16/no C) \cdot Pr(no C)$,

$Pr(no 16/C)$ = porcentaje de mujeres con cáncer no infectadas (0,5; IC del 95%: 0,23-0,77),

y $Pr(no 16/no C)$ = porcentaje de no infectadas entre las mujeres de 30 a 85 años normales.

El factor multiplicador del riesgo de cc asociado a la infección que resultó:

$$\frac{Pr(C/16)}{Pr(C/no 16)} = \frac{0,00094}{0,0000934} = 10$$

4.6. INVESTIGACION DEL RIESGO DE EVOLUCION A CIN Y DE PROGRESION A LESION CIN DE ALTO GRADO DEL EPITELIO CERVICAL EN MUJERES PORTADORAS DEL DNA DE HPV.

Se efectuó el seguimiento de un grupo de 60 mujeres con marcadores de DNA de HPV 16 y 18, de otro grupo de 60 mujeres con marcadores de DNA de HPV 6 y 11, junto con un grupo control de 120 mujeres no portadoras del virus. En todos los casos, se empleó al inicio del estudio el test Slot-blot de hibridación para la detección de los tipos específicos de HPV y, en un cierto número de casos, se repitió el test de hibridación durante el seguimiento, que confirmó el resultado inicial. El seguimiento de las mujeres se efectuó por un periodo variable entre 18 y 36 meses.

4.6.1. SEGUIMIENTO DE MUJERES ASINTOMATICAS PORTADORAS DEL DNA DEL HPV Y DE CONTROLES CON MARCADORES NEGATIVOS DE LA INFECCION.

Integraron el grupo de estudio unicamente aquellas mujeres con dos o más citologías cervicales negativas previas al inicio del mismo, y portadoras de los genotipos de 6 y 11 de HPV (negativas para 16 y 18) o de los genotipos 16 y 18 (negativas para 6 y 11). Las mujeres con marcadores negativos que formaron parte del grupo control fueron seleccionadas de modo que las edades fueran homólogas a las de las mujeres de los dos grupos anteriores (intervalo de 5 años).

TABLA 16: Seguimiento de mujeres asintomáticas infectadas con HPV6/11, HPV 16/18 y controles.

	Evolución a CIN	No evolución
HPV 6/11 (n=60)	1	59
HPV 16/18 (n=60)	4	56
Controles (n=120)	2	118

Tabla 17: Relación entre el número medio de copias de HPV 16/ 18 por célula infectada y la evolución hacia CIN, en mujeres asintomáticas. La diferencia entre las que progresan y no progresan, tanto infectadas con HPV 16 como infectadas con HPV 18, no es estadísticamente significativa, con el test "U de Mann-Whitney".

	n	RANGO	MEDIA + SE	MEDIANA
HPV 16/ no EVOL	97	0,5- 13.631	234+1.376,44	51,9
HPV 16/ EVOL	4	8,1-131,4	67,5+53,06	65,3
HPV 18/ no EVOL	96	0,8-4.519	173,22+481,86	64,5
HPV 18/ EVOL	2	26,7-43,2	32,33+7,69	27,1

Los resultados del estudio, hasta la fecha actual, se recogen en la Tabla 16. Si bien la tasa de progresión en el grupo de mujeres portadoras de los genotipos 16 y 18 de “alto riesgo” fué mayor que en el grupo de portadoras de los tipos 6 y 11 de HPV, o en las mujeres con marcadores negativos, la diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Por otra parte, se cuantificó el contenido de DNA viral por célula en las muestras del grupo de mujeres portadoras de HPV 16 y 18 (con independencia de la presencia de marcadores de 6 y 11) que evolucionaron (6 casos) y del grupo de mujeres que no evolucionaron (Tablas 14 y 15), para valorar una posible relación entre el número de copias del genoma viral/ célula y el riesgo de progresión hacia CIN. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 17.

Las muestras de las mujeres que evolucionaron contenían un número menor de copias del HPV 16 o del 18 por célula que las muestras del grupo que no evolucionaron, pero la diferencia no resultó estadísticamente significativa.

4.6.2. SEGUIMIENTO DE MUJERES CON CIN 1 PORTADORAS DEL DNA DEL HPV, Y DE CONTROLES CON MARCADORES NEGATIVOS DE LA INFECCION.

Las mujeres seguidas en este estudio tuvieron dos citologías previas consecutivas con un diagnóstico de CIN 1. No se demostraron diferencias significativas en la tasa de progresión hacia CIN de mayor grado entre el grupo de mujeres portadoras de los genotipos de HPV de alto riesgo, de bajo riesgo y el grupo de mujeres con marcadores negativos (Tabla 17).

TABLA 18: Seguimiento de mujeres con CIN 1 infectadas con HPV 6/11, HPV 16/18 y no infectadas.

	Evolucion a CIN 3	No Evolucion	Regresan
CIN 1 + HPV 6/11 (n= 4)	-	4	-
CIN 1 + HPV 16/18 (n= 14)	2	7	5
CIN 1 Controles (n=12)	4	4	4

4.7. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE DETECCION DE VARIOS SIGNOS CITOLOGICOS ESPECIFICOS E INESPECIFICOS DE INFECCION POR HPV.

4.7.1. SENSIBILIDAD DE LOS MARCADORES CITOMORFOLOGICOS "ESPECIFICOS" DE INFECCION POR PAPILOMAVIRUS.

Se identificaron signos citológicos patognomónicos de infección por papilomavirus en 31 de las 225 muestras de cérvix que contenían el DNA del HPV, mientras que no se demostró la presencia del virus con el test Slot-blot en 11 de las muestras citológicas con diagnóstico de infección por HPV (Tabla 19). La sensibilidad de los marcadores morfológicos de la infección, con relación a los marcadores moleculares, resultó del 14%.

4.7.2. SENSIBILIDAD DE LOS MARCADORES CITOMORFOLOGICOS "INESPECIFICOS" DE INFECCION PR PAPILOMAVIRUS.

Se investigó la frecuencia de varios signos morfológicos inespecíficos de infección por papilomavirus, además de los específicos, en las muestras citológicas de cérvix de 100 mujeres con infección por HPV, según el test Slot-blot de hibridación y en 100 controles negativos. Los criterios morfológicos inespecíficos se describen en sección 3.2.2. (Figuras 17 a 21).

Se demostró una relación estadísticamente significativa entre la presencia de cada uno de los signos y la presencia del DNA del HPV, con una única excepción.

TABLA 19: Sensibilidad de los marcadores citomorfológicos "clásicos" de la infección por HPV: correlación entre los resultados del estudio citológico de las muestras y la presencia del DNA del virus, detectada mediante el test slot-blot de hibridación. Los criterios clásicos son: presencia de coilocitos, y/o células disqueratóticas.

	DIAGNOSTICO CITOLOGICO			
	<i>HPV -</i>		<i>HPV +</i>	
	NORMAL	CIN/ CANCER	NORMAL	CIN/ CANCER
DNA HPV -	982	27	7	4
DNA HPV +	163	31	26	5

TABLA 20: Frecuencia de marcadores citomorfológicos específicos e inespecíficos de infección por HPV en 100 muestras citológicas positivas según el test slot-blot de hibridación de DNA y en 100 controles negativos. Los signos citológicos específicos o "clásicos" son: presencia de coilocitos, y/o células disqueratóticas, y/o células fusiformes. Los restantes signos son inespecíficos.

SIGNO CITOLOGICO	CASOS	CONTROLES	Riesgo Rel.	Chi 2 (1 gl)	p.
	%	%			
COILOCITOSIS	9	1	-	6,74	<0,01
DISQUERATOCITOSIS	21	2	-	17,74	<0,005
CEL.FUSIFORMES	14	0	-	15,05	<0,005
CITOPLASMA CLARO	42	10	6,52	26,61	<0,005
PARAQUERATOSIS	69	40	3,34	16,96	<0,005
GRANULOS CITOPL.	45	28	2,1	6,23	<0,025
COND. FILAMENTOS	56	19	5,43	29,21	<0,005
HIPERC. NUCLEAR	68	50	2,13	6,7	<0,01
BI-MULTINUCLEACION	68	48	2,3	8,21	<0,005
ANILLO PERINUCLEAR	29	19	1,74	2,74	n.s.

Riesgo relativo= Factor multiplicador de la probabilidad de infección por HPV que se asocia a la presencia del signo (fórmula de Bayes, sección 3.4.5.).

gl= grados de libertad del test Chi 2; p= nivel de significación de la diferencia de frecuencia de detección del signo citológico en muestras y controles, según el test Chi 2.

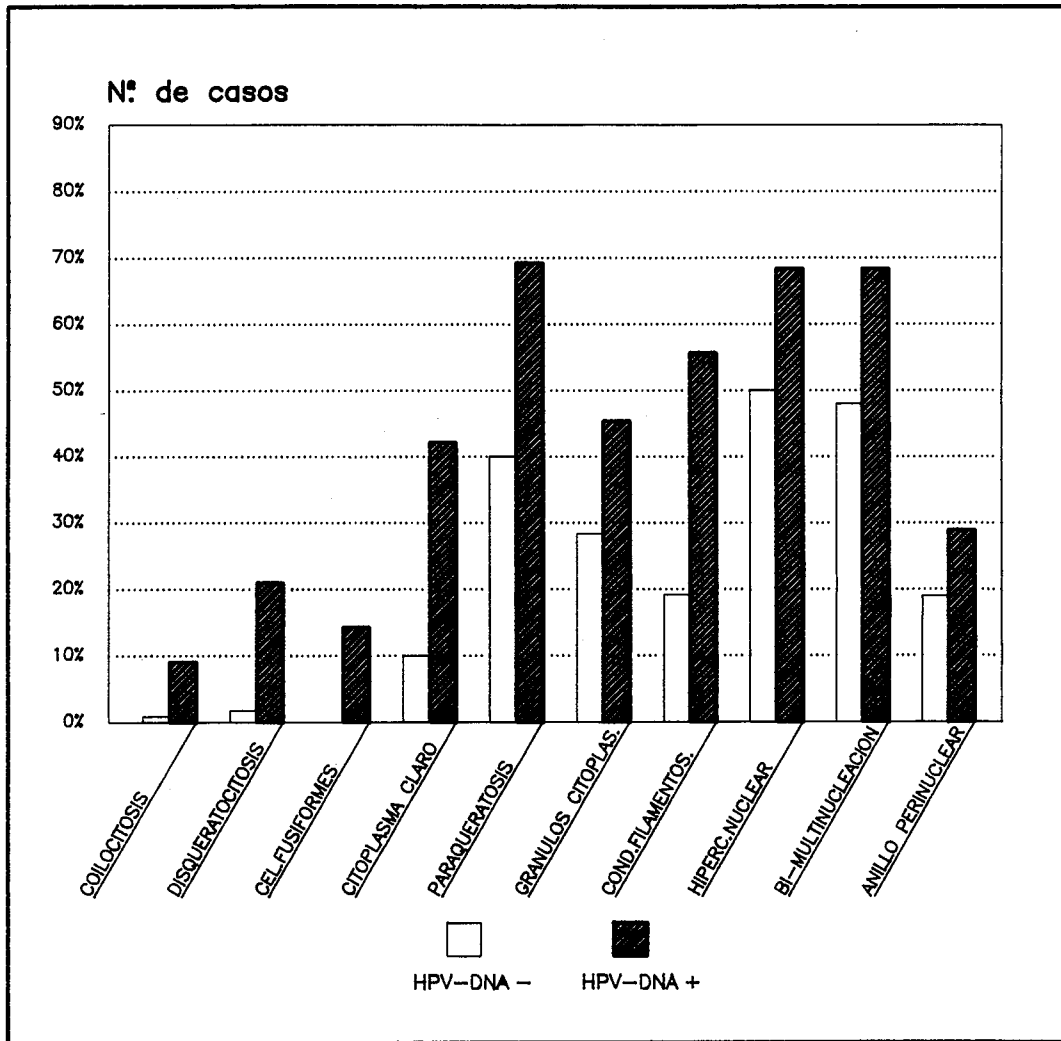


FIGURA 15: Frecuencia de varios signos citomorfologicos especificos e inespecificos de infección por HPV en muestras citológicas positivas y negativas segun el test Slot-blot de hibridación.

