



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

SLD- 004

Natasha C. Blanco¹, Danmarys L. Hernández¹, Jhon F. Cruz¹, Marco A. Bastidas¹, Militza Quintero¹, Adriana Rodriguez¹, Morelva Toro² y Juan Puig¹

¹Laboratorio de Biología y Medicina Experimental, ² Grupo de Citología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA, Mérida A.P. 5101

natashabc24@gmail.com

Recibido: 15- 09- 2013	Aceptado: 22- 12-2013
------------------------	-----------------------

Resumen

El cáncer uterino es una patología importante en Venezuela. La infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) es uno de los principales inductores del cáncer en mucosas, junto a otros factores ambientales o inmunológicos. Uno de los métodos más sensibles para determinar la presencia del ADN del virus es la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Una teoría formulada por varios autores afirma que en un proceso cancerígeno hay integración del genoma del virus en el genoma del hospedador. Partiendo de esto, este estudio tiene como objetivo examinar muestras de pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado y carcinogénesis, donde el sistema MY09/MY11 no pudo detectar la presencia del virus. Este trabajo presenta el desarrollo de un sistema de detección de VPH que emplea, como secuencia diana, la región LCR-E6. En la evaluación del sistema NATBC/DAM_E6R, con muestras que resultaron negativas para MY09/MY11, se logró detectar la región LCR-E6 de VPH en todas las muestras clínicas. Estos resultados concuerdan con la teoría de que el genoma del VPH se integra en el genoma del hospedador cuando comienza el proceso de generación de lesiones y carcinogénesis en los pacientes, interrumpiendo la secuencia de un gen, en este caso la del gen L1 (secuencia diana del método estandarizado mundialmente), ya que por MY09/MY11 no se pudo detectar en ninguna de las muestras.

Palabras clave: oncogén E6, región larga de control, Virus de Papiloma Humano, VPH.



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

DID YOU KNOW THAT NECK CANCER UTERINE DEPENDS ON ONCOGÉN E6?

Abstract

Uterine cancer is an important pathology in Venezuela. Infection with Human Papilloma Virus (HPV) is one of the main causes of mucosal cancer, along with other environmental or immunological factors. One of the most sensitive methods to determine the presence of the virus's DNA is the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. A theory formulated by several authors states that in a carcinogenic process there is integration of the genome of the virus in the genome of the host. Based on this, this study aims to examine samples of patients with high-grade intraepithelial lesions and carcinogenesis, where the MY09 / MY11 system could not detect the presence of the virus. This work presents the development of an HPV detection system that uses, as a target sequence, the LCR-E6 region. In the NATBC / DAM_E6R system evaluation, with samples that were negative for MY09 / MY11, the LCR-E6 region of HPV was detected in all clinical samples. These results are consistent with the theory that the HPV genome is integrated into the host's genome when the injury generation process begins and carcinogenesis in patients, interrupting the sequence of a gene, in this case that of the L1 gene (target sequence of the method standardized worldwide), since by MY09 / MY11 it could not be detected in any of the samples.

Key words: E6 oncogene, long control region, Papilloma Virus Human, HPV.

Introducción

Estudios epidemiológicos han demostrado que la infección con VPH sucede a través del contacto sexual, por lo general, en el primer encuentro. El VPH se considera actualmente un factor necesario, pero no suficiente, para la instalación de una neoplasia, por lo cual el virus debe interactuar con otros agentes (Bosch y Sanjosé, 2003).



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

En estos estudios también se determinó que el factor de mayor riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino es la infección persistente de VPH de alto riesgo. Los factores determinantes de la resistencia, en gran parte, dependen de la capacidad del individuo infectado de desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz contra el VPH (Gravitt, 2003).

El genoma del VPH está compuesto por una molécula de ADN circular de doble cadena, de unos 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 E7 y E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2), [López *et al.*, (2006)].

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500pb, codifica para una proteína de casi 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante. E6 es uno de los genes que primero se expresan durante una infección por VPH. La proteína E6 bloquea la apoptosis mediante la degradación de la proteína p53, la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con las histonas acetiltransferasas de p300 y proteína asociada CREB (CBP), [López *et al.*, (2006)].

