

Virus del papiloma humano: Marcador de respuesta a radioterapia/quimiorradioterapia en cáncer cervical

Human papilloma-virus: Marker of response to radiotherapy/chemoradiotherapy in cervical cancer

- Esaú Floriano-Sánchez^{1a}, Noemí Cárdenas-Rodríguez^{2a,b},
Federico Maldonado-Magos^{3c}, Fernando Pérez Zincer^{3c},
Rafael De la Huerta Sánchez^{3c}, Melchor Castro Marín^{3c}

-
1. Doctor en Ciencias.
 2. Maestra en Ciencias.
 3. Médico Especialista.

- a. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Escuela Médico Militar, Cerrada de Palomas y Batalla de Celaya, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México, D.F., México.
- b. Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700 Letra C Col. Insurgentes Cuicuilco, México, D.F., México.
- c. Servicio de Oncología Médica, Hospital Central Militar, Periférico y Ejército Nacional, Secretaría de la Defensa Nacional, Col. Lomas de Sotelo, México, D. F., México.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Acta Bioquím Clín Latinoam 2010; 44 (3): 337-46

Resumen

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) representa el 6% de todas las neoplasias malignas en mujeres. Evidencia epidemiológica y molecular implican al virus del papiloma humano (VPH) en la etiopatogenia del CaCU y los genotipos más frecuentemente asociados son el 16 y 18 (VPH-16 y -18). La radioterapia (RT) y la quimiorradiación (RT-QT) son las dos modalidades de tratamiento primario para el CaCU, con tasas variables de resistencia o persistencia de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar, por primera vez, la respuesta tumoral antes, durante y después de la RT y la RT-QT y analizar la carga viral de VPH-16 y -18 en pacientes mexicanas con CaCU. Se obtuvieron muestras de tejido tumoral en pacientes con CaCU: antes, durante y después de la RT y RT-QT, se determinó el número de copias absolutas del VPH-16 o -18 y se estudió la respuesta en relación a la carga viral por PCR en tiempo real. La disminución de la carga viral de VPH para RT-QT y RT fue de 100 y 62%, respectivamente. Se observó una mejor respuesta con la modalidad de tratamiento combinado, por lo que se sugiere que la carga viral de VPH (-16 y -18) podría ser un potencial indicador para evaluar la respuesta de ambos tratamientos en el CaCU.

Palabras clave: cáncer cérvico-uterino * virus del papiloma humano * reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real * radioterapia * quimiorradioterapia

Summary

Cervical cancer (CaCU) represents 6% of all malignancies in women. Molecular and epidemiological evidence relate the human papilloma virus (HPV) with the pathogenesis of the CaCU genotypes, the most frequent genotypes being 16 and 18 (VPH-16 and -18). Radiotherapy (RT) and chemoradiotherapy

(ChRT) are the two primary treatment modalities for CaCU, with variable rates of resistance or persistence of the disease. The aim of this work was to study for the first time, the tumoral response before, during and after RT and RT-QT and analyze HPV-16 and -18 viral load in a Mexican population with CaCU. Samples of tumor tissue were collected from patients with CaCU: before, during and after RT and ChRT. The absolute number of HPV-16 or -18 copies was determined, and the response related with viral load in both treatments was studied by real-time PCR-based in fluorescence. The percentage of decrease in HPV viral load for ChRT and RT was 100% and 62%, respectively. With ChRT, the response was better than with RT alone. HPV (-16 and -18) viral load is suggested to be a potential indicator to evaluate CaCU response in both treatments.

Keywords: cervical cancer * human papilloma virus * real-time polymerase chain reaction * radiotherapy * chemoradiotherapy

Introducción

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) representa el 6% de todas las neoplasias malignas en mujeres, ocupa el segundo lugar después del cáncer de mama en tasa de mortalidad y tiene una incidencia anual de alrededor de 11.000 en los Estados Unidos (1). Las evidencias epidemiológica y molecular implican al virus del papiloma humano (VPH) en la etiopatogenia de la mayor parte de los procesos neoplásicos ano-genitales, sobre todo con la progresión y desarrollo del carcinoma escamoso de cuello uterino.

En México, cada 2 horas muere una mujer por CaCU. La tasa de mortalidad es de 14 a 16 mujeres por cada 100.000 habitantes (2). La mayoría de los casos son diagnosticados en estadios localmente avanzados (IB2-IVA) de acuerdo con la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (2).

La infección por VPH en países en vías de desarrollo tiene un predominio en mujeres jóvenes con una frecuencia de 24% entre mujeres de 25 a 44 años. La infección por este virus tiene una incidencia de 90 por cada 100.000 habitantes y es la principal infección por transmisión sexual (3)(4). Existen más de 100 genotipos diferentes de VPH (5), de los cuales alrededor de 18 tienen un gran potencial oncogénico, específicamente los agentes etiológicos más frecuentes para el CaCU son los genotipos 16 y 18 (VPH-16 y -18) (6-8).

Los estudios epidemiológicos han mostrado que, en Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado (LIEBG) y en Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (LIEAG), se presentan diferencias en las alteraciones genómicas, así como características virales (VPH) que le confieren a las células ventajas para la progresión a lesiones más severas al CaCU (9)(10).