Los resultados del estudio se muestran en la tabla 20.

El número de signos acumulados en las muestras citológicas de mujeres infectadas resultó significativamente mayor que el de las muestras control. Por término medio, se identificaron 3,7 signos inespecíficos en las muestras positivas y 2,7 en los controles. Se observaron 4 o más signos en el 65% de las muestras citológicas positivas y únicamente en el 17% de las muestras control.

De los 7 signos no específicos evaluados, 5 mostraron una correlación más significativa con la presencia del DNA del HPV, según se demostró mediante el método estadístico de análisis discriminante. Los signos de mayor valor diagnóstico fueron los siguientes: células con "citoplasma claro", paraqueratosis, "gránulos citoplasmáticos", "condensación de filamentos citoplasmáticos" y "bi-multinucleación". Se establecieron, mediante análisis discriminante, las combinaciones más valiosas de estos signos para la identificación de la infección, y se obtuvo la fórmula óptima de decisión para la clasificación de las muestras como positivas o no: mediante este método, resultó posible identificar hasta un 65% de las mujeres infectadas, con una especificidad del 79% (Tabla 22).

Debido al tamaño de la muestra, no se demostró correlación alguna entre la presencia de genotipos específicos de HPV y un patrón determinado de efectos citopáticos.

TABLA 21: Número de criterios morfológicos inespecíficos de HPV observados en las muestras citológicas de 100 mujeres infectadas y 100 controles.

NUMERO DE SIGNOS	<i>Casos</i> n ^o	<i>Controles</i> n ^o	NIVEL DE SELECCION	
			<i>Sensibilidad</i> %	<i>Especificidad</i> %
Al menos 1	96	84	96%	16%
Al menos 2	88	67	88%	33%
Al menos 3	78	38	78%	62%
Al menos 4	64	17	65%	83%
Al menos 5	34	8	36%	92%
Al menos 6	14	3	14%	97%
N^o total de casos	100	100		

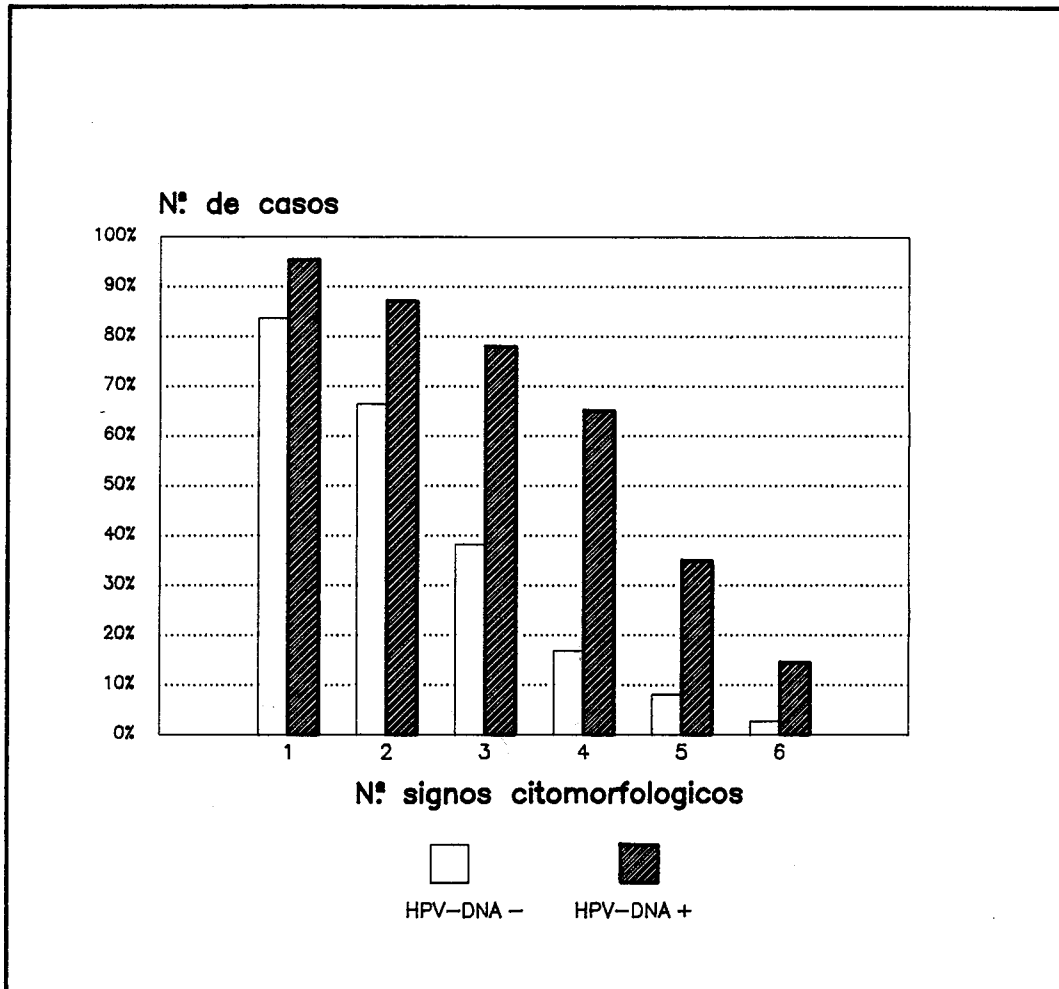


FIGURA 16: Número de signos citomorfologicos especificos e inespecificos de infección por HPV en muestras citológicas positivas y negativas segun el test Slot-blot de hibridación.

Tabla 22: Análisis discriminante de la asociación de varios signos citológicos inespecíficos con la infección por papilomavirus.

FUNCION DISCRIMINANTE	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
1,066	8%	100%
1,053	10%	100%
0,812	23%	97%
0,762	27%	96%
0,694	53%	90%
0,471	65%	79%
0,453	74%	72%
0,440	79%	66%
0,211	95%	34%
0,149	100%	0%

Valor de la función discriminante= suma de los coeficientes de cada signo (x_i)
+ Kte

Kte=0,148; x_i = coef. de cada signo segun análisis discriminante.
coef. $x_1=0,309$; coef. $x_2=0,240$; coef. $x_3=0,627$; coef. $x_4=0,291$, coef. $x_5=0,01$

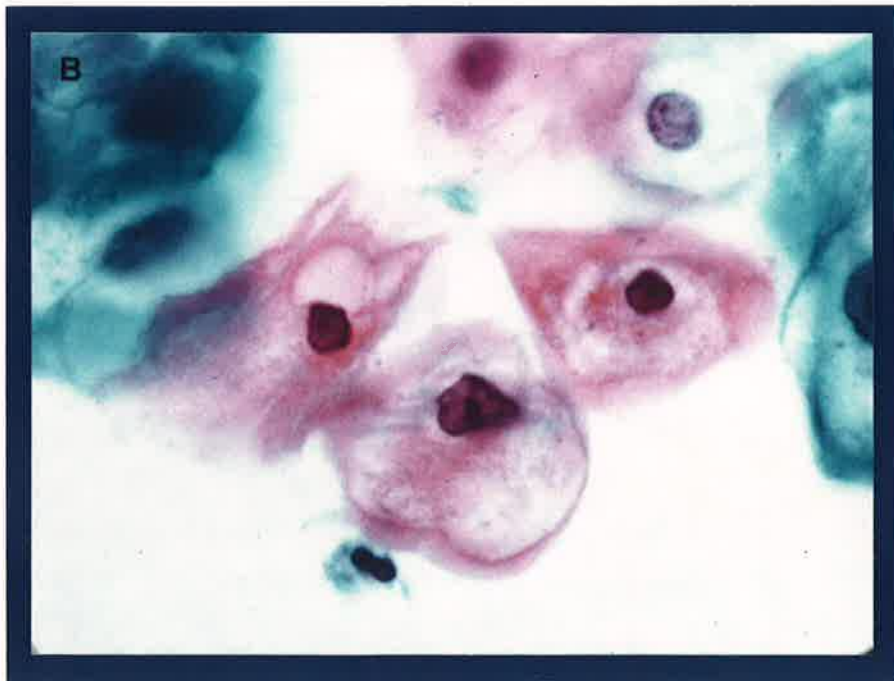
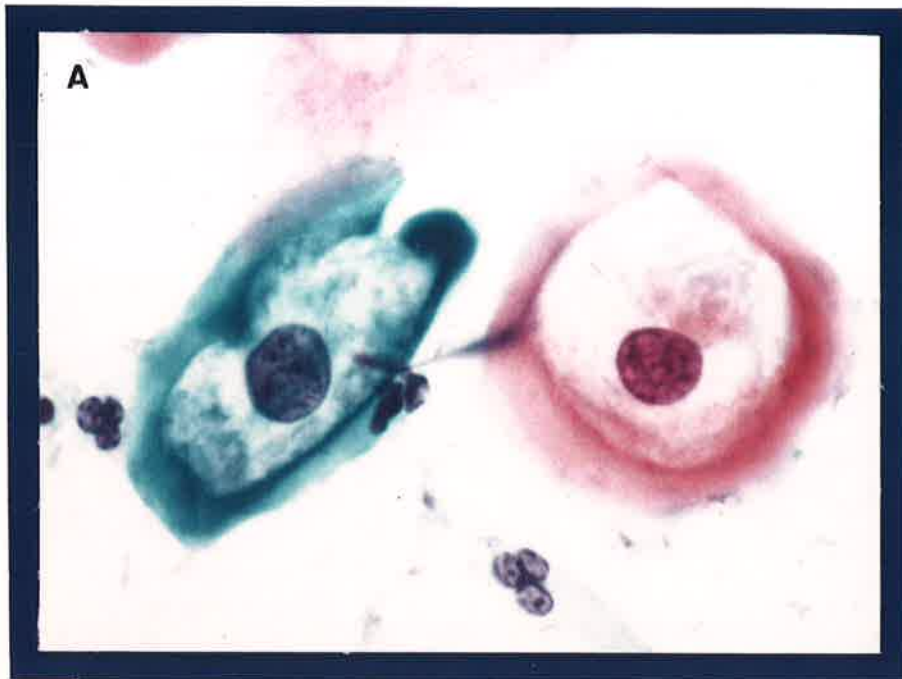


FIGURA 17: (A) *Coilocitos* “clásicos” con núcleo aumentado de tamaño, patrón regular de cromatina, y un límite bien definido entre el ecto y endoplasma (Tinción de Papanicolaou, x630).

(B) Células superficiales con “*citoplasma claro*”, con un núcleo hiper Cromático, y límite mal definido entre ecto y endoplasma (Tinción de Papanicolaou, x630).



FIGURA 18: (A) *Célula disqueratósica* “clásica”, con núcleo hiper Cromático, y citoplasma oreangeófilo denso (Tinción de Papanicolaou, x630). (B) *Paraqueratosis* en un grupo de células escamosas superficiales (Tinción de Papanicolaou, x100).