La región larga de control (LCR) no contiene marco de lectura alguno; el tamaño varía según el tipo viral, extendiéndose de un 7 a 11% del genoma y a casi 850pb, en el caso de los VPH genitales [Arias *et al.*, (2005)]. LCR se divide en 3 zonas: el promotor temprano, el amplificador (230pb) y la región más alejada del 5'. En la transcripción de los oncogenes el responsable es el promotor temprano, que está activo en células de tejido canceroso [Butz *et al.*, (1993)].

Tras la infección y la entrada del ADN viral al núcleo de la célula, éste se distribuirá entre las células hijas, y se postula que al mantenerse en bajo número de copias, impedirá la activación de la respuesta inmune [Rivera *et al.*, (2006)]. Durante la infección productiva,



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

apenas existe detección de proteínas virales en las capas basales (Doorbar, 2007).

Las pruebas más utilizadas mundialmente son: Captura de Híbridos I, Captura de Híbridos II y PCR con oligonucleótidos degenerados, como MY09-MY11 [Quintero *et al.*, (2008)]. Al mismo tiempo, se han realizado estudios donde las regiones consenso de E6 son utilizadas para diseñar oligonucleótidos degenerados (Hernández, 2010).

Los VPH que afectan las mucosas de la región orofaríngea y genital incluyen tipos de alto como de bajo riesgo; los más comunes son 6, 11, 16, 18, 31, 33, 53, 59, 61 y 68, en parte de la población de la ciudad de Mérida [Quintero *et al.*, (2008)]. Todos estos genomas se identifican con el sistema MY09/MY11. Una detección temprana puede revelar la infección por el virus y, de esa manera, evitar que se produzcan lesiones o que las lesiones existentes avancen hasta formar una lesión precancerosa [García *et al.*, (2010)].

El objetivo del estudio fue diseñar y estandarizar una técnica de biología molecular para examinar muestras de pacientes que presentan lesiones intraepiteliales de alto grado y carcinogénesis, en donde el sistema MY09/MY11 no pudo detectar la presencia del virus.

Materiales y Métodos

Alineamiento de las secuencias de LCR y el gen E6. Para este estudio, los genomas escogidos son los siguientes: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 53, 56 y 58, los cuales ya han sido identificados como los más comunes en la región de Mérida, por el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX), entre el período 2004-2011.

Las secuencias de los genes LCR y E6 de los 12 tipos de VPH escogidos se obtuvieron del GenBank, base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El alineamiento se hizo con el programa Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, version 5.4.1 (Corpet, 1988). Los números de acceso de las secuencias son VPH6: AF092932, VPH 11: M14119, VPH 16: K02718, VPH 18: X05015, VPH 31:



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

J04353V, VPH 33: EU918766, VPH 45: EF202167, VPH 51: M62877, VPH 52: GQ472848.

Diseño del oligonucleótido a partir de la secuencia consenso de la región LCR-E6 Del alineamiento múltiple, se tomó en cuenta la primera zona altamente conservada; y con los programas Oligo Analyzer 1. 1. 2. y Oligo explorer 1. 1. 2, se analizó la secuencia del oligonucleótido con las bases consenso que arrojó el alineamiento múltiple, ya que los programas no aceptan posiciones ambiguas. Para el diseño del oligonucleótido degenerado se utilizó el programa OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator (Kibbe, 2007). El oligonucleótido degenerado se usó como Forward NATBC (20pb). Otro oligonucleótido utilizado en este trabajo fue diseñado previamente para la región E6 DAM_E6R (20pb) de VPH; este ancla a partir del nucleótido 339 del gen E6. Las secuencias son las siguientes:

Forward: NATBC 5' RCA CGA AAH CGG TDN ATA TA 3' Reverse: DAM_E6R 5' GGA CAC AAN GGT TTT TGA CA 3'