En otros estudios similares se ha demostrado la importancia que tiene la determinación de la presencia o carga viral de VPH en pacientes en etapas precancerosas

o cancerosas del cérvix uterino. Lombard *et al.* y Burger *et al.* encontraron como genotipos más frecuentes al VPH-16 y -18 (58% y 38%, respectivamente), con mortalidad 2,4 veces mayor para el genotipo -18 (11)(12). En un estudio mexicano (13), se determinó que la detección de VPH en plasma podría ser un marcador de enfermedad residual o de recaídas para el CaCU. Porthanakasem *et al.* encontraron una mayor carga viral (en plasma y cérvix uterino) en pacientes con estadios avanzados de CaCU y con recurrencia de la enfermedad en pacientes positivas a VPH en plasma (14); Sherman *et al.* encontraron evidencia de la asociación de lesiones intraepiteliales del cérvix uterino (LIEBG y LIEAG) con la infección por VPH de alto riesgo (HPV-16 y -18) (15), Tsai *et al.* encontraron que la progresión de LIEAG a cáncer está asociada a una carga elevada de VPH-16 (16).

Sobre el tratamiento del CaCU, la radioterapia (RT) o cirugía son las modalidades primarias de tratamiento para el CaCU localmente avanzado (CaCU-LA); por otro lado, la quimioterapia (QT) ha sido usada como adyuvante en la modalidad de RT, pero desde 1999 la RT en concomitancia con quimioterapia (RT-QT), ha sido considerada como una mejor modalidad de tratamiento. En cinco estudios, en los que se incluyeron aproximadamente 2.000 pacientes, se encontró un porcentaje menor de sobrevida en las pacientes tratadas sólo con RT, que con respecto a las tratadas con RT en concomitancia con QT (17). Se encuentra actualmente el mismo meta-análisis actualizado (24 estudios, 21 publicados, 4.921 pacientes incluidos) en la Biblioteca Cochrane (17)(18) y se confirma que la RT-QT en general, ofrece una mayor sobrevida absoluta a 5 años, comparada con la RT (18).

La carga viral o persistencia de la infección cervical uterina por VPH podría ser un indicador potencialmente predictivo de enfermedad residual mínima o un indicador de recaídas. Se han hecho estudios sobre este potencial indicador, en la modalidad de tratamiento con RT. Ishikawa *et al.* determinaron al inicio del trata-

miento la presencia o ausencia de VPH por PCR, el cual fue positivo en 50% de las recurrencias locales, 82% en metástasis a distancia y un 75% en metástasis a distancia más recurrencia local (19).

Sobre el tratamiento con RT-QT, Yutaka *et al.* encontraron una persistencia de VPH significativamente elevada en el CaCU-LA y llegaron a la conclusión que la detección de VPH puede ser un indicador predictivo de sobrevida general o de la sobrevida de enfermedad local libre (20).

Por otro lado, con respecto a la identificación y cuantificación de copias de ADN de VPH, en años recientes se han desarrollado diferentes metodologías. Los métodos de uso común son: hibridación (captura de híbridos), PCR en tiempo real y microanálisis de ADN. La PCR en tiempo real es uno de los métodos más sensibles para la detección y cuantificación de copias de ADN. Un reciente método que se está desarrollando se basa en la fluorescencia emitida durante la PCR en tiempo real, se utilizan fluoróforos y se integra la amplificación, se realiza el análisis de la fase de PCR y el análisis de las curvas de disociación de los productos generados para la identificación de genotipos (21-26).

Sin embargo, a pesar de esta metodología, los resultados pueden variar de acuerdo a la población en estudio, el tipo de muestra (biopsia, cepillado endocervical, lavado cervical uterino, hisopos de algodón, etc.), técnica de aislamiento del ADN, diferencias en las eficiencias de amplificación de la PCR y normalización de los datos (27). La variación en los resultados es especialmente pronunciada cuando se trata de comparar los niveles de copias de ADN de muestras de diferentes individuos.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar, por primera vez, la presencia del ADN del VPH 16 y 18 antes, durante y después de los tratamientos con RT y la quimioterapia combinada (RT-QT) en muestras de pacientes mexicanas con CaCU utilizando PCR en tiempo real.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron 19 muestras cervicales de pacientes con CaCU (biopsias intratumorales) en estadios clínicos IIIA y IIIB. La aprobación, para el uso del tejido, fue obtenida de los comités de ética e investigación locales. Se realizó un estudio clínico, prospectivo, descriptivo y observacional (Servicio de Radioterapia, Hospital Central Militar, México). La colección de muestras fue realizada de octubre de 2006 a febrero de 2007.

Se obtuvo historia clínica completa, exploración general y ginecológica de todos los pacientes. El grado histopatológico fue obtenido de acuerdo a la clasificación de la FIGO. Se obtuvieron las primeras biopsias antes de los tratamientos. Se registró a cada paciente y se iniciaron los esquemas de tratamientos siguientes:

Primera fase de tratamiento [F1], todas las pacientes

recibieron 20 sesiones de RT externa con acelerador lineal (Siemens, Mevatron 74, Alemania) 10 MEV con técnica isocéntrica con 2 campos pélvicos paralelos y opuestos, anterior y posterior. La dosis total fue de 4500 Gy en 20 fracciones con la paciente colocada en decúbito supino (tratamiento con RT).

Segunda fase de tratamiento [F2]: Después de dos semanas fue iniciada la braquiterapia de alta dosis de radiación con iridio 192 dividido en 4 sesiones en todas las pacientes. En las pacientes valoradas por el Servicio de Oncología Médica fue utilizada la quimioterapia, QT (6 pacientes) con 3 ciclos de QT con 50 mg de cisplatino diluidos en 500 cm³ de solución salina isotónica (tratamiento con RT-QT).