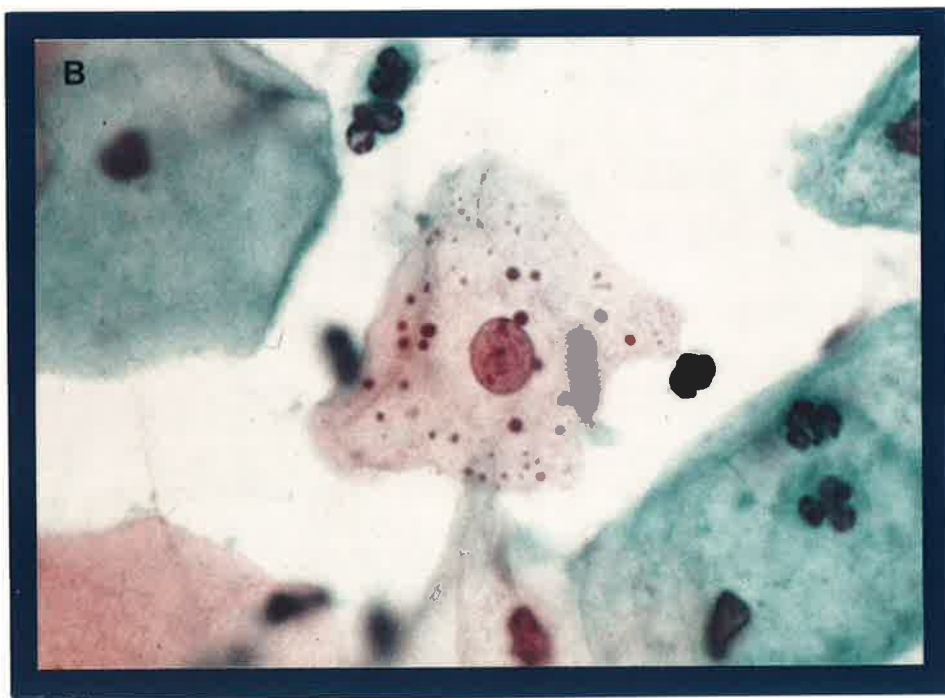
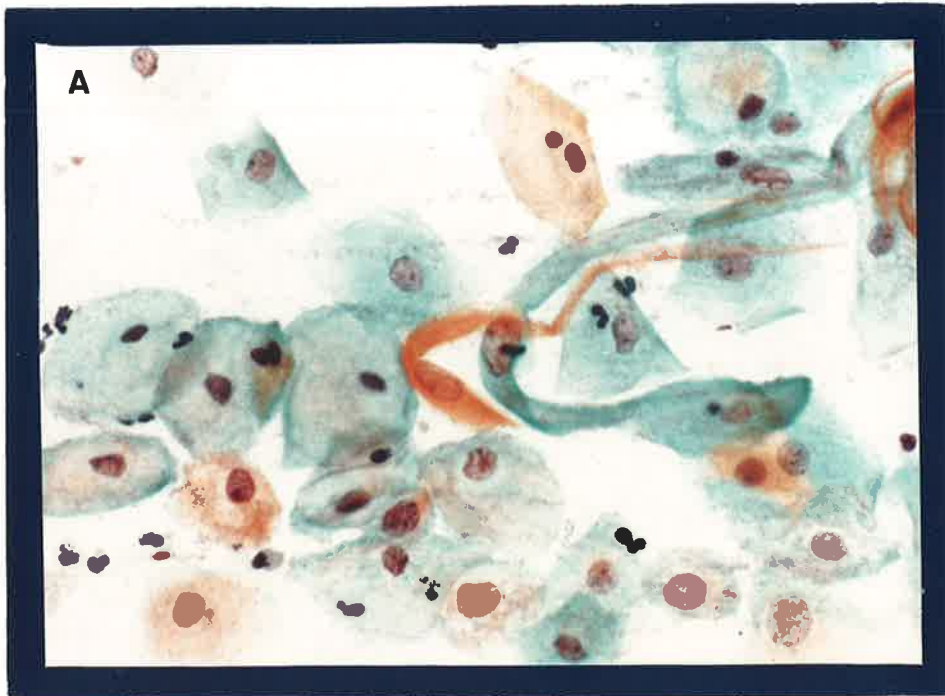


FIGURA 19: (A) *Células "fusiformes"* (Tinción de Papanicolaou, x200), (B) *Célula con "gránulos citoplasmáticos"* (Tinción de Papanicolaou, x630).

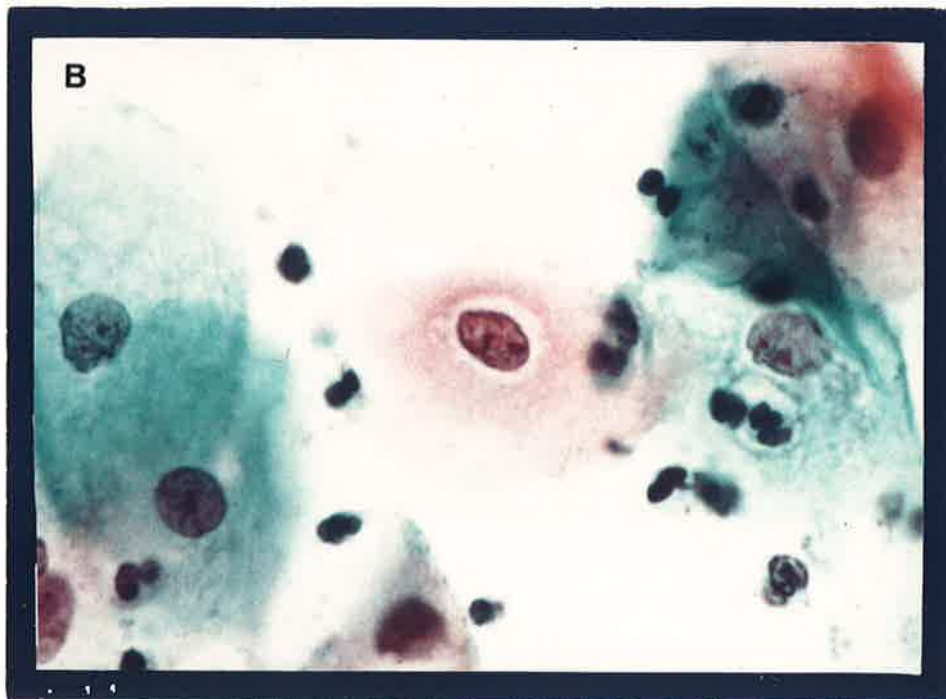
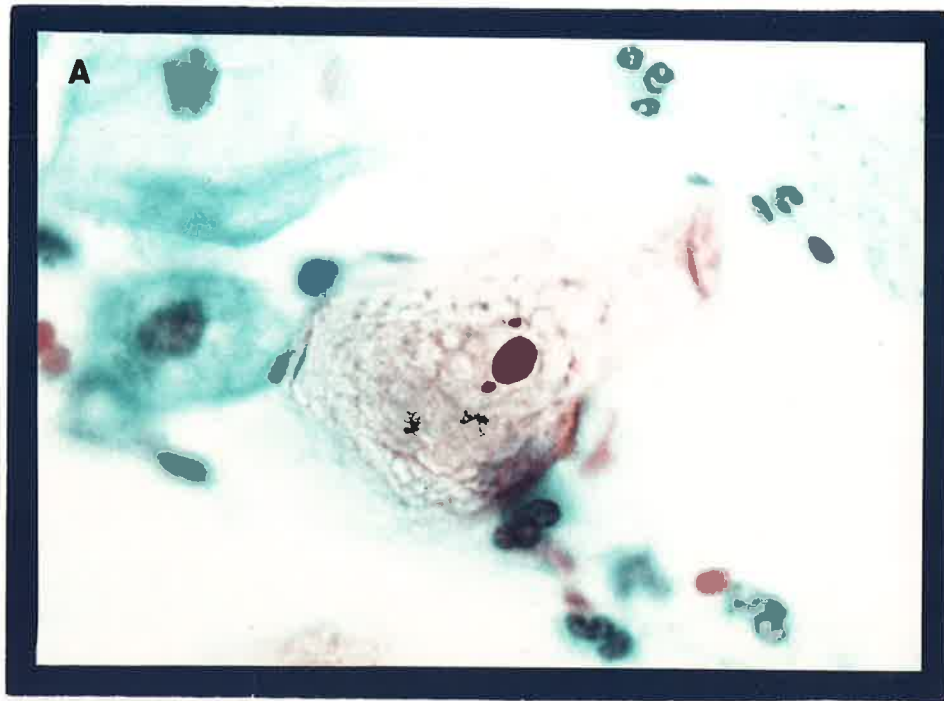


FIGURA 20: (A) "*Condensación de filamentos*" en el citoplasma de una célula superficial (Tinción de Papanicolaou, x630), (B) Célula con "*anillo perinuclear*" (Tinción de Papanicolaou, x630).

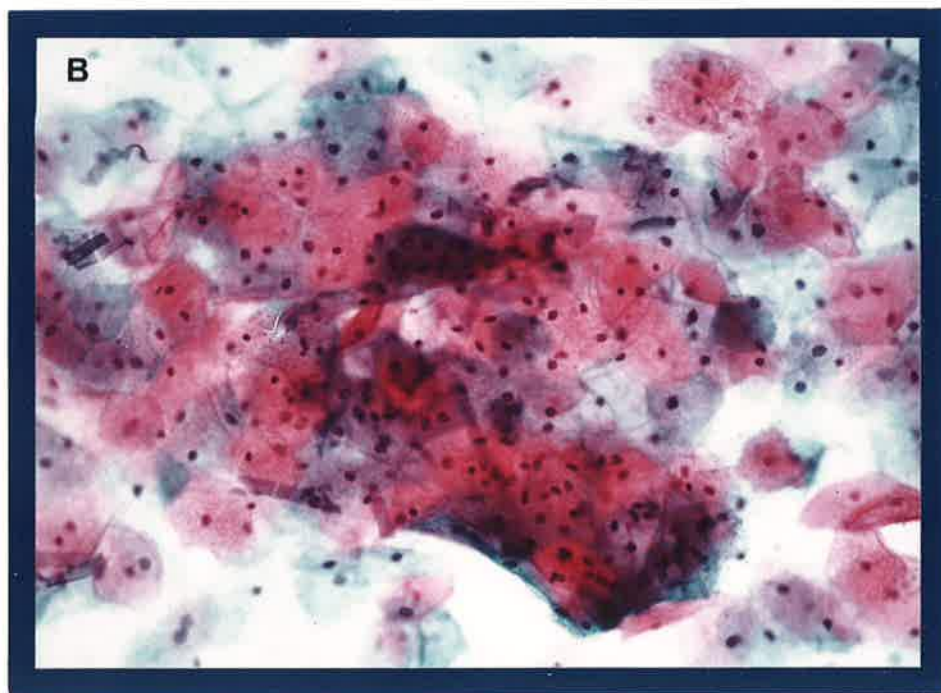


FIGURA 21 : (A) "*Binucleación*" (Tinción de Papanicolaou, x630), (B) "*Hipercromasia nuclear*" en células superficiales (Tinción de Papanicolaou, x100).

DISCUSSION

DISCUSION

Los resultados de los diferentes estudios epidemiológicos e "in vitro" efectuados en los últimos años indican que, con toda probabilidad, el HPV es el agente causal implicado en el proceso oncogénico del cérvix. Los estudios practicados "in vitro" han demostrado el potencial oncogénico de ciertos genotipos de papilomavirus humano. En efecto, se ha logrado la inmortalización de fibroblastos y queratinocitos humanos mediante la transfección del DNA del HPV 16 (Pirisi y cols., 1988). Por otra parte, y en línea con los resultados de los trabajos "in vitro", los estudios epidemiológicos efectuados en diferentes áreas geográficas han revelado que existe una estrecha asociación entre determinados genotipos de HPV y el cáncer de cérvix (Dürst y cols., 1983, Meanwell y cols., 1987; Schneider y cols., 1987).

En este sentido, se ha considerado especialmente significativo el hecho de que las tasas de prevalencia del HPV sean particularmente elevadas en determinadas áreas geográficas donde la incidencia de cáncer de cérvix es alta, tales como Latino-América y Africa tropical (Reeves y cols., 1989; Shmauz y cols., 1989). En general, las cifras de prevalencia que se han obtenido para estas poblaciones han oscilado entre el 8 y el 38% (Toon y cols, 1986; de Villiers y cols., 1987; Meanwell y cols., 1987; Kjaer y cols., 1988; Reeves y cols., 1989; Shmauz y cols. 1989; Kochel y cols., 1990). Sin embargo, para valorar estos resultados adecuadamente, es necesario disponer de datos de referencia sobre la frecuencia de la infección en poblaciones de baja incidencia y, hasta el presente, únicamente

se han practicado estudios en áreas geográficas con una incidencia media o alta de cáncer de cérvix. El presente estudio demuestra, por vez primera, que la frecuencia de la infección por HPV en una población de baja incidencia de cáncer de cervix es similar a las de otras poblaciones de media o alta tasa de incidencia. La prevalencia de infección por HPV en una muestra de mujeres representativa de la población general del PV fue del 17% (IC del 95%: 14-19%).