Muestras seleccionadas de pacientes que resultaron positivos en el diagnóstico de LABIOMEX Las muestras utilizadas en este ensayo proceden del Laboratorio de Biología y Medicina Experimental; de estas se obtuvo el ADN, según el método estandarizado de fenol-cloroformo, modificado por Quintero et al. (2008). A todas las muestras se les hizo un PCR, donde se amplifica un fragmento del gen de β -globina con los oligonucleótidos PC04 y GH20 [Saiki *et al.*, (1985)], como un control de calidad. La detección de VPH se hizo con el sistema MY09/ MY11. Todas las muestras seleccionadas para este estudio resultaron positivas para la presencia de ADN de VPH, según la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), con las enzimas de restricción DdeI, RsaI y HpyCH4V [Quintero *et al.*, (2008)].

Estandarización del sistema NATBC/ DAM_E6R Con los oligonucleótidos diseñados a partir de la región final del gen E6 se estandarizó el sistema NATBC/ DAM_E6R para



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

detectar el VPH. Los componentes de la mezcla de reacción para el sistema NATBC/DAM_E6R fueron: Tampón para PCR (10X) sin Mg 1X, dNTP (10mM) 0.2mM, MgCl₂ (50mM) 3,5mM, oligonucleótidos 7,5pmol, Taq ADN Polimerasa Platinum® (Invitrogen™) 0,75U, H₂O (m.p.) c.s.p. 12,5µl y ADN total Entre 0,15µl y 0,2µl.

El programa para este sistema consta de 1 minuto a 94oC, 35 ciclos de: 30 segundos a 94oC, 30 segundos a 53oC, 20 segundos a 72oC; las reacciones se realizaron en el termociclador Mastercycler® personal eppendorf.

Para la visualización de los productos se hizo un gel de poliacrilamida 6%, y se tiñeron con Bromuro de Etidio (Promega) 0.0006%.

Evaluación del sistema NATBC/DAM_ E6R con muestras negativas para el sistema MY09/MY11 De las muestras procesadas en LABIOMEX se escogieron seis: dos presentaron ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado (Atypical Squamous Cell Undetermined Significance), una con lesión intraepitelial de alto y tres de bajo riesgo (LIEAG y LIEAG). Estas muestras fueron procesadas por el sistema PCR RFLP de rutina en el Laboratorio; como no arrojaron la presencia del ADN del virus, se escogieron para este estudio.

Resultados y Discusión

Con el diseño del oligo NATBC y la secuencia del oligo DAM_E6R (Hernández, 2010) se calculó el tamaño aproximado de los fragmentos amplificados por ese sistema, como se puede observar en la Tabla 1.



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

Tabla 1. Tamaño aproximado de los fragmentos de VPH amplificadas por el sistema NATBC/DAMR_E6R

Tipo de VPH	Tamaño aproximado (pb)
6	406
11	390
16	404
18	404
31	405
33	405
45	404
51	402
52	399
53	396
56	410
58	405

Muestras de pacientes que resultaron positivos por el sistema PCR-RFLP de rutina de LABIOMEX

Estas muestras tienen una ADN adecuado para estandarizar el sistema NATBC/DAM_R, demostrado por el sistema de β -globina, donde se amplificó una banda de 268pb. También resultaron positivas para el gen L1 de VPH con el sistema de PCR MY09MY11 (Quintero et al., 2008); con la tipificación RFLP con la endonucleasa HPYCH4V se determinó a qué tipo de VPH pertenecen las muestras.

Estandarización del sistema NATBC/ DAM_E6R La estandarización del sistema NATBC/ DAM_E6R produjo un amplificado de entre 390 y 410 pb para el tipo de VPH específico. Los VPH 11, 52 y 58 dieron como resultado una banda con buena señal y sin bandas inespecíficas. Evaluación del sistema NATBC/DAM_E6R con muestras negativas para el

¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

sistemaMY09/MY11 Se escogieron 6 muestras con reportes de lesión, cuyos resultados para VPH mediante el sistema MY09/MY11 hubiera sido negativo. El ADN de las muestras era óptimo, ya que amplificando el fragmento de β -globina (Saiki et al., 1985) se observaba una señal fuerte y nítida de la banda de 268pb. No hubo amplificación del fragmento L1 (450pb) con el sistema de detección MY09/ MY11. En la Figura 1 se observan las bandas de la región LCR-E6 amplificadas (400pb aproximadamente) que indican o afirman la presencia del ADN de VPH en las 6 muestras reportadas con lesión. En la Figura 2 no se evidencia amplificación del fragmento L1 (450pb) con el sistema de detección MY09/MY1.