Se efectuó la exploración general de la paciente y se procedió al examen gineco-rectal completo. Se identificó el cérvix uterino y canal endocervical, se tomó la segunda biopsia para cuantificación del número de copias del VPH después de realizar ambos tratamientos (después de F2).

Las biopsias se mantuvieron bajo congelación a -83 °C (Revco® Legaci ULT2186 3-35 Dupont SVVA Refrigerants, NC, EE.UU.) hasta su posterior procesamiento.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

El ADN total fue extraído utilizando el equipo SV Total DNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se tomaron 100 mg de cada una de las muestras evitando contaminación con DNAsas, homogenizándolas con un politrón (Omni µH International, GA, EE.UU.) eluyendo el ADN total y fueron almacenándolas a -20 °C para análisis posteriores. Se confirmó que las biopsias fueran positivas a tejido tumoral (60% a 70%) y la estirpe histológica por reexaminación con tinción de hematoxilina-eosina (H&E). Los tejidos fueron fijados en formol al 10% e incluidos en parafina realizando cortes histológicos de 4 micras de espesor y montados en laminillas para su estudio.

La verificación de la integridad del ADN total fue realizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, colocando 6 µL del ADN total extraído de cada muestra con el sistema de análisis de electroforesis EDAS 290 (EDAS 290 KODAK, New Haven, CT, EE.UU.). La cuantificación del ADN total fue realizada por medio de fluorescencia con SYBR Green, con el multidetector Synergy HT-I (BIO-TEK Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EE.UU.).

DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL (ROTOR GENE 3000)

Para el desarrollo de la PCR en tiempo real fueron diseñados oligonucleótidos específicos para VPH-16 y -18 de la región L1 como los descritos previamente por Asato *et al.* (28) y para el gen de la enzima gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual fue utili-

zado para normalizar la carga de ADN. El fragmento amplificado con los *primers* de GAPDH fue clonado para su cuantificación absoluta. Las secuencias fueron obtenidas del GenBank™. La búsqueda de las secuencias fue realizada en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para confirmar su especificidad.

Los *primers* fueron sintetizados (Invitrogen™ Carlsbad CA, EE.UU.) libres de sales y altamente purificados optimizados a una temperatura de alineamiento de 50 °C: VPH 16: *primer* sentido, TTTGTTACTGTTGTTGATAC-TAC; *primer* antisentido, GAAAAATAAACTGTAAATCA-TATTC; VPH 18: *primer* sentido, TTTGTTACTGTGG-TAGATACC, *primer* antisentido, GAAAAATAAACTGCAAT-CATATTC y GAPDH: *primer* sentido, GAGCCAAAAGGGT-CATCATCTC, *primer* antisentido, CCTTCCACGATAC-CAAAGTTGTC.

Las condiciones para la PCR fueron optimizadas con el termociclador de gradiente (gradient Px2 Thermal Cycler Hybaid, Franklin, MA, EE.UU.) utilizando el equipo SYBR® Green PCR Master Mix *with* ROX (Applied, Biosystems CA). Las secuencias tomadas correspondieron a los registros en el GenBank™ bajo el siguiente número de acceso: VPH 16, NC_001526. VPH 18, NC_001357, GAPDH, NM_002046. Los productos de amplificación por PCR en tiempo real fueron verificados, visualizando su peso molecular en pares de bases (pb) por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, utilizando un marcador de 50 pb DNA Ladder (10416-014, Invitrogen life technologies, 1600 Faraday Av. Carlsbad, California, EE.UU.) y estudiados con el sistema de análisis de electroforesis EDAS 290, (KODAK, New Haven, CT). Los resultados obtenidos de las amplificaciones como son las condiciones de temperatura, concentraciones de *primers*, dNTPs (nucleótidos) y volúmenes, fueron transferidos al protocolo de amplificación en tiempo real del sistema de detección Rotor Gene 6.0 (Corbett Life Science, Sidney City, Australia).

PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL "ROTOR-GENE 3000"

Las reacciones de PCR en tiempo-real fueron realizadas con 10 ng de ADN total de las biopsias y con las diluciones seriadas de los controles internos: (1) plásmido con el inserto de GAPDH, (2) VPH-16 (genoma completo) y (3) VPH-18 (genoma completo); dichos genotipos virales fueron donados por el Dr. Jaime Berúmen Campos (Hospital General, México, Área de Medicina Genómica). Fue utilizado el equipo SYBR Green PCR Master Mix *with* ROX, con la concentración final de los siguientes reactivos: 1X de amortiguador SYBR Green PCR, 25 mM MgCl₂, 1 U/μL de AmpErase UNG (Uracil-N-glucosilasa), 5 U/μL de AmpliTaq Gold DNA polimerasa, mezcla de dNTPs (2,5 mM de ATP; 2,5 mM de CTP; 2,5 mM de GTP y 5,0 mM de dUTP), 0,4 μL del *primer forward* (0,4 μM), 0,4 μL del *primer reverso* (0,4 μM), y 0,8 μL de agua grado molecular, 12,5 μL de volumen

final. Las reacciones fueron realizadas inicialmente a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos en la fase de PCR, cada ciclo de 95 °C por 20 s, 50 °C por 20 s, 72 °C por 20 s, con una fase de extensión de 72 °C por 5 min y finalmente una fase de desnaturalización para generar las curvas de desnaturalización o *melting* para cada producto amplificado (T_m) con temperaturas de 60 a 98 °C, con intervalos de 0,1 °C y con rango de discriminación de 0,008 °C para los productos generados (26).