En general, los estudios citados revelan patrones similares de distribución de los genotipos específicos de HPV en las distintas poblaciones. Los genotipos 16 y 18 de HPV son los más prevalentes entre las mujeres sin anomalías citológicas de la mayor parte de las series, con tasas que varían entre el 6 y el 32% (Toon y cols., 1986; de Villiers y cols., 1987; Kjaer y cols., 1988; Reeves y cols., 1989). Nuestros resultados indican que en el PV, al igual que en otras poblaciones de media y alta incidencia de cáncer de cérvix, los tipos 16 y 18 de HPV, considerados “de alto riesgo”, son los más frecuentes. La tasa de prevalencia para ambos genotipos fue del 11% (IC del 95%: 9%-13%), mientras que los tipos 6 y 11 fueron identificados en el 7% (IC del 95%: 5%-9%) y el 10% (IC del 95%: 8%-12%) de los casos, respectivamente.

Nuestro estudio demuestra que la tasa de infección por HPV, en la población del País Vasco, está en relación con la edad. El porcentaje más elevado de infección correspondió a las mujeres más jóvenes, con un pico de frecuencia del 38% (IC del 95%: 24%-51%) para el grupo en el intervalo de edad de 16 a 20 años. Para las mujeres en edades comprendidas entre los 21 y los 30 años, la prevalencia del virus resultó del 19% (IC del 95%: 15%-23%), estabilizándose en el 13% (IC del 95%: 10%-15%) para el grupo de 30 años en adelante. Este hallazgo es el que cabe esperar de una enfermedad infecciosa de transmisión sexual, y es coherente con los resultados que se han obtenido en investigaciones sobre otras poblaciones

(Meisels y cols., 1977; de Villiers y cols., 1987; Hording y cols., 1990; Köchel y cols. 1990).

Hemos encontrado una tasa de prevalencia de la infección por HPV que es, al menos, doble de la que han obtenido otros grupos en distintas poblaciones (de Villiers y cols., 1987; Kjaer y cols., 1988; Kochel y cols., 1990). Este resultado podría reflejar la alta sensibilidad del test Slot-blot que hemos empleado para la identificación del HPV, en comparación con la del test FISH, utilizado en la mayor parte de los trabajos citados. La técnica de hibridación en filtro in situ es más simple técnicamente que el test Slot-blot, ya que no exige un riguroso aislamiento del DNA de las muestras, pero tiene el inconveniente de su limitada sensibilidad. Algunas experiencias de comparación entre el FISH y el Slot-blot parecen indicar que la sensibilidad del test de hibridación in situ es mucho menor que la del Slot-blot, y que los resultados que produce pueden subestimar la frecuencia real de la infección en una proporción de dos o 3, como los propios autores de estos estudios comentan (de Villiers y cols., 1987; Nuovo y cols., 1987; Cornelissen y cols., 1988). Por otra parte, hemos empleado, a diferencia de la mayor parte de los trabajos citados, un control interno del contenido de DNA humano que permite eliminar aquellas muestras de las que no se obtiene suficiente material para análisis. Hemos comprobado que, a pesar de que se ha seguido en todos los casos un protocolo standard de obtención de la muestra del epitelio cervical, un 25% aproximadamente de las muestras resultan inadecuadas para el análisis con el test de hibridación de DNA. De este modo, hemos eliminado una proporción importante de resultados falsos negativos, lo que ha condicionado un aumento proporcional en las cifras de prevalencia que hemos obtenido.

Como consecuencia de las limitaciones técnicas de los diferentes test de detección génica, no ha sido posible hasta el presente la obtención de evidencia

epidemiológica sobre la naturaleza de la relación entre el HPV y el cáncer de cérvix. Los test de detección génica desarrollados hasta la fecha presentan notables diferencias en cuanto a sensibilidad y especificidad, y los resultados que se han obtenido en los distintos estudios han estado condicionados por completo por el tipo de test de hibridación empleado. Por este motivo, no ha sido posible establecer comparaciones directas entre las cifras de prevalencia del HPV obtenidas en las diferentes poblaciones, ni sacar conclusiones sobre su relación con la incidencia del cáncer de cérvix. Se han completado únicamente dos estudios de correlación en los que se ha investigado la frecuencia de la infección por HPV en poblaciones con diferente incidencia de cáncer de cérvix, con el objeto de valorar la relación entre la variación del factor de riesgo, es decir, la infección por HPV, y la variación en la frecuencia de la enfermedad con la que se asocia, la neoplasia cervical (Kjaer y cols., 1988; Villa y cols., 1989). Los resultados de ambos trabajos han sido contradictorios. Kjaer investigó la prevalencia del HPV en dos muestras de mujeres, representativas de las poblaciones de Groenlandia y de Dinamarca, que presentan una diferencia de 6 a 1 en cuanto a tasa de incidencia de cáncer de cérvix. En contra de las expectativas, la población de menor riesgo de cáncer de cérvix (Dinamarca) presentó una prevalencia más elevada de los tipos de "alto riesgo" 16 y 18 de HPV, mientras que la prevalencia de los tipos 6 y 11 resultó igual para ambos territorios. Villa efectuó un estudio con esta técnica, sobre dos muestras de mujeres de dos poblaciones de Brasil con una clara diferencia en la incidencia del cancer de cérvix. Los resultados de este segundo estudio, en contradicción con los del primero, revelaron una mayor presencia del HPV en la población de mayor incidencia del cáncer.

Nosotros investigamos la frecuencia de infección por tipos específicos de HPV en una muestra de mujeres de una población de alto riesgo de cáncer de cérvix (RU), con el propósito de contrastar los resultados con los obtenidos para la

población del PV. La diferencia en cuanto a la frecuencia total de infección por HPV que encontramos en las mujeres del mismo grupo de edad -20 a 30 años- de ambas poblaciones no resultó estadísticamente significativa: en el PV fue del 19%, y en el RU del 23%. La prevalencia de los tipos 16 y 18, considerados como de “alto riesgo”, fue también similar en ambos países (13 y 12%, respectivamente, en el PV, frente a un 17 y 11% en el RU). La distribución de los tipos de “bajo riesgo”, por el contrario, resultó diferente en ambas poblaciones. La prevalencia del HPV 6 fue más alta en las mujeres del RU (21% frente a un 6% en el PV; $p < 0.001$), mientras el HPV 11 fue más frecuente en el PV (10% frente al 0% en UK; $p < 0.05$). Si se consideran estos resultados en relación con las diferentes tasas de incidencia de cáncer de cérvix de ambos países (7,3 por 100.000 en la población del PV frente a 17 por 100.000 en el RU), se comprueba que no existe relación directa entre la prevalencia de los tipos específicos del virus en la población y la tasa de incidencia de cáncer de cérvix.

Nuestros resultados confirman la asociación demostrada en otros estudios entre el HPV y los tumores de cuello uterino (Dürst y cols., 1983; Meanwell y cols., 1987; Schneider y cols., 1987b; Roman and Fife, 1989). La frecuencia de la infección por HPV resultó mayor en las mujeres con lesiones neoplásicas de cérvix que en las mujeres con citología cervical normal. La presencia del DNA del HPV se demostró en el 54% (IC del 95%: 41%-66%) de las muestras de cérvix de mujeres con CIN o cáncer. El HPV 16 resultó ser el genotipo predominante en este grupo: se detectó su presencia en el 43% (IC del 95%: 30%-58%) de las muestras de CIN, y en el 50% (IC del 95%: 23%-77%) de las de cancer.

Se ha cuestionado la especificidad de la asociación entre el HPV 16 y el cáncer de cérvix, y se ha sugerido que la mayor frecuencia de detección de este

genotipo en las muestras de cáncer podría depender de la edad de las pacientes. Meanwell (1987) observó que en su grupo de estudio la frecuencia de HPV 16 aumentaba con la edad, con independencia de que la paciente tuviera cáncer o no. Dado que la edad media de las mujeres con CIN 1, CIN 3 y carcinoma invasivo es de aproximadamente 33, 43 y 52 años, respectivamente (Report of the Task Force., 1976), el autor concluyó que el aparente aumento en la detección del DNA del HPV 16 en estas pacientes, en relación con el grado histológico de la neplasia, era un efecto de la edad. Nuestros resultados no soportan esta posibilidad. Si bien la edad media para las mujeres con CIN 1, CIN 3 y cancer de cérvix fue de 31, 39 y 54 años, respectivamente, la frecuencia de la infección entre las mujeres sin anomalías citológicas decreció de forma progresiva con la edad, por lo que la asociación que demostramos entre el HPV y la neoplasia cervical es específica o, al menos, no mediatizada por la edad.

De los dos casos de adenocarcinoma incluidos en este estudio, uno resultó positivo para HPV 16. Aunque otros autores han detectado el DNA del HPV 16 en muestras de este tumor (de Villiers y cols., 1986), este resultado, sin embargo, no es fácil de interpretar, en vista del marcado tropismo del HPV por el epitelio plano estratificado.

Se ha prestado atención en los últimos años a cierta variedad de tumores cervicales que, por su rápida evolución, escapan a las revisiones citológicas periódicas, y se ha sugerido la posibilidad de que el genotipo 18 de HPV se encuentre implicado en su desarrollo (Berkley y cols., 1980). En un estudio reciente, Barnes (1988) comprobó que el genotipo 18 de HPV se identificaba con mayor frecuencia que el 16 en las muestras de una serie de tumores que se caracterizaron por su comportamiento clínico particularmente agresivo. En el mismo sentido se han interpretado los resultados de algunos estudios, en los que

se observan diferencias en la distribución de los genotipos 16 y 18 en muestras de CIN y de cáncer de cérvix. Boshart (1984) hizo la observación, cuando informó por vez primera sobre el aislamiento y caracterización del HPV 18, que este genotipo estaba presente en el 20% de las muestras de carcinomas cervicales analizadas, mientras que no se identificaba en ninguna de las muestras de CIN. Kurman (1988) detectó la presencia del DNA del HPV 18 en un 22% de los carcinomas invasivos, y únicamente en el 3% de los CIN. No encontró, en cambio, diferencias significativas en la distribución del HPV 16 en ambos tipos de muestras. En base a estas observaciones, este autor argumentó que la baja frecuencia del tipo 18 en las muestras CIN con respecto a las cáncer podría ser la expresión del rápido tránsito de las lesiones CIN asociadas a este genotipo a carcinomas invasivos. Nuestros resultados no apoyan esta conclusión. En ninguna de las muestras de cáncer se detectó la presencia del DNA del HPV 18, mientras que se demostró en el 15% (IC 95%: 4-35%) de las muestras de CIN. El porcentaje de infección por HPV 18 fue mayor, sin embargo, para el grupo de mujeres con lesiones CIN que para el grupo sin anomalías citológicas, pero esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Hemos utilizado la técnica de PCR, ajustada para detectar una secuencia subgenómica de HPV 16, como test confirmatorio de los resultados obtenidos con la técnica de Slot-blot. La correlación en la detección del DNA viral entre ambos test fue satisfactoria: en un 88% de los casos, se obtuvieron los mismos resultados. 5 de las muestras negativas con el Slot blot resultaron positivas con la PCR, lo que resulta coherente con la mayor sensibilidad de esta técnica. Sin embargo, 9 de las muestras positivas con el Slot-blot fueron negativas con la PCR, lo que resulta más difícil de explicar. Se ha demostrado que pueden producirse resultados falsos positivos por hibridación inespecífica de la sonda, cuando hay una elevada concentración de DNA de alguno de los genotipos del virus en la muestra, incluso aunque la reacción de hibridación se haya

desarrollado en condiciones rigurosas (T_m -22°C) (Wickenden y cols., 1987b). Sin embargo, esta explicación no es posible en este caso, ya que sólo se detectó el genotipo 16 de HPV con el Slot-blot. Como explicación alternativa a la anterior, habría que considerar la posibilidad de que se hubieran producido falsos resultados negativos por inhibición de la reacción de PCR. De hecho, se ha identificado un inhibidor de la *Taq-polymerasa* (Franchis y cols., 1988). Sin embargo, este factor es una proteína, y por tanto, debiera haber sido destruido en el proceso de extracción del DNA. No obstante, el alto porcentaje de correlación que se obtuvo entre los resultados de ambos test, y el hecho de que la infección por el virus fuera confirmada en algunas mujeres que fueron analizadas nuevamente algunos meses más tarde, claramente apoyan la fiabilidad de los resultados obtenidos con el Slot-blot.

