

VARIANTES MOLECULARES DE VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV) TIPOS 16 y 18 EN ADENOCARCINOMAS DE CERVIX

MARIA ALEJANDRA PICCONI¹, LIDIA V. ALONIO¹, ALEJANDRO GARCIA CARRANCA^{2,3}, MARCELA LIZANO³,
GUADALUPE CERVANTES VAZQUEZ³, ANGELICA L. DISTEFANO¹, JUAN MURAL⁴,
GRACIELA BAZAN⁴, ANGELICA R. TEYSSIE¹

¹ Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires;
² Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF; ³ Instituto Nacional de Cancerología, México DF; ⁴ Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, Haedo, Provincia de Buenos Aires

Resumen Los virus Papiloma humano (HPV), en particular los tipos 16 y 18, son considerados carcinógenos humanos, habiéndose demostrado una asociación etiológica entre la infección con estos virus y el desarrollo del cáncer de cuello uterino. El rol viral en el carcinoma escamoso ha sido ampliamente estudiado aunque la información disponible en relación al adenocarcinoma es mucho menor, en parte debido a su baja frecuencia. En este trabajo investigamos la presencia de tipos y variantes intratípicas de HPV en adenocarcinomas de cervix. Se incluyeron 23 biopsias de archivo, fijadas y embebidas en parafina. La detección y tipificación viral se llevó a cabo mediante PCR genérica y posterior análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP). La variabilidad genética se investigó en un fragmento de 450 pb del gen L1, mediante la secuenciación directa post-PCR. Se detectaron 11 muestras positivas para HPV 16 (9 prototipos y 2 variantes: 1 europea y 1 asiática-americana), 10 para HPV 18 (9 prototipos y 1 variante europea), 1 para HPV 31 y 1 negativa. Se confirmó la asociación de HPV de *alto riesgo* con esta neoplasia, con una alta prevalencia (43%) de HPV 18 pero sin un predominio sobre los demás tipos virales, como fue publicado previamente. La variabilidad demostrada en epítopes de la proteína L1 originaron cambios aminoacídicos que podrían tener implicancias en la repuesta inmune y por lo tanto ser considerados en el diseño de vacunas.

Abstract *Molecular variants of human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in adenocarcinomas of the cervix.* Human Papillomavirus (HPV), particularly types 16 and 18, are considered human carcinogens since an etiological association has been demonstrated between these viruses and the development of cervical cancer. While the viral role in squamous carcinoma has been largely studied, the information available on adenocarcinoma is scarce, partly because of its lower frequency. In this paper we investigated the presence of HPV types and intratype variants in adenocarcinomas of the cervix. A total of 23 archive samples, fixed and paraffin embedded biopsies, were included. The detection and viral typing was performed by generic PCR and subsequent single stranded conformational polymorphism analysis (SSCP). Genetic variability was investigated in a 450 bp-fragment corresponding to L1 gene by post-PCR direct sequencing. We detected 11 HPV 16 positive samples (9 prototypes and 2 variants: 1 European and 1 Asiatic-American), 10 HPV 18 (9 prototypes and 1 European variant), 1 HPV 31 and 1 negative. The *high risk* HPV association with this neoplasia was confirmed with a high prevalence (43%) of HPV 18, (but) without predominance over the other types as previously published. The demonstrated variability in L1 protein epitopes originated aminoacidic changes which could have implications on the immune response and therefore should be considered in a vaccine design.

Key words: human papillomavirus, cervical adenocarcinoma, HPV variants, sexually transmitted diseases

Numerosas evidencias apoyan el rol etiológico de los virus *Papiloma humanos* (HPV) en el desarrollo del cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras^{1,2,3}. Esta patología representa el segundo cáncer más común en mujeres en todo el mundo y su incidencia varía entre 10

por 100 000 al año en países industrializados a más de 40 por 100 000 en países en desarrollo.

En los últimos veinte años se han identificado alrededor de 85 tipos virales, de los cuales cerca de 40 infectan el tracto anogenital. Estos virus pueden ser subdivididos en dos grupos^{1,2}: de *bajo riesgo* (preferentemente HPV 6, 11 y 42), comúnmente encontrados en condilomas acuminados y lesiones preneoplásicas de bajo grado de severidad con mínimo riesgo de progresión maligna, y los de *alto riesgo* (principalmente los tipos 16, 18, 31, 33 y 45) los cuales, bajo la forma de infección persistente, pue-

Recibido: 22-V-2000

Aceptado: 20-VI-2000

Dirección postal: Dra. María Alejandra Picconi, INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4302-5064 e-mail: oncovir@sudnet.com.ar

den conducir al carcinoma invasor. Actualmente existen evidencias suficientes para considerar que estos últimos tipos virales, en particular los HPV 16 y 18 son carcinogénicos en humanos^{2, 4, 5}. Esta evaluación está sustentada, entre otros, en hallazgos experimentales que indican que proteínas de estos virus interfieren con funciones regulatorias del ciclo celular^{6, 7}.

