

# TIPIFICACIÓN DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO MEDIANTE SECUENCIA DIRECTA EN MUJERES CON CITOLOGÍA NORMAL

Martha Lucía Serrano, Magnolia Correa, Olga Medina, Diana Melgarejo, María Mercedes Bravo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Inmunología, INC

---

## RESUMEN

---

**Introducción:** el virus del papiloma humano (VPH) se considera un factor etiológico necesario, pero no suficiente, en la carcinogénesis cervical. Aunque la prevalencia de esta infección es homogénea a nivel mundial, la prevalencia tipo-específica varía según la región geográfica. El objetivo de este estudio es determinar mediante secuencia directa la prevalencia tipo-específica de la infección por VPH en una muestra de mujeres jóvenes de Bogotá (Colombia) con citología normal.

**Materiales y métodos:** se determinó la presencia de VPH en cepillados cervicales en 230 mujeres entre 18 y 36 años con citología normal mediante PCR GP5+/GP6+, y mediante la técnica SSCP y secuencia directa se realizó la tipificación de VPH.

**Resultados:** se encontró una prevalencia de la infección por VPH de 18,2%. Se detectaron quince tipos de VPH, de los cuales cuatro no se hubieran podido tipificar por métodos convencionales de hibridación. Los cinco tipos más prevalentes fueron el VPH16, VPH31, candidato VPH90, VPH59 y VPH18. La prevalencia de los tipos de alto riesgo fue de 10,4%, y la de los de bajo riesgo, de 4,3%. De dos tipos identificados se desconoce su potencial oncogénico (HPGA6053 y L1AE9).

**Conclusión:** la secuenciación directa de ADN permitió identificar tipos de VPH que no hubieran podido ser tipificados con otros métodos, en particular el candidato VPH90, el cual se encontró como el tercero más frecuente en esta muestra. Se confirmó la alta

prevalencia de VPH59, tipo viral poco frecuente en regiones diferentes a Centro y Suramérica.

**Palabras clave:** virus del papiloma humano/ clasificación, Colombia, secuencias de bases.

## HPV TYPING BY DIRECT DNA SEQUENCING AMONG WOMEN WITH NORMAL PRAP SMEARS

---

## ABSTRACT

---

**Introduction:** human papillomavirus (HPV) infection is necessary but not sufficient to cause cervical cancer. The HPV general prevalence is very similar worldwide but its type-specific distribution shows geographic variation. The aim of this study was to establish the prevalence of HPV infection by direct DNA sequencing and HPV type-specific distribution among young Colombian women with normal cervical cytology results.

**Material and methods:** in 230 Colombian women, aged 18-36 years, with normal cervical cytology, we detected and typed HPV by using general primers GP5+/GP6+, based on PCR-SSCP and direct sequencing.

**Results:** HPV prevalence was 18.2%. Fifteen different HPV types were identified; among them, four types that cannot be identified by methods based in hybridization. The most common types found were HPV16, HPV31, candidate HPV90, HPV59 and HPV18. The prevalence of high-risk types was 10.4%

---

Recibido el 24 de noviembre de 2003 y aceptado para publicación el 28 de enero de 2004.

Correspondencia: María Mercedes Bravo. Laboratorio de Inmunología, INC. Calle 1 No.9-85, Bogotá, D.C., Colombia.

Correo electrónico: mbravo@incancerologia.gov.co

and of low-risk types was 4.3%. The oncogenic potential of two identified types (HPGA6053 and L1AE9) is unknown.

**Conclusions:** the direct DNA sequence method allowed us to identify HPV types that cannot be identified with other methods, especially candidate HPV90, the third most common type detected in this study, and to corroborate HPV59 as a frequent type in Central and South America.

**Key words:** papillomavirus, human/classification, Colombia, Base Sequence.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es el segundo cáncer más frecuente en mujeres en el mundo; en Colombia es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer en edad reproductiva (1,2). El virus del papiloma humano (VPH) es considerado actualmente un factor etiológico necesario, pero no suficiente, en la carcinogénesis cervical (3). Existen más de 120 tipos de VPH, de los cuales al menos treinta infectan la mucosa anogenital y que son clasificados en dos grupos: alto y bajo riesgo de progresión hacia cáncer (4,5). Los tipos virales de bajo riesgo producen exclusivamente lesiones epiteliales benignas como el condiloma, mientras que los de alto riesgo producen lesiones que pueden progresar hacia lesiones intraepiteliales de alto grado y cáncer (5).