La tasa de incidencia de cáncer de cérvix de la población del País Vasco -7,3 por cada 100.000 habitantes, ajustada a la población mundial- se encuentra entre las más bajas del mundo. Este hecho no es consecuencia de una política sanitaria de prevención, ya que aun no se ha introducido en nuestro medio un programa nacional de detección precoz del cáncer de cérvix. Por lo tanto, se puede asumir que la baja incidencia es debida a una baja exposición de la población a los factores de riesgo relevantes. Las implicaciones biológicas que derivan del hallazgo del DNA del HPV en un porcentaje importante de las muestras de mujeres del PV con un epitelio cervical aparentemente normal son las siguientes. Por una parte, se puede asumir que el HPV está verdaderamente implicado en la "promoción" o "iniciación" del proceso oncogénico de cérvix y, en este sentido, no es incompatible con la hipótesis el resultado de una alta prevalencia del virus entre la población "normal". En los animales, de forma característica, la infección por los virus oncogénicos (virus de la leucemia murina y de las aves, virus de la enfermedad de Marek de los pollos) está ampliamente extendida en la especie, y puede afectar incluso a la totalidad de sus individuos, con

independencia de la incidencia de la neoplasia (de The, 1977). Determinados virus asociados a tumores humanos, como el Epstein-Barr o el virus de la hepatitis B, adquirirían el potencial oncogénico por la presencia de otros factores, que actúan de forma sinérgica con el virus (Epstein, 1985; Zuckermann, 1985). Estas observaciones ponen de relieve la importancia de los cofactores en el desarrollo del cáncer. Si la asociación que se ha demostrado entre el HPV y el cáncer de cérvix expresara una relación causa-efecto, los resultados de nuestro estudio pondrían de manifiesto la importancia crítica de los cofactores en el proceso oncogénico del cuello uterino. En este sentido, hay datos muy sugestivos acerca de la implicación de varios agentes, como el tabaco (Vessey, 1986), el virus del Herpes Simplex (zur Hausen, 1982), o los anovulatorios orales (Swan y cols., 1981), entre otros, en el proceso de transformación maligna de las células epiteliales.

Por otra parte, hay que considerar como alternativa a la hipótesis anterior, la posibilidad de que la asociación HPV/ cáncer de cervix exprese una relación "casual". La mera presencia de determinados tipos de HPV en las muestras de cáncer de cérvix no demuestra el papel causal del virus en el desarrollo neoplásico. No se puede descartar la posibilidad de que el tejido tumoral sea, por su naturaleza, más susceptible a la infección por el virus, que parece capaz de invadir únicamente las células epitelias indiferenciadas (zur Hausen 1987). En contra de esta hipótesis, sin embargo, y a favor de la relación causal, están los resultados de los estudios "in vitro", que demuestran que los tipos 16 y 18 de HPV modifican las propiedades proliferativas de las células infectadas. En condiciones experimentales, se ha logrado la inmortalización de fibroblastos y queratinocitos humanos mediante la transfección del DNA de varios tipos de HPV (Pirisi y cols., 1988; Woodworth y cols., 1989).

Los estudios prospectivos sobre series de mujeres infectadas tienen la ventaja, con respecto a los estudios sobre series de casos, que permiten la demostración de la presencia del potencial factor de riesgo-el DNA del HPV- antes de que se desarrolle la lesión -CIN o carcinoma invasivo-. De este modo, es posible determinar si la naturaleza de la relación es causal o no. Nosotros efectuamos el seguimiento por un periodo de dos o 3 años de un grupo de 60 mujeres portadoras de los genotipos 16 y 18 de HPV de "alto riesgo" y de un grupo de mujeres portadoras de los genotipos 6 y 11 de "bajo riesgo", junto con un grupo control. Hasta la fecha, 4 de las mujeres portadoras del DNA del HPV 16/18, una portadora del HPV 6/11, y una mujer del grupo control han desarrollado una lesión premaligna. Aunque estos resultados son preliminares, dado el corto periodo de tiempo transcurrido, sugieren que la infección por los genotipos 16/18 condiciona un mayor riesgo de transformación maligna que la infección por los genotipos 6/11 o la no infección. De confirmarse la hipótesis de la relación causal entre el virus y el cáncer de cérvix, el riesgo relativo asociado a la presencia del DNA del HPV 16 sería de 10 para el carcinoma invasor. Los resultados del estudio de seguimiento de mujeres con CIN 1, no sugieren que el HPV se encuentre implicado en la progresión hacia un CIN de grado superior, pero de momento no es posible interpretar estos datos.

Uno de los objetivos de este estudio era comprobar si el número de copias del genoma viral por célula condiciona el potencial progresivo del epitelio cervical infectado. Desde la introducción de la técnica de PCR de alta sensibilidad, se ha planteado la cuestión del significado biológico de la presencia de un número reducido de copias del virus en las células epiteliales. En los tumores invasivos de cérvix se demuestra que el contenido de DNA viral por célula es muy bajo. Las células SiHa, que derivan de un carcinoma de cérvix, contienen solo una o dos copias del DNA del HPV 16 (Pater y Pater, 1988) lo que sugiere la posibilidad de que una única copia del genoma viral pueda inducir el fenotipo maligno. Nosotros no encontramos relación alguna entre el contenido de DNA de los tipos 16 y 18 de las células del epitelio cervical y la evolución hacia una

de los tipos 16 y 18 de las células del epitelio cervical y la evolución hacia una lesión premaligna. Otros acontecimientos son necesarios probablemente para que se produzca la transformación maligna de las células infectadas, como la integración del DNA viral en el genoma de la célula huésped, que trae como consecuencia la expresión de los ORF transformantes E6 y E7 (Schwartz y cols., 1985), o la inactivación de genes celulares supresores de la expresión de los ORF virales (zur Hausen , 1986). En las muestras de carcinomas se demostró un número de copias del virus (HPV 16 y 18) por célula menor que en las muestras de CIN y de tejido cervical normal, resultado que es coherente con la observación de que el DNA del HPV se encuentra generalmente integrado en los cromosomas de las células malignas (Yee y cols., 1985; Schwarz y cols., 1985). Estos resultados indicarían la necesidad de emplear técnicas de detección del HPV de sensibilidad óptima, como la PCR.

Si en futuras investigaciones se confirmara el potencial oncogénico del HPV, el hallazgo del DNA del virus en un 17% de las mujeres “normales” tendría implicaciones para una estrategia preventiva. Una prevención secundaria, dirigida a eliminar la infección en las mujeres portadoras del virus, requeriría la identificación y el tratamiento de miles de mujeres de este país. Hasta el presente, sin embargo, no existe un tratamiento efectivo contra la infección latente por HPV (Ferenczy y cols., 1985). Una estrategia alternativa se basaría en la identificación de las mujeres infectadas por el virus que, además, hubieran estado expuestas al efecto de un aún no identificado co-factor, y que en consecuencia, serían clasificadas como de “alto riesgo” de desarrollar cáncer de cérvix. La estrategia preventiva se centraría en evitar la exposición a tal factor, del mismo modo que se controla la incidencia del carcinoma hepatocelular reduciendo la concentración de aflatoxina en los alimentos, más que inmunizando a la población frente al virus de la hepatitis B (Doll, 1986). Si no fuera posible la identificación de tales cofactores, la prevención se basaría en la

demostración de la infección por el virus, y en el seguimiento estrecho de las mujeres mediante revisiones citológicas periódicas.

En la actualidad, la detección precoz del cáncer de cuello uterino se basa en el estudio citológico de las muestras de cérvix. Aunque es el método clínico de mayor sensibilidad para el diagnóstico de las lesiones preneoplásicas de cérvix, su eficacia para la identificación de la infección por HPV es muy limitada. El HPV interacciona con el proceso normal de queratinización del epitelio, e induce una serie de "efectos citopáticos", específicos e inespecíficos de la infección, que pueden ser identificados en las muestras citológicas (Purola y Savia, 1977; Croissant y cols., 1985). Nosotros identificamos los signos patognomónicos de infección por HPV -coilocitos y células disqueratósicas- unicamente en el 14% de las mujeres en las que se demostró la presencia del DNA del virus, mediante el test Slot-blot de hibridación. Según los resultados de otros grupos, hasta un 38% de las mujeres asintomáticas son portadoras del DNA del HPV, sin que se produzcan cambios citológicos evidentes (Toon y cols., 1986; de Villiers y cols., 1987; Murdoch y cols., 1988; Reeves y cols., 1989). Estos datos indican que la sensibilidad de los marcadores citológicos "específicos" de infección por HPV es baja, y se encuentra probablemente entre el 5 y el 25%.

En un intento de mejorar la sensibilidad del test citológico en la identificación de la infección por HPV, investigamos la utilidad de varios de los marcadores citológicos "inespecíficos". Nuestros resultados demuestran que, aunque ninguno de estos signos es patognomónico de la infección, la presencia de varios de ellos en las muestras citológicas se correlaciona significativamente con la presencia del DNA del HPV. Mediante la evaluación de estos signos, se consiguió identificar hasta un 65% de las mujeres portadoras del DNA del virus, con una especificidad aproximada del 80%. En los últimos años se han desarrollado varios test de detección de DNA que permiten la identificación de la

infección subclínica por HPV del epitelio cervical. Aunque estas técnicas son las más sensibles para la demostración de la infección, no resulta posible su aplicación para diagnóstico de rutina, debido a su complejidad y alto costo. Los signos citológicos inespecíficos de infección por HPV podrían proporcionar claves para la selección de un subgrupo de pacientes con alta probabilidad de estar infectadas, a las que se aplicaría un test de detección de DNA para confirmar la infección.

Hemos demostrado que la prevalencia de la infección por papilomavirus es elevada en una muestra de mujeres representativa de la población del País Vasco, y que un alto porcentaje de las mujeres sin anomalías citológicas son portadoras de los genotipos 16 y 18 de HPV, considerados de "alto riesgo". Aunque este resultado no sea incompatible con la hipótesis del papel etiológico del HPV en el cáncer de cérvix, demuestra la necesidad de nuevas investigaciones sobre la historia natural de la infección y, en particular, de estudios prospectivos sobre la relación entre el HPV y el cáncer de cérvix que permitan, además, la identificación de los cofactores que actúan sinérgicamente con el virus en la inducción del fenotipo maligno de las células epiteliales cervicales.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1) La tasa de prevalencia de infección por papilomavirus humano en una población que presenta una baja incidencia de cáncer de cérvix es del 17%.
- 2) Los genotipos 16 y 18 de papilomavirus, considerados como de alto riesgo, son los más frecuentes entre las mujeres sin anomalías citológicas. La tasa de prevalencia para cada uno de ellos es del 11%, frente a un 7 y un 11% para los genotipos 6 y 11, respectivamente.
- 3) La tasa de prevalencia de infección por papilomavirus se correlaciona con la edad. La más elevada corresponde al grupo de mujeres entre 15 y 20 años, y decrece progresivamente hasta estabilizarse para las mujeres de 30 años en adelante.
- 4) La prevalencia del DNA del papilomavirus en las muestras de lesiones neoplásicas de cérvix, analizadas con técnicas de detección génica, es mayor que en las muestras de tejido cervical normal. El genotipo 16 de HPV es el más frecuente.
- 5) Se obtienen resultados similares mediante la técnica de PCR y mediante el test de hibridación Slot-blot en una proporción elevada de las muestras analizadas. Esta observación confirma la fiabilidad de los resultados de prevalencia obtenidos mediante el test Slot-blot.