Para la cuantificación absoluta fueron construidas tres curvas estándar con los controles internos: VPH-16, -18 (genomas) y el plásmido con el inserto del fragmento blanco del gen GAPDH, con número de copias conocidas (100 000 000 a 1000 copias/4 μL, 10 000 000 a 100 copias/4 μL y 100 000 000 a 100 copias/4 μL respectivamente) realizando seis diluciones seriadas con los rangos mencionados para cada control interno. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. Fue amplificado y cuantificado, en paralelo, el fragmento del gen control (GAPDH) utilizando su curva estándar y fue normalizado el número de copias absolutas de los fragmentos amplificados de los VPH, según el tipo detectado en cada muestra (cociente= VPH-16/GAPDH ó VPH-18/GAPDH). Fue verificado el tamaño de los fragmentos amplificados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, colocando 4 μL del volumen de amplificación, visualizando las bandas con luz UV con el sistema de análisis de electroforesis EDAS 290 (EDAS 290 KODAK) (29) (30).

Para el cálculo del número de copias fueron utilizadas las curvas estándar construidas y se normalizaron con el gen control como se describió anteriormente. Fueron comparados los valores de las T_m generadas de los fragmentos amplificados de los controles internos (VPH-16, -18 y plásmido [GAPDH]).

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

La correlación entre la carga viral de VPH y el tratamiento con RT fue analizado con la prueba exacta de Fisher. La carga viral antes, durante y después de la RT o RT-CT fue analizada con la prueba "t" de Student. Fue utilizado en programa estadístico PRISMA (GraphPad Prism 3.02 Software, San Diego, CA, EE.UU.). Una p<0,05 fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados

AMPLIFICACIONES "ROTOR-GENE 3000", CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA Y GENOTIPOS

Todas las pacientes fueron diagnosticadas con carcinoma en las células escamosas del cérvix como sigue: carcinoma no queratinizante de células grandes (69,5%), carcinoma queratinizante de células grandes (26%) y carcinoma de células pequeñas (4,34%) (31) (32).

Fueron colectadas 13 biopsias para el tratamiento con RT y 6 biopsias para el tratamiento con RT-QT, el porcentaje para cada genotipo fue de 52,7 y 47,4% para VPH-16 y -18, respectivamente. El número de copias virales fue determinado y se procedió al análisis de los datos según modalidad de tratamiento, respuesta y comportamiento de la carga viral (Tabla I). La amplificación de los fragmentos de GAPDH, VPH-16 y -18 fue la esperada, como se muestra en la Figura 1.

COMPORTAMIENTO DE LA CARGA VIRAL DE VPH Y RESPUESTA DE LOS TRATAMIENTOS

La carga viral de VPH disminuyó significativamente durante el tratamiento con RT en 77% de las pacientes (Tabla I) (Fig. 2). En las pacientes tratadas con RT-QT, la carga viral disminuyó significativamente en un 100% de las pacientes (Tablas I y II) (Figura 2).

Tabla I. Comportamiento de la carga viral y genotipo (VPH-16, -18) en el tratamiento del CaCU con RT ó RT-QT.

Paciente	Carga viral normalizada			Disminución significativa*		Genotipo	
	Inicio	Durante (F1+F2)	Final	SI	NO	16	18
RT	1	8.976	7.656	4.320	✓	✓	
	2	767.565	498.484	202.938	✓	✓	
	3	678.978	409.494	102.983	✓	✓	
	4	98.676	92.837	79.585	✓	✓	
	5	785	5.645	2.828	✓	✓	
	6	7.686	5.959	2.020	✓	✓	
	7	18.897	15.434	11.989	✓	✓	
	8	15.860	11.872	8.987	✓	✓	
	9	15.853	15.840	14.988		✓	✓
	10	26.968	24.525	19.827	✓		✓
	11	6.288	8.987	19.020		✓	✓
	12	1.658	1.558	1.430		✓	✓
	13	78.654	56.545	39.833	✓		✓
RT-QT	1	12.838.475	8.766.474	7.692.160	✓	✓	
	2	14.084	8.909	3.290	✓	✓	
	3	4.579	3.455	448	✓		✓
	4	78.585	50.969	23.412	✓		✓
	5	8.767	4.488	4.389	✓		✓
	6	6.989	4.407	3.988	✓		✓

RT = Radioterapia, RT-QT= Radioquimioterapia combinada. * $p < 0,05$ (t de student). Inicio, durante (F1+F2) y después de los tratamientos (ver Materiales y Métodos).