El VPH16 es el tipo más frecuente a escala mundial; sin embargo, los otros tipos de VPH muestran una variación geográfica importante en cuanto a su prevalencia (6). Ya que la respuesta inmune humoral contra VPH es tipo-específica (7), existe la necesidad de definir cuales de los más de treinta tipos anogenitales deberían y podrían ser incluidos en una vacuna, además del VPH16. Existen varios métodos para la detección y tipificación del VPH (8), y los más usados en muestras de citología cervicouterina son: captura de híbridos, que cuenta con la aprobación de la FDA para uso clínico y solamente discrimina entre tipos virales de alto y bajo riesgo, y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores genéricos, seguida de hibridización o análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o secuenciamiento. Se ha demostrado que existen algunas diferencias entre los hallazgos encontrados con las diferentes metodologías para tipificar VPH (8) y en las que el método de tipificación de VPH

mediante secuencia directa tiene como atractivo la posibilidad de identificar prácticamente cualquier tipo de VPH aislado sin producir clasificaciones erróneas por hibridación cruzada con tipos similares (9,10).

Ya que las infecciones por VPH son más prevalentes en mujeres jóvenes, y dado que los tipos virales encontrados son más diversos en citologías normales, unido este hecho a que no se cuenta con un estudio de tipificación por secuencia directa en nuestra población, en este trabajo se pretende determinar, mediante secuencia directa, la prevalencia tipo específica de infección por VPH en una muestra de mujeres jóvenes de Bogotá (Colombia) con citología negativa para neoplasia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Población*

Se analizaron muestras de 250 mujeres procedentes de Bogotá, en un rango de edad entre los 18 y los 36 años, que asistieron a control de citología cervicouterina (CCU) a la Liga de Lucha contra el Cáncer, Seccional Bogotá, entre marzo y junio de 1999, y quienes aceptaron participar voluntariamente en el estudio, manifestándolo mediante la firma de un consentimiento informado. De cada una se obtuvo una muestra de cepillado cervical, tomada por personal experto. En el estudio se incluyeron sólo aquellas con resultado citológico negativo para cambios neoplásicos y se descartaron seis por presentar lesiones escamosas intraepiteliales, de acuerdo con el sistema Bethesda para clasificación de las CCU (11).

El material cervical se recolectó en 5 ml de solución buffer fosfato salino 10 mM pH 8,3 con timerosal al 0,5 %. Las muestras se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 min, luego de lo cual el botón celular se resuspendió en 1 ml de buffer Tris-HCl 10 mM pH 8,3, y se almacenó a -70 °C. Para la PCR se tomó una alícuota de 100 µl de la suspensión celular de cada muestra, se llevó a ebullición por 10 min y luego se centrifugó a 13.000 x g durante 20 segundos, y de ella se tomaron 10 µl para la amplificación.

### *Detección de VPH*

Para establecer la calidad del ADN de las 244 muestras recolectadas se hizo una amplificación de un fragmento de 102 pb del gen beta globina con los iniciadores PCO3/PCO4 (12). De éstas, 230 amplificaron adecuadamente y fueron empleadas para detección de VPH por PCR. Las catorce muestras negativas para beta

globina se consideraron inadecuadas y fueron excluidas del estudio. La detección del VPH se realizó mediante PCR, utilizando los iniciadores consenso GP5+/GP6+ según la metodología descrita por Roda-Husman (13). El amplímero generado corresponde a aproximadamente 142 pb del gen que codifica para la proteína L1 de la cápside viral. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 ml con 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 200 mM de dNTPs, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25 pmoles de cada iniciador, 1 U Taq polimerasa (Gibco BRL) y 10 ml de la muestra. Se realizaron cuarenta ciclos de amplificación en un termociclador (Perkin-Elmer 9600). Cada ciclo incluyó un paso de denaturación a 95 °C por 1 min, un paso de hibridación a 40 °C por 2 min y un paso de elongación a 72 °C por 1,5 min. La denaturación inicial se hizo a 95 °C por 4 min, y se incluyó un paso de elongación final de 10 min.