6) No se demuestra una correlación directa entre la prevalencia de infección por papilomavirus y la incidencia de cáncer de cérvix de la población. Si el papilomavirus estuviera definitivamente implicado en el proceso de transformación maligna del epitelio cervical, esta observación pondría de manifiesto la importancia crítica del papel de los cofactores en el proceso oncogénico.

7) Hay indicios objetivos sobre la existencia de un riesgo de transformación del epitelio cervical infectado por los genotipos 16 y 18 de papilomavirus. Sin embargo, no se demuestra una correlación entre el contenido de DNA viral por célula y el riesgo de transformación del epitelio cervical.

8) La sensibilidad del diagnóstico citológico de la infección por papilomavirus, basado en la identificación de los signos citológicos patognomónicos de la infección, es del 15%, con relación a las técnicas de detección de DNA.

9) La presencia de determinados signos citológicos inespecíficos se correlaciona de forma significativa con la presencia del DNA del papilomavirus en las muestras citológicas de cérvix. Mediante la evaluación de estos signos, es posible aumentar la sensibilidad del diagnóstico citológico de la infección por papilomavirus.

BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER E.R. Possible etiologies of cancer of the cervix other than herpes virus. *Cancer Res.*, **33**, 1485-1490 (1973).

ANDERSON M.L.M., YOUNG B.B. Quantitative filter hybridisation. In: Hames BD, Higgins SJ (eds), *Nucleic Acid Hybridisation; A practical Approach*, 73. IRL Press (1985).

ARENDS M.J., WYLLIE A.H., BIRD C.C. Papillomavirus and Human Cancer. *Hum Pathol*, **21**: 686-698 (1990).

BAIRD P.J. Serological evidence for the association of papillomavirus and cervical neoplasia. *Lancet*, **2**, 17-18 (1983).

BARNES W., DELGADO G., KURMAN R.J., PETRILLI E.S., SMITH D.M., AHMED S., LORINCZ A.T., TEMPLE G.F., JENSON A.B., LANCASTER W.D. Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Ginecol. Oncol.*, **29**, 267-273 (1988).

BARR B.B.B, BENTON E.C., Mc LAREN K. Human papillomavirus infection and skin cancer in renal allograft recipients. *Lancet*, **1**, 124-129 (1989).

BEAUDENON S., KREMSDORF D., CROISSANT O., JABLONSKA S., WAIN-HOBSON S., ORTH G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature*, **321**, 246-249 (1986).

BEAUDENON S., KREMSDORF D., OBALEK S., JABLONSKA S., PEHAU-ARNAUDET G., CROISSANT O., ORTH G. Plurality of genital human papillomaviruses: Characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology*, **161**, 374-384 (1987).

BERAL V. Cancer of the cervix: sexually transmitted infection. *Lancet*, **i**, 1037-1040 (1984).

BERCKLEY A.S., LIVOLSI V.A., SCHWARTZ P.E. Advanced squamous cell carcinoma of the cervix with recent normal Papanicolaou tests. *Lancet* **2**: 375 (1980).

BERGERON C.A., FERENCZY A., SHAH K.V., NAGHASFAR Z. Multicentric human papillomavirus infections of the female genital tract: Correlation of viral types with abnormal mitotic figures, colposcopic presentation, and location. *Obstet. Gynecol.*, **69**, 736-742 (1987).

BOSHART M., GISSMANN L., IKENBERG H., KLEINHEINZ A., SCHEURLLEN W., zur HAUSEN H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO*, **3**, 1151-1157 (1984).

- BOWLES N.E., RICHARDSON P.J., OLSEN E.G.J., ARCHARD L.C. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*, **1**, 1120-1123 (1986).
- BRANDSMA J.L., STEINBERG B.M., ABRAMSON A.L., WINKLER B. Presence of human papillomavirus type 16 related sequences in verrucous carcinoma of the larynx. *Cancer Res.*, **46**, 2185-2188 (1986).
- BUCKLEY C.H., BUTLER E.B., FOX H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J. Clin. Pathol.*, **35**, 1-13 (1982).
- BUTEL J.S. Studies with human papillomavirus modelled after known papovavirus systems. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**, 285-299 (1972).
- CAMPO M.S., MOAR M.H., SARTIRANA M.L., KENNEDY I.M., JARRETT W.F.H. The presence of bovine papillomavirus type 4 DNA is not required for the progression to, or the maintenance of, the malignant state in cancers of the alimentary canal in cattle. *EMBO*, **4**, 1819-1825 (1985).
- CHAN W.K. KLOCK G. BERNARD H.U. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol.*, **63**, 3261-3269 (1989).
- CHEN E.Y., HOWLEY P.M., LEVENSION A.D., SEEBURG P.H. The primary and genetic organisation of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*, **299**, 529-534 (1982).
- CHIN M.T., HIROCHIKA R., HIROCHIKA H., BROKER T.R., CHOW L.T. Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: functional and biochemical studies. *J. Virol.*, **62**, 2991-3002 (1988).
- CHOO K.B., PAN C.C., HAN S.H. 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*, **161**, 259-261 (1987).
- COGGIN J., zur HAUSEN H. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res.*, **39**, 545-546 (1979).
- COLE S.T., DANOS O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J. Mol. Biol.*, **193**, 599-608 (1987).
- COLEMAN D.V., RICHMAN P.I. Human papillomavirus infection and cancer

of the uterine cervix. *J. Pathol.*, **145**, 207-212 (1985).

CORBITT G., ZAROD A.P., ARRAND J.R., LONGSON M., FARRINGTON W.T. Human papillomavirus (HPV) genotypes associated with laryngeal papilloma. *J. Clin. Pathol.*, **41**, 284-288, (1988).

CORNELISSEN M.T.E., van der VELDEN K.J., WALBOOMERS J.M.M., BRIET M.A., SMITS H.L., van der NOORDAA J., ter SCHEGGET J. Evaluation of different DNA-DNA hybridisation techniques in detection of HPV 16 DNA in cervical smears and biopsies. *J. Med. Virol.* **25**: 105-114 (1988).

CROISSANT O., BREITBURD F., ORTH G. Specificity of cytophatic effect of cutaneous human papillomaviruses. In: Jablonska S., Orth G. (eds), *Clinics in dermatology*. Philadelphia: Lippincott, 43-55 (1985).

CRUM C.P., IKENBERG H., RICHART R.M., GISSMAN L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N. Engl. J. Med.*, **310**, 880-883 (1984).

CRUM C.P., MITAO M., LEVINE R.U., SILVERSTEIN S.J. Cervical papillomavirus segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J. Virol.*, **54**, 675-681 (1985).

CUBIE H.A. Experiments with human papilloma virus in cell culture. *Br. J. Dermatol.*, **91**, 569-571 (1974).

DANOS O., ENGEL L.W., CHEN E.I., YANIV M., HOWLEY P.M. Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J. Virol.*, **46**: 557-566 (1983).

DEKMEZIAN R., CHEN X., KUO T., ORDONEZ N., KATZ R. DNA hybridization for human papillomavirus (HPV) in cervical lesions. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**, 22-27 (1987).

de THE G. Viruses as causes of some human tumours? Results and prospectives of the epidemiologic approach. En: H.H. Hiatt, J.D. Watson and J.A. Winsten (eds). *Origins of Human Cancer*; Book B (Cold Spring Harbor Conference on Cellular proliferation, Vol 4), pp: 1113-1128. Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1977).

de VILLIERS E.M., GISSMANN L., zur HAUSEN H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol.*, **40**, 932-935 (1981).

de VILLIERS E.M., NEUMANN C., LE J.Y., WEIDAUER H., zur HAUSEN H. Infection of the oral mucosa with defined types of human papillomaviruses. *Med. Microbiol. Immunol.* (Berlín), **174**, 287-294 (1986a).

de VILLIERS E.M., SCHNEIDER A., GROSS G., zur HAUSEN H. Analysis of benign and malignant urogenital tumours for human papillomavirus infection by labelling cellular DNA. *Med. Microbiol. Immunol.*, **174**, 281-286 (1986b).

de VILLIERS E.M., WAGNER D., SCHNEIDER A., WESCH H., MIKLAW H., WAHRENDORF J., PAPENDICK U., zur HAUSEN H. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet*, **ii**, 703-705 (1987).

Di PAOLO J.A., WOODWORTH C.D. POPESCU N.C., NOTARIO V., DONIGER J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey *ras*. *Oncogene*, **4**, 395-399 (1989).

DOLL R. Implications of epidemiological evidence for future progress. *The Barbury Report* **21**, 321-326 (1986).

DOMAN S.P., WONG F.W., LAU E.M., TAKASHI K., ESTEVE J. Reproductive and sexual risk factors and human papillomavirus infection in cervical cancer among Hong Kong Chinese. *Int. J. Cancer*, **18**, 26-32 (1989).

DÜRST M., DZARLIEVA-PETRUSEVSKA R.T., BOUKAMP P., FUSENIG N.E., GISSMANN L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene*, **1**, 251-256 (1987).

DÜRST M., GISSMANN H., 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*, **80**, 3812-3815 (1983).

DÜRST M., KLEINHEINZ A., OTZ M., GISSMANN L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J. Gen. Virol.*, **66**, 1515-1522 (1985).

EISINGER M., KUCAROVA O., SARKAR N.H., GOOD R.A. Propagation of human wart virus in tissue culture. *Nature*, **256**, 432-434 (1975).

EPSTEIN M.A. Intervention against EB virus-associated tumours. En: P.W.J. Rigby and N.M. Wilkie (eds), *Viruses and Cancer*, pp: 111-123. Cambridge University Press, Cambridge (1985).

FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).

FERENCZY A. In: Blaustein A (eds), *Pathology of the female genital tract*. Ch. 9, pp: 266-267 Raven Press (1977).

FERENCZY A., BRAUN L., SHAH K.V. Human papillomavirus (HPV) in condylomatous lesions of cervix. A comparative ultrastructural and immunohistochemical study. *Am. J.Surg. Pathol.*, **5**, 661-670 (1981).

FERENCZY A., MITAO M., NAGAI N., SILVERSTEIN S.J. CRUM O.P. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N. Eng. J. Med.* **313**: 784-788 (1985).

FIGUEIREDO H.T., MALCOLM A.D.B. A luminescent detection system for non-radioactively labelled DNA probes. *Biochem. Soc. Trans.*, **14**, 640 (1986).

FRANCESCHI S., DOLL R., GALLWEY J., La VECCHIA C., PETO R., SPRIGGS A.I. Genital warts and cervical neoplasia: an epidemiological study. *Br.. J. Cancer*, **48**, 621-628 (1983).

FRANCHIS, R.D., NSFOLKEF, N.C.P., and COX, T.M.: A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 16-10355 (1988) CRAWFORD L. Papilloma viruses and cervical tumours. *Nature*, **310**: 16 (1984)

FUCHS P.G., GIRARDI F., PFISTER H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int. J. Cancer.*, **41**, 41-45 (1988).

GALLOWAY D.A., Mc DOUGALL J.K. The oncogenic potential of Herpes simplex virus: Evidence for a " Hit and Run" mechanism. *Nature*, **302**, 21-24 (1983).

GASSENMAIER A., LAMMEL M., PFISTER H. Molecular cloning and characterization of the DNAs of human papillomaviruses 19, 20, and 25 from a patient with epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.*, **52**, 1019-1023 (1984).

GILLESPIE D., SPIEGELMAN S. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.*, **12**, 829-842 (1965).