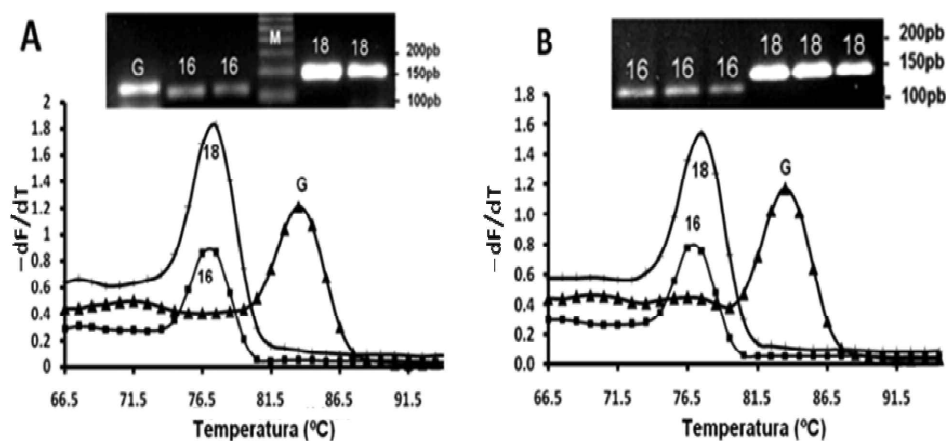


Figura 1. Curvas melting de amplificadas de VPH-16, -18 Y GAPDH de controles y muestras. En (A) controles internos, sus curvas melting: (G) GAPDH-plásmido (83,5 °C), (16) VPH-16 (77 °C), (18) VPH-18 (77,3 °C). En (B) curvas melting de los amplificadas de las muestras (biopsias): (G) GAPDH (83,5 °C), (16) VPH-16 (77 °C), (18) VPH-18 (77,3 °C) y (M) marcador de 50 pb.

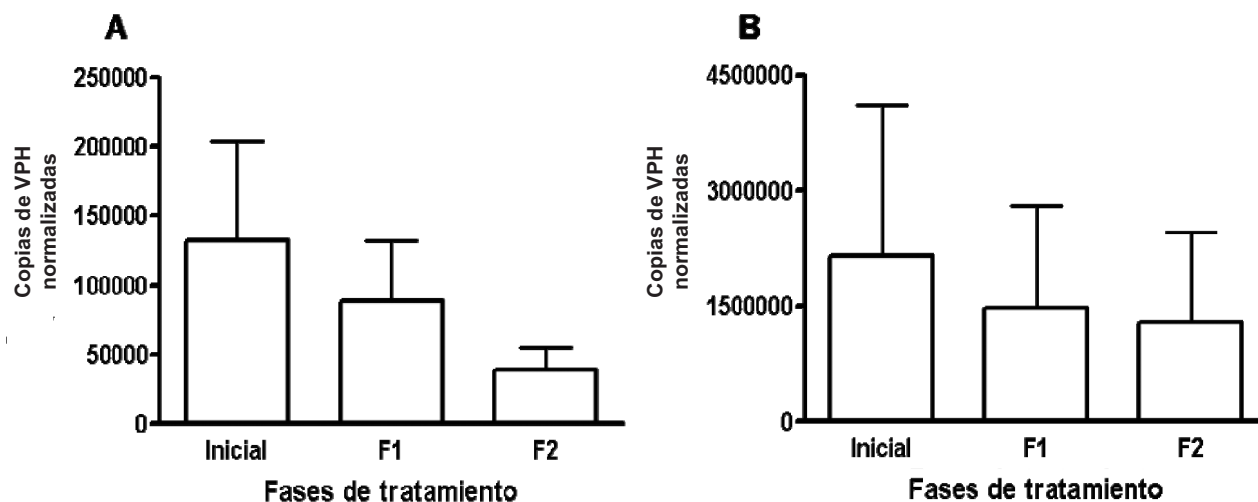


Figura 2. Comportamiento de la carga viral (VPH16 y -18) antes, durante y al final del tratamiento del CaCU, con RT o RT-QT. A), tratamiento con RT. B), tratamiento con RT-QT. Inicial: Carga viral, del VPH16 y -18, antes de iniciar los tratamientos. Durante (F1+F2): carga viral durante los tratamientos. Final: Carga viral al final de los tratamientos. $n=13$ en (A) y 6 en (B) en las tres fases del estudio. $^a p < 0,0001$ vs. carga viral antes del tratamiento ($^a t$ de Student).

En el modo de RT, en pacientes con disminución significativa de la carga viral, se encontró en el 62% de las pacientes una completa respuesta al tratamiento y un 15% de las pacientes no presentó una respuesta completa al mismo. Con el tratamiento de RT-QT fue encontrado que 100% de las pacientes presentaron una respuesta completa al tratamiento (Tabla III). Sin embargo, no fue observada una disminución significativa en la carga viral en los diferentes tipos de carcinomas de células escamosas en respuesta a ambos tratamientos.

El comportamiento global de la carga viral del VPH (-16 y -18) al inicio, durante y al finalizar los tratamientos se puede observar en la Figura 2. Fue observada una disminución significativa en la carga viral de VPH para ambos tratamientos en todas las etapas.

Discusión y Conclusiones

Para la genotipificación de variantes de una sola base (SNP) por medio de análisis de curvas *melting*, que se generan por PCR basada en fluorescencia, normalmente es

suficiente obtener curvas con diferencias en la T_m de 4 a 10 °C, cuya capacidad la tienen la mayoría de los termocicladores con esta tecnología (23) (26) (33-40). Herrmann *et al.* estudiaron y compararon, con la metodología de PCR en tiempo real basada en fluorescencia, 17 termocicladores que tenían la capacidad de generar y analizar curvas *melting* y encontraron que únicamente algunos (entre ellos el Rotor-Gene 3000) fueron capaces de discriminar diferencias en la T_m para SNP de clase 1 y 2 (diferencias menores a 1°C) (26).

En el presente estudio se utilizó el Rotor-Gene 3000, con el cual se desarrolló la metodología de análisis de curvas *melting*, se identificaron los genotipos 16 y 18 del VPH y se integró la identificación del virus con la fase de PCR para cuantificar la carga viral valorando el comportamiento de este virus tanto en los tratamientos de RT y de RT-QT en el CaCU.