Figura 1. Amplificados de aproximadamente 400pb de muestras que presentan lesiones, resultando positivas para VPH con el sistema de detección NATBC/DAM_E6R, (Mpm: Marcador de bajo peso molecular).

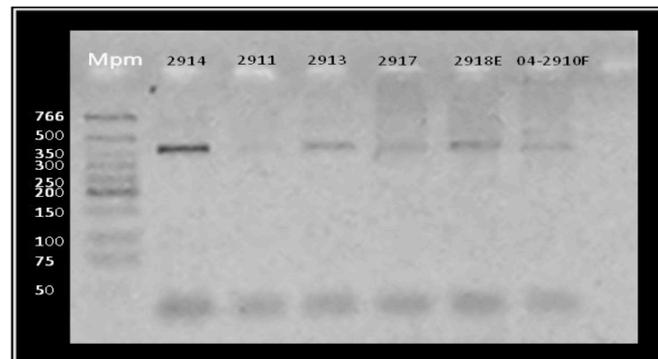


Figura 2. Muestras que presentan lesiones y resultan negativas para el sistema de detección MY09/MY11 (Mpm: Marcador de bajo peso molecular; Control Positivo de células HeLa infectadas con VPH 18).



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

La infección de VPH, la persistencia del virus, las verrugas precancerosas y la invasión al epitelio de alrededor de 15 tipos de VPH, han sido catalogados como factores determinantes en la formación de cáncer cervical [Schiffman *et al.*, (2003)]. Con los oligonucleótidos NATBC y DAM_E6R se calculó el tamaño de los fragmentos que se amplificarían en la PCR, teniendo una longitud que va desde 390 pb hasta 410pb, correspondiendo con el peso molecular que se observó en la figura 2 de control positivo, según el Marcador de peso molecular de BioLabs.

Estandarización del sistema NATBC/ DAM_E6R y evaluación del sistema NATBC/DAM_E6R con muestras negativas para el sistema MY09/MY11 El sistema NATBC/DAM_E6R está diseñado para amplificar un fragmento LCR- E6 altamente conservado. Se escogió esta región, ya que en la carcinogénesis es conocida la integración del genoma de VPH en el genoma del hospedador, por lo que se interrumpe la secuencia de los genes en dicha integración [Sasagawa *et al.*, (2000)]. Basados en esto, es razonable elegir estas secuencias dianas que se conservan intactas, en la que estudios previos con muestras cancerígenas han determinado la presencia de la oncoproteína E6, demostrando que el gen sigue codificando después de integrarse al genoma del hospedador. Estudios anteriores realizados por [Sasagawa, (2000); Sotlar, (2010)] han demostrado que, tomando una región que comprenda LCR y los genes E6, E7, se incrementa en la detección de VPH de alto riesgo la presencia de ADN del virus en muestras cancerosas.

En la evaluación del sistema NATBC/ DAM_E6R con muestras que resultaron negativas para MY09/MY11, se observó que el sistema estandarizado en este trabajo pudo detectar la región LCR-E6 de VPH en todas las muestras clínicas. En la figura 1 se ve que en todos los carriles hay una banda de aproximadamente 400pb (según Mpm, BioLabs). En el carril dos que corresponde a una muestra con una lesión denominada “Células Escamosas Atípicas de Significado No determinado” hay una banda con baja señal, lo cual se puede tomar por una carga viral baja.