GISSMANN L., BOSCHART M., DÜRST M., IKENBERG H., WAGNER D., zur HAUSEN H. Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 26-28 (1984).

GISSMANN L., de VILLIERS E.M., zur HAUSEN H. Analysis of human genital warts (*Condylomata Acuminata*) and other genital tumors for human

- papillomavirus type 6 DNA. *Int. J. Cancer*, **29**, 143-146 (1982b).
- GISSMANN L., DIEHL V., SCHULTZ-COULON H.J., zur HAUSEN H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J. Virol.*, **44**, 393-400 (1982a).
- GISSMANN L., SCHNEIDER A. Human papillomavirus DNA in preneoplastic and neoplastic genital lesions. In: Peto R, zur Hausen H (eds), *Origins of female genital cancer : Virological and epidemiological aspects*, pp: 217-224. Banbury Report. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory (1986).
- GISSMANN L., WOLNIK L., IKENBERG H., KOLDOVSKY U., SCHNÜRCH H.G., zur HAUSEN H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 560-563 (1983).
- GISSMANN L., zur HAUSEN H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *Int. J. Cancer*, **25**, 605-609 (1980).
- GRODY W.W., CHENG L., LEWIN K.J. In situ viral DNA hibridization in diagnostic surgical pathology. *Hum. Pathol.*, **18**, 535-543 (1987).
- GUPTA J.W., GUPTA P.K., ROSENSHEIN N., SHAH K.V. Detection of human Papillomavirus in cervical smears. A comparison of in situ hybridization, immunocytochemistry and cytopathology. *Acta Cytol.*, **31**, 387-396 (1987).
- HAMPAR B., ELLISON S.A. Cellular alterations in the MCH lines of chinese hamster cells following infection with Herpes simplex virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **49**: 474-477 (1963).
- HANAHAN D. Techniques for transformation of "E.coli". In: Glove DM, (eds.), *DNA cloning*, **1**, 109-135 (1985).
- HARRIS R.W.C., FORMAN D., DOLL R., VESSEY M.P., WALD N.J. Cancer of the cervix uteri and vitamin A. *Br. J. Cancer*, **53**, 653-659 (1986).
- HENNING W. In situ hybridisation of nucleic acids. *TIBS*, **5**, 114 (1980).
- HEYDERMAN E. Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J. Clin. Pathol.*, **32**, 971-978 (1979).
- HORDING U., IVERSEN A.K.N., SEBBELOV A., BOCK J.E., NORRILD B. Prevalence of human papillomavirus types 11, 16 and 18 in cervical swabs. A study of 1362 pregnant women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **35**: 191-198 (1990). ISH-HOROWICZ D., BURKE J.F. Rapid and efficient cosmid

cloning. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2989-2992 (1981).

JARRETT W.F.H., McNIEL P.E., LAIRD H.M. In: Essex M, Todaro G, zur Hausen H (eds), *Viruses in naturally occurring cancers*. Vol. A, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1980).

JENKINS D., TAY S.K., McCANCE D.J., CAMPION M.J., CLARKSON P.K., SINGER A. Histological and immunocytochemical study of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) with associated HPV 6 and HPV 16 infection. *J. Clin. Pathol.*, **39**, 1177-1180 (1986).

KAUFMAN R.H., BORNSTEIN J., ADAN E., BUREK J., TESSIN B., ADLER-STORHIZ K. Human papillomavirus and herpes simplex virus in vulvar squamous cell carcinoma in situ. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **158**, 862-871 (1988).

KJAER S.K., DE VILLIERS E.M., HAUGAARD B.J., CHRISTENSEN R.B., TEISEN, MOLLER K.A., POLL P., JENSEN H., VESTERGAARD B.J., LYNGE E., JENSEN O.M. Human papillomavirus, herpes simplex virus and cervical cancer incidence in Greenland and Denmark. A population-based cross-sectional study. *Int. J. Cancer*; **41**, 518-524 (1988).

KLEIN G. The role of gene dosage and genetic transposition in carcinogenesis. *Nature*, **294**, 313 (1981).

KOCHEL H.G., TEICHMANN A., ECKARDT N., ARENDT N., KUHN W., THOMSENN R. Occurrence of human papillomavirus DNA types 16 y 18 (HPV 16/18) in cervical smears as compared to cytological findings. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **31**: 145-152 (1990)

KREMSDORF D., FAVRE M., JABLONSKA S., OBALEK S., RUEDA L.A., LUTZNER M.A., BLANCHET-BARDON C., van VOORST VADER P.C., ORTH G. Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papillomavirus types associated with epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.*, **52**, 1013-1018 (1984).

KULSKI J.K., HOWARD M.J., PIXLEY E.C. DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16 or 18 in invasive cervical carcinoma of Western Australian women. *Immunol. Cell Biol.*, **65**, 77-84 (1987).

KUNKEL L.M., SMITH K.D., BOYER S.H., BORGAONKAR D.S., WACHTEL S.S., MILLER O.J., BREG W.R., JONES H.W. RARY J.M. Analysis of human Y Chromosome specific reiterated DNA in chromosomal variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1245-1249 (1977).

KURMAN R.J., SCHIFFMAN M.H., LANCASTER W.D., REID R., JENSON A.B., TEMPLE F., LORINCZ A.T. Analysis of individual human

Papillomavirus types in cervical neoplasia: A possible role for type 18 in rapid progression. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **159**, 293-296 (1988).

KURMAN R.J., SHAH K.H., LANCASTER W.D., BENNETT JENSON A. Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condylomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **140**, 931-935 (1981).

LEHN H., KRIEG P., SAUER G. Papillomavirus genomes in human cervical tumours: analysis of their transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5540-5544 (1985).

LONING T., IKENBERG H., BECKER J. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J. Invest. Dermatol.*, **84**, 417-420 (1985).

LORINCZ A.T., QUINN A.P., LANCASTER W.D., TEMPLE G.F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology*, **159**, 187-190 (1987).

LORINCZ A.T., LANCASTER W.D., TEMPLE G.F. Cloning and characterization of the DNA of a new human Papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.*, **58**, 225-229 (1986).

LOWY D.R., DVORETZKY I., SHOBER R., LAW M.F., ENGEL L., HOWLEY P.M. In vitro tumorigenic transformation by a defined sub-genomic fragment of bovine papilloma virus DNA. *Nature*, **287**, 72-74 (1980).

MACNAB J.C.M., WALKINSHAW S.A., CORDINER J.W., CLEMENTS J.B. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *N.Engl.J. Med.*, **315**, 1052-1058 (1986).

MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1982).

Mc CANCE D.J., CAMPION M.J., CLARKSON P.K., CHESTERS .P.M., JENKINS D., SINGER A. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **92**, 1101-1105 (1985).

Mc CANCE D.J., KALACHE A., ASHDOWN K., ANDRADE F., MENEZES F., SMITH P., DOLL R. Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int. J. Cancer*, **37**, 55-59 (1986).

Mc CANCE D.J., KOPAN R., FUCHS E., LAIMINS L.A. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7169-7173 (1988).

MEANWELL C.A., BLACKLEDGE G., COX M.F. and MAITLAND N.J. HPV 16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: Implications for the aetiology and behaviour of cervical neoplasia. *Lancet*, **1**, 703-707 (1987).

MEISELS A., FORTIN R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol.*, **20**, 505-509 (1976).

MEISELS A., FORTIN R., ROY M. Condylomatous lesions of the cervix II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol* **21**: 379-390 (1977).

MEISELS A., MORIN C, CASAS-CORDERO M. Human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, **1**, 75-94 (1982).

MESSING J., GRONENBORN B., MÜLLER-HILL B., HANS HOFSCHEIDER P. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a Hind II fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* , **74**, 3642-3646 (1977).

MILLAN D.W.M., DAVIS J.A., TORBET T.E., CAMPO M.S. DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16 and 18 in lesions of the uterine cervix in the west of Scotland. *Br. Med. J.*, **293**, 93-96 (1986).

MUÑOZ N., BOSCH F.X. Epidemiology of cervical cancer. In: Muñoz N, Bosch FX, Jensen OM (eds), *Human papillomavirus and cervical cancer*, pp: 9-39. IARC Scientific Publication, Lyon (1989).

MURDOCH J.B., CASSIDY L.J., FLETCHER K., CORDINER J.B., MCNAB J.C.M. Histological and cytological evidence of viral infection and human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and normal tissue in the west of Scotland: evaluation of treatment policy. *Br. Med. J.* **296**: 381-385 (1988).

NAGHASHFAR Z.S., ROSENSHEIN N.B, LORINCZ A.T., BUSCEMA J., SHAH K.V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J. Gen.Virol.*, **68**, 3073-3079 (1987).

NAGHASHFAR Z., SAWADA E., KUTCHER M.J., SWANCAR J., GUPTA J., DANIEL R., KASHIMA H., WOODRUFF J.D., SHAH K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J. M.Virol.*, **17**, 131-324 (1985).

NAHMIAS A.J., NAIB Z.M., JOSEY W.E. Epidemiological studies relating genital herpetic infection to cervical carcinoma. *Cancer Res.*, **34**, 1111-1117 (1974).

NAHMIAS A.J., SAWANABORI S. The genital herpes-cervical cancer

- hypothesis 10 years later. *Prog.Exp.Tumor Res.*, **21**, 117-139 (1978).
- NAIB Z.M., NAHMIAS A.J., JOSEY W.E. Cytology and histopathology of cervical herpes simplex infection. *Cancer*, **19**, 1026-1031 (1966).
- NAKANE P.K., KAWAOI A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084-1091 (1974).
- NUOVO G.J., CRUM C.P., de VILLIERS E.M., KLEVINE R.U., SILVERSTEIN S.J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical carcinoma. *J. Virol.*, **62**: 1452-1455 (1988).
- NUOVO G., CRUM C.P., SILVERSTEIN S. Papillomavirus infection of the uterine cervix. *Micro. Pathol.* **3**: 73-81 (1987).
- NYGAARD A.P., HALL B.D. A method for the detection of RNA:DNA complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 98-104 (1963).
- ORTH G. Epidermodysplasia verruciformis. In: Salzman NP, Howley PM (eds), *The papovaviridae*, **2**, pp: 199-243. The papillomaviruses, New York, NY, Plenum (1987).
- PARDUE M.L., GALL J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 600-604 (1969).
- PARKIN D.M., LÄÄRÄ E., MUIR C.S. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int. J. Cancer*, **41**, 184-197 (1988).
- PATER M.M., DUNNE J., HOGAN G., GHATAGE P., PATER A. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in early cervical neoplasia. *Virology*, **155**, 13-18 (1986).
- PATER M.P., PATER A. Expression of human papillomavirus types 16 y 18 DNA sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Med. Virol.* **26**: 185-195 (1988).
- PETTERSON U., AHOLA H., STENLUND A., BERGMAN P., USTAVS M., MORENO-LOPEZ J. Organisation and expression of the genome of bovine papillomavirus type 1. In: *Papillomaviruses*, Ciba Foundation Symposium **120**, 23-38 (1986).
- PFISTER H. Human papillomaviruses and genital cancer. *Adv. Cancer Res.*, **48**, 113-147 (1987).
- PFISTER H., KRUBKE J., DIETRICH W., IFTNER T., FUCHS P.G. Classification of the papillomaviruses mapping the genome. In:

- Papillomaviruses, Ciba Foundation Symposium, **120**, pp: 3-22. (1986).
- PIRISI L., CREEK K.E., DONIGER J., DiPAOLO J.A. Continuous cell lines with altered growth and differentiation properties originate after transfection of human keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *Carcinogenesis*, **9**, 1573-1579 (1988).
- POPESCU N.C., DIPAOLLO J.A. Preferential Sites for Viral Integration on Mammalian Genoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **42**, 157-171 (1989).
- PUROLA E. SAVIA E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol.* **21**, 26-31 (1977).
- REEVES W.C., BRINTON L.A., GARCIA M. BRENES M.M., HERRERO R., GAITAN E. TENORIO F.C., de BRITTON R., RAWLS W.E. Human papillomavirus infection and cervical cancer in latin america. *N. Engl. J. Med.*, **320**: 1437-1441 (1989).
- REEVES W.C. CAUSSY D., BRINTON L.A., BRENES M.M., MONTALVAN P., GOMEZ B., de BRITTON R.C., MORICE E., GAITAN E., LOO de LAO S., RAWLS W.E. Case-control study of human papillomaviruses and cervical cancer in latin america. *Int. J. Cancer*, **40**, 450-454 (1987).
- REPORT OF THE TASK FORCE appointed by the Conference of Deputy Ministers of Health. The Walton Report. Cervical cancer screening programmes I. Epidemiology and natural history of carcinoma of the cervix. *Can. Med. Assoc. J.* **114**: 1003-33 (1976).
- RIGBY P.W.J., DIECKMANN M., RHODES C., BERG P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **113**, 237-251 (1977).
- RIOU G., BARROIS M., LE M. C-myc proto-oncogene expression and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Lancet*, **1**, 761-763 (1987).
- RIOU G., BARROIS M., TORDJMAN I., DUTRONQUAY V., ORTH G. Presence de genomes de papillomavirus et amplification des oncogenes *c-myc* et *c-ha-ras* dans des cancers envahissants du col de l'uterus. *C. R. Acad. Sci. III*, **299**, 575-580 (1984).
- ROBERTS R.J. Restriction endonucleases. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, November, 123-164 (1976).
- ROBERTSON A.J., ANDERSON J.M., SWANSON BECK J., BURNETT R.A., HOWATSON S.R., LEE F.D., LESSELLS A.M., McLAREN K.M., MOSS S.M., SIMPSON J.G., SMITH G.D., TAVADIA H.B., WALKER F. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens.