Como controles positivos de la reacción se utilizaron: ADN de la línea celular SiHa (contiene de 1-2 copias del VPH16) y ADN de la línea celular HeLa (contiene de 10-50 copias de VPH18) (14). Como controles negativos de la PCR se emplearon blancos cada diez tubos con agua destilada en lugar de muestra. El análisis de los productos de amplificación se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% y tinción de plata.

#### Tipificación de VPH

Como método inicial de tamizaje de dos de los tipos de VPH más prevalentes en cáncer cervical (VPH16 y VPH18) se empleó el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) según lo reportado por Orita (15), con algunas modificaciones realizadas en el Grupo de Inmunología del INC. Entre 2 ml y 7 ml del producto de PCR de las muestras positivas para VPH fueron mezclados con 10 ml de solución denaturante (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% de azul de bromofenol y 0,05% de xilene cianol), llevados a ebullición durante 6 min e inmediatamente colocados en hielo hasta el momento de cargar el gel. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones no denaturantes con glicerol al 5%. El corrido se realizó a 400 V y 2,5 W con temperatura constante de 8 °C durante 4,5 horas, y posteriormente se realizó tinción de plata. En todos los geles se corrieron los patrones de VPH16 y VPH18 para efectuar la tipificación. Los amplímeros de las muestras que exhibieron un patrón diferente fueron sometidos a secuenciamiento directo empleando el estuche Termo Sequenase C y 5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing según recomendaciones

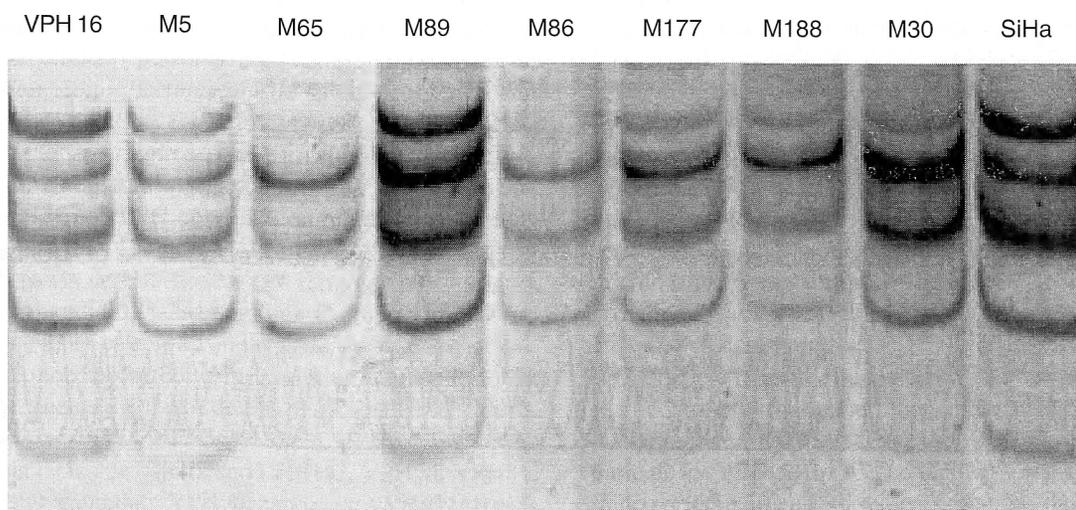
de la casa productora (Amersham Pharmacia Biotech) y la mezcla de reacción fue analizada en un secuenciador SEQ 4 x 4 (Amersham Pharmacia Biotech). Las secuencias resultantes fueron cotejadas con secuencias de VPH previamente reportadas en el GenBank del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos y, de esta manera, tipificadas.