El virus del VPH, como se mencionó anteriormente (19), puede ser un indicador fundamental para valorar en forma temprana la evolución del tratamiento para el CaCU. En el actual estudio se valoró, por primera vez, tanto el tratamiento primario con RT, como el combi-

Tabla II. Correlación entre la carga viral del VPH y la respuesta a la RT del CaCU.

ADN-VPH	% Pacientes	Respuesta a la RT*	
		RC%	NRC%
Disminución	77 (10)	62	15
No disminución	23 (3)	8	15
Total	100 (13)	70	30

*Prueba exacta de Fisher $p < 0,0001$ RC: Respuesta completa, NRC: Sin RC. Entre paréntesis se indica el número de pacientes. El término disminución o no, indica que estadísticamente hay disminución significativa o no (Tabla I).

Tabla III. Correlación entre la carga viral del VPH y la respuesta a la RT-QT del CaCU

ADN-VPH	% Pacientes	Respuesta a la RT-QT	
		RC%	NRC%
Disminución	100	100(6)	0(0)
No disminución	0	0(0)	0(0)
Total	100	100(0)	0(0)

RC: Respuesta completa, NRC: Sin RC. Entre paréntesis se indica el número de pacientes. El término disminución o no, indica que estadísticamente hay disminución significativa o no (Tabla I).

nado con RT-QT y se estudió la respuesta a ambos tratamientos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se confirma la utilidad de valorar la carga viral como un indicador potencialmente predictivo de respuesta completa o persistencia local del CaCU. Se observó que la carga viral disminuyó significativamente durante y después de ambos tratamientos, en el caso de la respuesta completa. Este es un hecho que no ha sido demostrado en estudios previos (19) (20). Por esta razón, el presente estudio es importante para detectar pacientes con riesgo potencial de desarrollar resistencia al tratamiento de RT para brindarles el beneficio de una modalidad de tratamiento adyuvante.

La infección por VPH está fuertemente asociada con el desarrollo del CaCU. El VPH-16 es responsable del 60-99% de los cánceres cervicales (5), pero no hay información sobre la historia natural de la evolución del VPH con el tratamiento de RT-QT en el CaCU. Harima *et al.* determinaron la presencia de VPH antes del tratamiento con RT y valoraron el pronóstico después del mismo (41), Bachtary *et al.* estudiaron la incidencia del VPH antes del tratamiento con RT y determinaron la importancia clínica después de este tratamiento (42), Datta *et al.* evaluaron la presencia de VPH antes y después del tratamiento con RT, como indicador predictivo de recaídas (43) y Yukata *et al.* estudiaron la presencia de VPH antes, durante y después del tratamiento con RT, como indicador de sobrevida general y de recurrencia local (20). Este estudio valoró ambos tratamientos a partir de biopsias intratumorales y analizó la evolución de la carga viral antes, durante y después, tanto en el tratamiento con RT, como con en el tratamiento combinado (RT-QT). Para el caso de la RT-QT se encontró que todas las pacientes tratadas con esta modalidad tuvieron una disminución significativa de la carga viral y con ello, una respuesta completa a este tipo de tratamiento. Además, por primera vez, fue analizada la historia natural de la infección del VPH (-16 y -18) en forma cuantitativa en ambos tratamientos.

Con respecto al número de copias virales de VPH encontradas en el estudio, Peitsaro *et al.* determinaron el número de copias virales de muestras de tejido cervical en 24 mujeres con neoplasias intraepiteliales de grado uno a tres mediante PCR en tiempo real, informando un número de copias virales totalmente heterogéneas con rangos de 1.474 a 4.687.719 (44). En este estudio, los resultados de cargas virales fueron heterogéneos para un mismo estadio. En los estudios de Dueñas *et al.*, Moberg *et al.* y Lukaszuk *et al.* se encontraron similares resultados, lo que hace suponer que el número de copias virales es independiente del estadio del CaCU (13) (45) (46). De acuerdo con la literatura, en CaCU positivo a VPH, se expresan los genes E6 y E7. Ambos son los responsables de la transformación celular al permitir la ubiquitinación y degradación de p53, IRF3, pRb, E6AP y de otras proteínas que participan en la regulación del ciclo celular. Sin

embargo, es necesaria la participación de una serie de factores para que una célula normal infectada con VPH pueda transformarse. Tewari *et al.* mencionan que la proteína codificada por el gen E7 rompe la unión funcional entre pRb (proteína retinoblastoma: regula el ciclo celular) y la histona desacetilasa—1 (HDAC-1) con la subsecuente expresión aberrante de la proteína Notch-1 lo que en turno permite la aparición del carcinoma de células escamosas en el cérvix (47).

Tewari *et al.* y Zagoutas *et al.* mencionan que la HDAC-1 refuerza la asociación entre el ADN y los nucleosomas, previniendo el acceso de los factores de transcripción a los elementos de respuesta en el ADN. Esta barrera es removida cuando E7 ubiquitina y degrada a pRb y en consecuencia impide su unión a HDAC-1. Como resultado de lo anterior, se presenta una expresión aberrante de genes que participan en la proliferación celular, así como de Notch-1 y otros genes que determinan el destino celular (47) (48). Notch-1 participa en la determinación de la progresión de células inmaduras a un estado más diferenciado. La presencia de Notch-1 en la zona de transformación cervical ha sido establecida, particularmente en la diferenciación de las células del epitelio columnar y en áreas metaplásticas. Además, los niveles de Notch-1 en células cervicales han mostrado un incremento proporcional desde las displasias leves hasta el carcinoma celular invasivo. Este comportamiento ha sido observado, en paralelo, con el incremento en los niveles de los transcritos E6 y E7 en las lesiones durante la progresión de displasias moderadas a cáncer invasivo (48).