J. Clin. Pathol., **42**, 231-238 (1989).

ROMAN A., FIFE KH. Human papillomaviruses: Are we ready to type?. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, 166-190 (1989).

ROWSON K.E.K., MAHY B.W.J. Human papova (wart) virus. *Bacteriol. Rev.*, **31**, 110-131 (1967).

SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restrictions site analysis for diagnosis of sickel cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354 (1985).

SASSON I.M., HALEY N.J., HOFFMANN D. Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix: smoke constituents in cervical mucus. *N. Engl. J. Med.*, **312**, 315 (1985).

SCHNEIDER A., KAY S., LEE H.M. Immunosuppression as a high risk factor in the development of condyloma acuminatum and squamous neoplasia of the cervix. *Acta Cytol.*, **27**: 220-223 (1982).

SCHNEIDER A., KRAUS H., SCHUHMANN R., GISSMANN L. Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Int.J. Cancer*, **35**, 443-448 (1985).

SCHNEIDER A.S., MEINHART G., DE-VILLIERS E.M., GISSMANN L. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV DNA hybridization studies. *Diagnos. Cytopath.*, **3**:250-255 (1987a).

SCHNEIDER A., SAWADA E., GISSMANN L., and SHAH K. Human papillomavirus in women with a history of abnormal Papanicolaou smears and their male partners. *Obstetrics. Gynecology*, **69**, 554-562 (1987b).

SCHWARTZ E., DURTS M., DEMANKOWSKI C. DNA sequence and organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J*, **2**, 2341-2348 (1983).

SCHWARZ E., FREESE U.K., GISSMANN L., MAYER W., ROGGENBUCK B., STRENISLAU A., zur HAUSEN H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, **314**, 111-114 (1985).

SEED B. In: Hollender A., Setlow J. (eds), *Genetic Engineering*, **4**, 91-102. Plenum Press (1982).

SEEDORF K.G., KRAMMER M., DURST M. Human papillomavirus type 16 DNA sequences. *Virology*, **145**, 181-185 (1985).

- SHMAUZ R., OKONG P., DE VILLIERS E.M., DENNIN R., BRADE L., LWANGA S.K., OWOR R. Multiple infections in cases and cervical cancer from a high-incidence area in tropical Africa. *Int. J. Cancer*, **43**, 805-809 (1989).
- SHOPE R.E. Infectious papillomatosis of rabbits. *J. Exp. Med.*, **58**, 607-624 (1933).
- SINGER A. Sex and genital cancer in heterosexual women. *J. Rep. Med.*, **28**, 10 (1982).
- SMITH H.O. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science*, **205**, 455-462 (1979).
- SMOTKIN D., WETTSTEIN F.O. The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *Virology*, **61**, 1686-1689 (1987).
- SOUTHERN E.M. Detection of specific sequences among DNA Fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- STANBRIDGE C.M., MATHER J., CURRY A., BUTLER E.B. Demonstration of papilloma virus particles in cervical and vaginal scrape material: a report of 10 cases. *J. Clin. Pathol.*, **34**, 524-531 (1981).
- STEINBERG B.M. Laryngeal papillomatosis is associated with a defect in cellular differentiation. In: Evered D, Clark S (eds), *Papillomaviruses*. Ciba Foundation Symposium no. 120, pp: 208-216. London, England, Pitman, (1986).
- STOREY A., PIM D., MURRAY A., OSBORNE K., BANKS L., CRAWFORD L. Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J*, **7**, 1815-1820 (1988).
- STRAUSS M.J., SHAW E.W., BUNTING H., MELNICK J.L. "Crystalline" virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **72**, 46-50 (1949).
- SUTTON G.P., STEHMAN F.B., EHRLICH C.E., ROMAN A. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in lesions of the female genital tract: evidence for type 6/11 in squamous carcinoma of the vulva. *Obstet. Gynecol.*, **70**, 564-568 (1987).
- SWAN S.H., BROWN W.L. Oral contraceptive use, sexual activity, and cervical carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **139**, 52-57 (1981).

SYRJÄNEN K., HAPPONEN R.P., SYRJÄNEN S., CALONIUS B. Human papillomavirus (HPV) antigens and local immunological reactivity in oral squamous cell tumours and hyperplasias. *Scand. J. Dent. Res.*, **92**, 358-370 (1984).

SYRJÄNEN K., SYRJÄNEN S. Concept of the existence of human papillomavirus (HPV) DNA in histologically normal squamous epithelium of the genital tract should be re-evaluated. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **68**, 613-617 (1989).

TOON P.G., ARRAND J.R., WILSON L.P., SHARP D. Human papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia. *Br. Med. J.*, **293**, 1261-1264 (1986).

TSUNOKAWA Y., TAKEBE N., NOZAWA S., KASAMATSU T., GISSMANN L., zur HAUSEN H. TERADA M., SUGIMURA T. Presence of human papillomavirus type-16 and type-18 DNA sequences and their expression in cervical cancers and cell lines from Japanese patients. *Int. J. Cancer*, **37**, 499-503 (1986).

van den BRULE S., SNIJDERS P.J.F., GORDIJN R.L.J., BLEKER O.P., MEIJER C.J.L.M., WALBOOMERS J.M.M. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int. J. Cancer*, **45**, 644-649 (1990).

VESSEY M.P. Epidemiology of cervical cancer. Role of hormonal factors, cigarette smoking and occupation. In: Peto R, zur Hausen H (eds), *Origins of female genital cancer: Virological and epidemiological aspects*, pp: 29-43. Banbury Report. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor press (1986).

VILLA L.L., FRANCO E.L.F. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in symptomatic women in Brazil. *J Natl. Cancer Inst.*; **81**, 332-340 (1989).

VONKA V., KANKA J., HIRSCH I., ZAVADOVA H., KROMAR M., SUCHANKOVA A., REZACOVA D., BROUCEK J., PRESS M., DOMORAZKOVA E., SVOBODA B., HAVRANKOVA A., JELINEK J. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus. II. Herpes simplex type-2 antibody presence in sera taken at enrolment. *Int. J. Cancer*, **33**, 61-66 (1984).

WAHL G.M., STERN M., STARK G.R. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl paper and rapid hybridisation using dextran sulphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3683-3687 (1979).

- WALKER P.G., SINGER A. DYSON J.L., SHAH K.V., TO A. COLEMAN D.V. The prevalence of human papillomavirus antigen in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer*, **48**, 99-101 (1983).
- WARD P., COLEMAN D.V., MALCOLM A.D.B. Regulatory mechanism of the papillomaviruses. *Trends in Genet.*, **5**, 97-99 (1989).
- WARD P., PARRY G.N., YULE R., COLEMAN D.V., MALCOLM A.D.V. Human papillomavirus subtype 16a. *Lancet*, **i**: 170 (1989).
- WATTS S.L., PHELPS W.C., OSTROW R.S. Cellular transformation by human papillomavirus DNA in vitro. *Science*, **225**, 634-636 (1984).
- WEBB D.H., ROGERS R.E., FIFE K.H. A one-step method for detecting and typing human papillomavirus DNA in cervical scrape specimens from women with cervical dysplasia. *J. Infect. Dis.*, **156**, 912-919 (1987).
- WELLS M., ROBERTSON S., LEWIS J., DIXON M.F. Squamous carcinoma arising in a giant peri-anal condiloma associated with human papillomavirus types 6 and 11. *Histopathology*, **12**, 319-323 (1988).
- WICKENDEN C., COLEMAN D.V., EVANS B., MALCOLM A.D.B. Cross-hybridisation of human papillomavirus DNA on filters. *J. Virol. Meth.*, **15**, 249-255 (1987b).
- WICKENDEN C., MALCOLM A., BYRNE M., SMITH C., ANDERSON C., COLEMAN D.V. Prevalence of HPV DNA and viral copy numbers in cervical scrapes from women with normal and abnormal cervixes. *J. Pathol.*, **153**, 127-135 (1987a).
- WICKENDEN C., MALCOLM A.D.B. STEELE A., COLEMAN D.V. Screening for wart virus infection in normal and abnormal cervixes by DNA hybridisation of cervical scrapes. *Lancet*, **1**, 65-67 (1985).
- WOODWORTH C.D., DONIGER J., DIPAOLO J.A. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs correspond to their association with cervical carcinoma. *J. Virol.* **63**: 159-164 (1989).
- YASUMOTO S., BURKHARDT A.L., DONIGER J., DIPAOLO J.A. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virol.*, **57**, 572-577 (1986).
- YEE C., KRISHNAN-HEWLETT I., BAKER C.C., SCHLEGEL R., HOWLEY P.M. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.*, **119**, 361-366 (1985).

YOUNG L.S., BEVAN I.S., JOHNSON M.A., BLOMFIELD P.I., BROMIDGE T., MAITLAND N.J., WOODMAN C.B.J. The polymerase chain reaction: a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. *Br. Med. J.*, **298**, 14-18 (1989).

ZAROD A.P., RUTHERFORD J.D., CORBITT G. Malignant progression of laryngeal papilloma associated with human papilloma virus type 6 (HPV-6) DNA. *J. Clin. Pathol.*, **1**, 280-283 (1988).

ZUCKERMAN A.J. Biology and epidemiology of Hepatitis B virus. In: PWJ Rigby and NK Wilkie (eds), *Viruses and Cancer*, pp: 83-90. Cambridge University Press, Cambridge (1985).

ZUNZUNEGUI M.V., KING M.C., CORIA C.F., CHARLET J. Male influences on cervical cancer risk. *Am. J. Epidemiol.*, **123**, 302-307 (1986).

zur HAUSEN H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **78**, 1-30 (1977).

zur HAUSEN H. Human genital cancer: Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events. *Lancet*, **2**, 1370-1372 (1982).

zur HAUSEN H. Intracellular surveillance of persisting viral infections. *Lancet*, **2**, 489-491 (1986).

zur HAUSEN H. Papillomaviruses in human cancer. *Cancer*, **59**, 1692-1696 (1987).

zur HAUSEN H. Papillomaviruses in Anogenital Cancer as a Model to Understand the Role of Viruses in Human Cancer. *Cancer Res.*, **49**, 4677-4681 (1989).

zur HAUSEN H., MEINHOF W., SCHEIBER W., BORNKAMM G.W. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer*, **13**, 650-656 (1974).