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

Con este resultado se puede afirmar la teoría de que el genoma del VPH se integra en el genoma del hospedador cuando comienza el proceso de lesiones y carcinogénesis en los pacientes [Sasagawa *et al.*, (2000)], interrumpiendo la secuencia de un gen; en este caso, la del gen L1 (secuencia diana), ya que por MY09MY11 no se pudo detectar en ninguna de las muestras.

Conclusiones

La región LCR-E6 es una zona óptima para la detección de VPH en muestras de mucosas; incluso cuando ya ha comenzado un proceso de carcinogénesis, el genoma del virus puede integrarse al genoma del hospedador, interrumpiendo o perdiendo algunos genes, entre ellos el gen L1, que es la secuencia diana para el sistema de detección MY09MY11 mundialmente estandarizado. Al perderse esta parte del genoma de Virus, se hace imposible diagnosticar uno de los factores más importante en la formación del cáncer de cuello uterino.

Agradecimiento

Al Dr. Juan Puig y al Laboratorio de Biología y Medicina Experimental por financiar este trabajo. A la Dra. Adriana Rodríguez de la Misión Barrio Adentro, quien participó en la recolección de las muestras y al grupo de Citología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, dirigido por la Dra. Morelva Toro.

Referencias Bibliograficas

Arias, H.; Peyton, C.; Torrez, N.; Anderson, N.; Wheeler, C. (2005). Human papillomavirus type 18 variant lineales in United Status populations characterized by sequence análisis of LCR-E6, E2 and L1 regions. *Virology*. 338; 22-34.

Bosch, F.; De Sanjosé, S. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer: burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 31: 3-13.



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

Butz, K.; Hoppe, F. (1993). Transcriptional Control of Human Papillomavirus (HPV) Oncogene Expression: Composition of the HPV Type 18 Upstream Regulatory Region. *Journal of Virology*. 67 (11): 64-67. Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. 16 (22): 10881- 10890.

Doorbar, J. (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Disease Markers*. 23: 297– 313.

García, D.; Schmitt, M.; Cid, A.; Castillo, M. (2010). Genotyping the human papillomavirus (HPV) in Cytobrush samples taken from patients attending different hospitals in Bogotá (Colombia) and evaluating agreement two PCR-based methods. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 61 (4): 310-318.

Gravitt, P. (2003). ¿Es el VPH el principal iniciador del cáncer? *HPV Today*. 3: 8-9.

Hernández, D.(2010). Diseño y Estandarización de un Sistema PCR- SSCP del Gen E6 para Detección y Tipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH). Trabajo especial de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Kibbe, W. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator, Northwestern University, Chicago, EEUU. [en línea]. Recuperado el 14 de noviembre de 2011 , de [http://www. basic.northwestern.edu/biotools/ OligoCalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html)

López, A.; Lizano, M. (2006). Cáncer Cérvicouterino y el Virus del Papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 1: 31-55.

Quintero, M.; Cruz, J.; Bastidas, M.; Márquez, L.; Puig, J. (2008). Detección y tipificación de virus de papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 68 (1): 25-31.

Rivera, R.; Delgado, J.; Painel, V.; Barrero, R.; Larraín, A. (2006). Mecanismo de



¿SABÍA USTED QUE EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO DEPENDE DEL ONCOGÉN E6?

Infección y Transformación Neoplásica producido por Virus Papiloma Humano en el epitelio cervical. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*. 71(2):135- 140.

Saiki, R.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.; Horn, G.; Erlich, H. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-1354.

Sasagawa, T.; Minemoto, Y.; Basha, W.; Yamazaki, H.; Nakamura, M.; Yoshimoto, H. (2000). A new PCR-based assay amplifies the E6–E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Research*. 67: 127-139.

Schiffman, M.; Krüger, S. (2003). Natural History of Anogenital human Papillomavirus Infection and Neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 31: 14-19.

Sotlar, K.; Diemer, D.; Dethleffs, A.; Hack, Y.; Stubner, A.; Vollmer, N.; Menton, S.; Menton, M.; Dietz, K.; Wallwiener, D.; Kandolf, R.; Bültmann, B. (2004). Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (7): 3176-3184.