## RESULTADOS

### Prevalencia total y tipo específico de VPH

De las 230 muestras analizadas, 42 (18,2%) fueron positivas para la detección genérica de VPH. Mediante la técnica de SSCP se realizó la tipificación de VPH en once muestras de las cuales nueve correspondieron a VPH16 y dos a VPH18 (figura 1). Las 31 muestras restantes, que presentaron un patrón en SSCP diferente al de VPH16 y VPH18, se tipificaron mediante secuencia directa del amplímero GP5+/GP6+; así se detectaron trece tipos adicionales. En total, en las 42 muestras se detectaron quince tipos diferentes de VPH, y el tipo más prevalente fue VPH16 (21,4%), seguido por VPH31 (16,7%), candidato VPH90 (9,5%), VPH59 (7,1%), VPH18, HPGA6053 y VPH81 (4,8%), y VPH42, VPH51, VPH54, VPH56, VPH67, candidato VPH89, candidato VPH91 y L1AE9 (2,4%) (tabla 1). En cinco muestras no fue posible identificar el tipo viral. En los trece tipos identificados mediante secuencia directa se identificaron cuatro tipos virales no incluidos en los métodos de tipificación basados en hibridación con sondas (candidato VPH90, candidato VPH91, L1AE9, HPGA6053), motivo por el cual no se conoce con certeza si son de alto o bajo riesgo. Sin embargo, según lo reportado en algunos artículos, y por su ubicación en los árboles filogenéticos, consideramos de bajo riesgo al candidato VPH90 y al candidato VPH91 (16). Las secuencias identificadas como L1AE9 y HPGA 6053 no son suficientes para predecir el potencial oncogénico de los virus detectados, ya que de éstos sólo hay reportados segmentos de su genoma y no se conoce su ubicación en árboles filogenéticos ni, mucho menos, existe evidencia epidemiológica de asociación o no con cáncer. En la figura 2 se ilustra la tipificación de la muestra correspondiente a HPGA6053.

La prevalencia de los tipos de alto riesgo (VPH16, VPH18, VPH31, VPH51, VPH56, VPH59, VPH67) fue de 10,4%, y de los tipos de bajo riesgo (VPH42, VPH54, VPH81, VPH89, candidato VPH90, candidato VPH91), de 4,3%.



**Figura 1.** Tipificación de VPH16 empleando el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) en las muestras 5, 65, 89, 86, 177, 188 y 30.

**Tabla 1.** Prevalencia tipo-específica de VPH

Tipo de VPH	No.	% (n=230)	% en positivas (n=42)	Riesgo oncogénico
Total	42	18,2	100	
16	9	3,9	21,4	Alto
31	7	3	16,7	Alto
cand90 (JC9710)	4	1,7	9,5	Bajo? (16)
59	3	1,3	7,1	Alto
18	2	0,9	4,8	Alto
HPGA6053	2	0,9	4,8	Aislado de LEIAG (17)
81 (CP8304)	2	0,9	4,8	Bajo
42	1	0,4	2,4	Bajo
51	1	0,4	2,4	Alto
54	1	0,4	2,4	Bajo
56	1	0,4	2,4	Alto
67	1	0,4	2,4	Alto
cand89 (CP6108)	1	0,4	2,4	Bajo
L1AE9	1	0,4	2,4	Desconocido
cand91 (JC9813)	1	0,4	2,4	Bajo? (16)
VPH X	5	2,2	12	

Cand: Candidato; VPH X: VPH de tipo no asignado.

## DISCUSIÓN

La asociación etiológica entre los tipos de VPH de alto riesgo y el cáncer de cuello uterino ha planteado que la detección y tipificación de ADN de VPH pueda

utilizarse no solo para identificar mujeres en riesgo de desarrollar el cáncer cervical sino también en el diseño de una vacuna que prevenga esta enfermedad. Aunque este examen tiene una mayor sensibilidad que la CCU convencional para el tamizaje del cáncer de cuello uterino, su especificidad es menor, ya que muchas mujeres, en especial las jóvenes, presentan infecciones



transitorias cuya detección puede generar serios dilemas a nivel clínico y personal, por lo cual la utilidad de este examen como herramienta de salud pública es aún objeto de debate (18,19,20).

En este estudio se encontró una prevalencia de infección por VPH de 18,2% en mujeres menores de 36 años con CCU normal, lo cual está de acuerdo con la mayoría de estudios en este rango de edad, tanto a nivel mundial (21-24) como en Colombia (25), y no parece tener relación con las tasas de cáncer cervical. Se detectaron quince tipos virales diferentes, y la prevalencia de los tipos de alto riesgo (VPH16, VPH18, VPH31, VPH51, VPH56, VPH59, VPH67) fue mayor que la de los de bajo riesgo (VPH42, VPH54, VPH81, VPH89, candidato VPH90, candidato VPH91) (10,4% vs. 4,3%). Este resultado no es sorprendente, ya que en muestras de mujeres jóvenes con CCU normal es común encontrar predominantemente tipos de alto riesgo (21,22,26), lo cual refuerza el concepto de la alta prevalencia de la infección por tipo viral de alto riesgo en mujeres menores de 35 años con CCU normal, quienes, en su gran mayoría, no van a presentar consecuencias clínicas. Los cinco tipos más prevalentes luego de VPH16 fueron VPH31, candidato VPH90, VPH59, VPH18 y VPH81. La prevalencia de VPH59 está de acuerdo con su alta prevalencia en Centro y Suramérica