Entonces se sugiere, por lo tanto, que como resultado de la disrupción entre HDAC-1 y pRb, la función de Notch-1 se altera permitiendo funciones aberrantes a favor de la diferenciación de las células del epitelio escamoso en lugar del epitelio columnar. Adicionalmente, además de la presencia de E6 y E7, son necesarios otros factores oncogénicos (tabaco, clamidiasis y niveles de estrógenos) para que las células con VPH se transformen en un carcinoma escamoso. Lo anterior explicaría el progreso de las lesiones cancerosas en el cérvix en forma independiente de la carga viral de VPH (48).

En este trabajo, similar al realizado por Harima *et al.* y Lai *et al.*, fue estudiada la posible asociación entre la carga de VPH y la respuesta a ambos tratamientos (41) (49). La explicación a este comportamiento puede deberse a factores intrínsecos del paciente, que no permiten establecer una asociación con el estadio de la enfermedad. Otra explicación podría ser la propuesta por Herrera *et al.*, donde menciona que el VPH es un inductor de mutaciones en el epitelio cervical; sin embargo, no es el único factor que influye en el proceso de carcinogénesis; son necesarios también los factores promotores de la proliferación policlonal y de la progresión tumoral (50). Esta explicación es apoyada por la teoría de la regresión propuesta por Ho *et al.* y Hildesheim *et al.* en la cual demostraron que únicamente el 25% de las

infecciones primarias por VPH progresan a malignidad disminuyendo el número de copias virales; por lo que durante el curso clínico de la enfermedad ya están presentes células progresando hacia el fenotipo maligno. Por lo tanto, aunque el número de copias virales disminuya durante el tratamiento, la enfermedad puede progresar por el daño previo inducido (21) (51).

Una última explicación a este comportamiento puede atribuirse a la variante de VPH presente; Berumen *et al.*, encontraron como variante más frecuentemente asociada al CaCU en población mexicana, a la variante asiático-americana (VPH-16) (52).

Este estudio es consistente con lo informado en otras investigaciones. Fakhry *et al.* demostraron que existe una asociación entre el estado tumoral del carcinoma de células escamosas de orofaringe positivo para VPH 16, 33 y 35 y la respuesta terapéutica, observando un incremento del 95% en la supervivencia de los pacientes tratados con quimioterapia (53). En este trabajo se encontró en todas las pacientes tratadas con RT-QT, una disminución significativa de las copias virales (VPH-16, -18) antes, durante y después del tratamiento del CaCU, lo que apoya los beneficios terapéuticos del uso concomitante de la RT-QT.

En la práctica clínica sobre el CaCU no es fácil diferenciar si la enfermedad ha sido controlada completamente, por lo que es crucial valorar si hay persistencia microscópica indetectable, inclusive en pacientes que presentan una respuesta completa al tratamiento. Estudios basados en ensayos de PCR han mostrado que cuando se comparan muestras de la mucosa cervical sanas y con lesiones cancerosas se producen productos de PCR fuertes (54). Basados en estos datos resulta esencial que, en los laboratorios clínicos y de investigación para pruebas con VPH, todos los procedimientos empleados sean altamente sensibles, específicos y confiables.

En este estudio se encontró que existe 7,7 veces más riesgo de persistencia local del tumor cuando no hay disminución significativa del VPH.

En conclusión, los datos sugieren que una disminución significativa o ausencia de la carga viral de VPH (16 y 18) podría ser un indicador predictivo para evaluar la respuesta del CaCU en los tratamientos de RT y RT-QT. El tratamiento con RT-QT parece ser más protector contra el desarrollo o la persistencia a largo término del carcinoma de células escamosas del cérvix en comparación con el tratamiento de RT.

CORRESPONDENCIA

M. en C. NOEMÍ CÁRDENAS RODRÍGUEZ
Instituto Nacional de Pediatría
Avenida del Imán No. 1 colonia Insurgentes-CUICUILCO,
delegación Coyoacán CP 04530 - México
Tel: 01-(55)-10840900
E-mail: noemicr222@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2007. Atlanta (GA): American Cancer Society; 2007.
2. Mohar A, Frías-Mendivil M. Epidemiology of cervical cancer. *Cancer Invest* 2000;18: 584-90.
3. Secretaría de Salud. Registro histopatológico de neoplasias malignas. México, 2007.
4. Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. Dirección general de epidemiología. México, 2006.
5. Bosch FX, Manos MM, Muñoz 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: 796-802.
6. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, *et al.* International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
7. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
8. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002; 3: 11-6.
9. Melnikow JJ, Nuovo A, Willan B, Howell, L. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 727-35.
10. Stoler M. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 16-28.
11. Lombard I, Vincent-Salomon A, Validire P, Zafrani B, de la Rochefordière A, Clough K, *et al.* Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2613-9.
12. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, *et al.* Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1361-8.
13. Dueñas A, Carrillo A, Fresnedo L, Hinojosa LM, Rojas C, Sánchez NA, *et al.* ADN del Virus del Papiloma Humano en plasma de pacientes con carcinoma cervicouterino: un potencial marcador de enfermedad residual mínima, departamento de ginecología. *Rev Inst Nac Cancerol* 1999; 45: 203-8.
14. Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, Niruthisard S, Mutirangura A. Human Papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC cancer* 2001; 1:2.
15. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squa-