y su baja frecuencia en otras regiones geográficas (6). La metodología utilizada no permitió la tipificación en cinco muestras positivas para VPH, hecho que puede obedecer a la presencia de infecciones múltiples en las cuales se requiere clonación previa a la secuencia para la identificación de los tipos virales o a una baja carga viral, que puede dificultar la tipificación mediante secuencia, o ambas causas. Sin embargo, el secuenciamiento directo permitió identificar tipos de VPH que no habrían podido ser tipificados con los métodos basados en hibridación con sondas, en particular el candidato VPH90, anteriormente conocido como JC9710, el cual se encontró como el tercero más frecuente en nuestra población, con una prevalencia de 1,7%, y que haría parte de los VPH de tipo desconocido (VPH X) encontrados principalmente en mujeres menores de 35 años, en un estudio basado en PCR-EIA y llevado a cabo en Bogotá (25).

En conclusión, nuestros resultados muestran una alta prevalencia de infección por VPH, principalmente de alto riesgo, similar a la observada en países con bajas tasas de cáncer cervical. La metodología empleada permitió tipificar virus que no habían sido identificados como frecuentes en nuestro país y confirmar otros asociados, principalmente reportados en nuestro continente.

## REFERENCIAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: *Globocan 2000*. *Int J Cancer* 2001;94(2):153-156.
2. Medina R. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia 1990. Bogotá: Instituto Nacional de Cancerología; 1994. vol. 1, p.76-77.
3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12-19.
4. De Villiers E. Taxonomic classification of Papillomaviruses. *Papillomavirus Report* 2001; 12(3):57-63.
5. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6):518-527.
6. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group*. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(11):796-802.
7. Giroglou T, Sapp M, Lane C, Fligge C, Christensen ND, Streeck RE et al. Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* 2001; 19(13-14):1783-1793.
8. Vernon SD, Unger ER, Williams D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J Clin Microbiol* 2000;38(2):651-655.

9. Johnson T, Bryder K, Corbet S, Fomsgaard A. Routine genotyping of human papillomavirus samples in Denmark. *APMIS* 2003;111(3):398-404.
10. Gharizadeh B, Kalantari M, Garcia CA, Johansson B, Nyren P. Typing of human papillomavirus by pyrosequencing. *Lab Invest* 2001;81(5):673-679.
11. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287(16):2114-2119.
12. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-1354.
13. Roda-Husman AM, Walboomers JM, Van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76(Pt 4):1057-1062.
14. Meissner JD. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol* 1999;80 (Pt 7): 1725-1733.
15. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5(4):874-879.
16. Terai M, Burk RD. Identification and characterization of 3 novel genital human papillomaviruses by overlapping polymerase chain reaction: candHPV89, candHPV90, and candHPV91. *J Infect Dis* 2002;185(12):1794-1797.
17. Astori G, Arzese A, Pipan C, De Villiers EM, Botta GA. Characterization of a putative new HPV genomic sequence from a cervical lesion using L1 consensus primers and restriction fragment length polymorphism. *Virus Res* 1997;50(1):57-63.
18. Cuzick J. Role of HPV testing in clinical practice. *Virus Res* 2002;89(2):263-269.
19. Petry KU, Menton S, Menton M, Loenen-Frosch F, De Carvalho GH, Holz B et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer* 2003;88(10):1.570-1.577.
20. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357(9271): 1831-1836.
21. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91(3):412-420.
22. Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Franssen-Daalmeijer N et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer* 2000;87(2):221-227.
23. Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ* 2000; 163(5):503-508.
24. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(6):464-474.
25. Molano M, Posso H, Weiderpass E, Van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* 2002; 87(3):324-333.
26. Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, Hundley RS, Zhao M, Apple RJ et al. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis* 2001;183(11):1.554-1.564.

#### FUENTES DE APOYO:

DNP Ministerio de Salud. Proyecto "Uso de sondas frías para el estudio de la relación virus del papiloma y cáncer de cuello uterino".

#### AGRADECIMIENTO:

Dr. Edwin Hoyos (Liga de Lucha Contra el Cáncer, Seccional Bogotá).