- mous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *Natl Cancer Inst* 2002; 94: 102-7.
16. Tsai HT, Wu CH, Lai HL, Li RN, Tung YC, Chuang HY, *et al.* Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2544-9.
 17. Green J, Kirwan J, Tierney J, Vale C, Symons P, Fresco L, *et al.* Quimioterapia y radioterapia concomitante para el cáncer de cuello uterino (Revisión Cochrane traducida). La Biblioteca Cochrane Plus, Oxford, Reino Unido: Update Software Ltd; 2008.
 18. Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P, Fresco L, Collingwood M, *et al.* Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2001; 358: 781-6.
 19. Ishikawa H, Mitsunashi N, Sakurai H, Maebayashi K, Niibe H. The effects of p53 status and human papillomavirus infection on the clinical outcome of patients with stage IIIB cervical carcinoma treated with radiation therapy alone. *Cancer* 2001; 91: 80-9.
 20. Yutaka N, Takashi T, Hidehiko M, Toshiyuki M, Tsuyoshi Asato, Ken-ichi K, *et al.* Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1907-13.
 21. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-8.
 22. Lorincz AT. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and population screening. *J Obstet Gynaecol Res* 1996; 22: 629-36.
 23. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-60.
 24. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 2003; 49: 396-406.
 25. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003; 49: 853-60.
 26. Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem* 2007; 53: 1544-8.
 27. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR: trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 28: 23-39.
 28. Asato T, Maehama T, Nagai Y, Kanazawa K, Kariya K. A large case-control study on cervical cancer risk of HPV infection in Japan by nucleotide sequencing-based genotyping. *J Infect Dis* 2004; 189: 1829-32.
 29. Higuchi R, Fockler C, Dollinger GM, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11: 1026-30.
 30. Philip EC, Mark S, David RSt, Mark ES, Andrew GG, Brenda BR, *et al.* Semiquantitative human papillomavirus type 16 viral load and the prospective risk of cervical precancer and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1311-4.
 31. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé 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: 518-27.
 32. Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, Shera KA, Carter JJ, McKnight B, *et al.* A population based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol Oncol* 2002; 84: 263-70.
 33. Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanganserm Sri T. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol* 2008; 80: 510-4.
 34. Liu J, Yan M, Wang Z, Wang L, Zhou Y, Xiao B. Molecular diagnosis of alpha-thalassemia by combining real-time PCR with SYBR Green1 and dissociation curve analysis. *Transl Res* 2006; 148: 6-12.
 35. Yan M, Wang LR, Wang ZY, Zhou Y, Liang Y, Xiao B, *et al.* Detection of alpha thalassemia using real-time PCR and dissociation curve analysis. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2007; 24: 192-5.
 36. Worm J, Aggerholm A, Guldborg P. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. *Clin Chem* 2001; 47: 1183-9.
 37. Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* 2006; 52: 494-503.
 38. Delvenne P, Fontaine MA, Delvenne C, Nikkels A, Boniver J. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded biopsies of cervical intraepithelial lesions: analysis by immunohistochemistry in situ hybridization, and the polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1994; 7: 113-9.
 39. Guerrero E, Daniel RW, Bosch FX, Castellsague X, Muñoz N, Gili M, *et al.* Comparison of ViraPap, Southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2951-9.
 40. Szuhai K, Sandhaus E, Kolkman-Uljee SM, Lemaitre M, Truffert JC, Dirks RW, *et al.* A novel strategy for human papillomavirus detection and genotyping with SybrGreen and molecular beacon polymerase chain reaction. *AJP* 2001; 159: 29.
 41. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M. Human papilloma virus (HPV) DNA associated with prognosis of cervical cancer after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52: 1345-51.
 42. Bachtary B, Obermair A, Dreier P, Birner P, Breitenecker G, Knocke TH, *et al.* Impact of multiple HPV infection

- on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer* 2002; 102: 237-43.
43. Datta NR, Kumar P, Singh S, Gupta D, Srivastava A, Dhole TN. Does pretreatment human papillomavirus (HPV) titers predict radiation response and survival outcomes in cáncer cervix? –a pilot study. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 100-5.
 44. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 886-91.
 45. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3221-8.
 46. Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J, Wójcikowski C. Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 608-12.
 47. Tewari KS, Taylor JA, Liao SY, DiSaia PJ, Burger RA, Jomk, BJ, *et al.* Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murinehuman xenograft model. *Gyn Oncol* 2000; 77: 137-48.
 48. Zagouras Blaumeueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakronas S. Alterations in Notch signalling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6414-8
 49. Lai HC, Sun CA, Yu MH, Chen HJ, Liu HS, Chu TY. Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papillomavirus type 58 and related types. *Int J Cancer* 1999; 84: 553-7.
 50. Herrera GA, Granados GM. *Manual de Oncología. Procedimientos médico quirúrgicos*, 2a. edición. México:INCan; 2003.
 51. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, *et al.* Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169: 235-40.
 52. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, *et al.* Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1325-30.
 53. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, *et al.* Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 261-9.
 54. Giovannelli L, Campisi G, Lama A. Human papillomavirus DNA in mucosal lesions. *J Infect Dis* 2002; 185: 833-6.

Aceptado para su publicación el 30 de abril de 2010