El criterio de clasificación de los HPV se basa en la secuencia nucleotídica del gen viral L1 que codifica para la proteína principal de la cápside⁴ y es una región altamente conservada; así, se establece un nuevo *tipo viral* cuando éste difiere en más de un 10% con la L1 de los tipos conocidos; un *subtipo* si esta divergencia oscila entre 2 y 10% y una *variante intratípica* cuando la divergencia es menor al 2%. Los primeros trabajos de variabilidad genética se iniciaron con HPV 16, por ser el virus de alto riesgo más prevalente en cáncer de cérvix, a nivel mundial. Estos estudios se basaron en la comparación de las secuencias nucleotídicas de distintos aislamientos con el virus clon referencial o prototipo, que fue el primer HPV 16 descrito. Ho y col.⁸ definieron el primer árbol filogenético basado en un fragmento de la región larga de control (LCR), a partir de aislamientos de HPV 16 realizados en los distintos continentes. Este árbol reveló cinco ramas: africanas (Af-1 y Af-2), asiática-americana (AA), europea (E) y asiática (As), quedando el clon referencial dentro de la rama E. Estudios similares de variabilidad fueron realizados para HPV 18⁹. El análisis filogenético mostró tres ramas: europea (E), africana (Af) y Asiática (As), la cual incluía al clon referencial. Posteriormente se analizaron otros genes virales, tales como L1 y L2 y los oncogenes virales E6 y E7. Las diferencias de la secuencia nucleotídica en estos genes podrían vincularse con cambios en la respuesta inmune del hospedador y en el potencial oncogénico, respectivamente^{10, 11, 12}. Se observó una fuerte covariación intergenética, por lo que las diferencias nucleotídicas halladas en una región genómica pueden usarse para distinguir los distintos linajes de HPV.

Las lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino se asientan preferentemente en el área de unión de los epitelios escamoso (ectocérvix) y columnar (endocérvix), llamada zona de transformación. Según la estirpe celular de la que se origine el tumor (epitelio escamoso o glandular), puede tratarse de un carcinoma escamoso, adenocarcinoma o mixto, además de otras variedades histológicas menos frecuentes¹³. El comportamiento biológico de los distintos tipos histológicos es diferente, siendo los adenocarcinomas en general más agresivos, refractarios a las terapias convencionales y de peor pronóstico. Si bien la relación entre la infección por HPV y el desarrollo del cáncer escamoso ha sido ampliamente estudiada, la información disponible acerca del adenocarcinoma es mucho menor, en parte debido a su baja frecuencia.

Algunos autores han asociado el HPV 16 preferentemente con carcinomas escamosos y a HPV 18 con adenocarcinomas^{1, 14}. También se ha vinculado la presencia de determinadas variantes intratípicas de los virus de alto riesgo, con el tipo histológico y el curso clínico de la lesión¹⁵. Sin embargo el rol de los distintos tipos y variantes moleculares de HPV no ha sido aún totalmente dilucidado en esta neoplasia.

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de HPV en adenocarcinomas de cérvix, identificar el tipo viral infectante y analizar la secuencia nucleotídica de la región L1 para detectar variantes intratípicas.

Materiales y métodos

Muestras: Se analizaron 23 biopsias de archivo, fijadas y embebidas en parafina, con diagnóstico histológico de adenocarcinoma invasor de cuello uterino. De las biopsias, se obtuvieron cortes de 8 µm de espesor, cuidando de limpiar bien la hoja del micrótomos entre los cortes de las distintas muestras para evitar contaminaciones.

Extracción de ADN a partir de cortes histológicos de las biopsias: El ADN fue extraído y purificado a partir de los cortes histológicos según fue previamente descrito¹⁶. Brevemente, la desparafinización se llevó a cabo por tratamiento con n-octano, con posteriores lavados con etanol absoluto y etanol 70%. El tejido fue sometido a digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. La calidad del ADN obtenido fue verificada mediante la amplificación por PCR del gen de la β-globina humana, empleando los *primers* GH20 y PCO₄ que producen un fragmento de 268 pb¹⁷.

Tipificación viral mediante el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple de los productos amplificados (PCR-SSCP): La PCR radioactiva se llevó a cabo usando los *primers* genéricos GP 5+, 6+ que amplifican un fragmento de 140 pb de la región L1¹⁸. Por cada reacción se usaron 100-250 ng ADN templado, 10 mM de Tris HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl; 3 mM de Mg₂Cl₂; 100 µM de dATP, dGTP y dTTP, 10 µM de dCTP, 0.1 µl de (α-³²P) dCTP 10 mCi/ml (Dupont), 10 pmoles de cada *primer*, 5 U de AmpliTaq (5 U/µl; Perkin Elmer), en un volumen final de 10 µl. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp 2400 con un programa que incluía: 94 °C, 3 min y 40 ciclos de 94 °C, 30 seg/45 °C, 30 seg/72 °C, 30 seg. El análisis por SSCP se efectuó de manera similar a lo descrito previamente^{15, 19, 20}. Brevemente, alícuotas de la reacción de PCR fueron diluidas, desnaturalizadas y sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida 6%-glicerol 10%, a 4 vatios, 18 horas, a temperatura ambiente. Los geles fueron secados y autorradiografiados usando películas X-OMAT-AR Kodak con pantalla intensificadora, a -70 °C. En todos los casos se sembraron en paralelo controles positivos correspondientes a los plásmidos recombinantes conteniendo los HPV tipos 6, 11, 16, 18 y 31 (cedidos gentilmente por los Dres. H. zur Hausen y A. Löhrincz). La tipificación se realizó comparando los patrones de migración de bandas, obtenidos para las muestras con aquéllos de los controles.

Análisis de la variabilidad genética de HPV 16 y 18 por secuenciación directa. Amplificación de secuencias de HPV por PCR: El ADN de las muestras fue amplificado por PCR empleando los *primers* MY 9, 11 que permiten amplificar un fragmento de 450 pb correspondiente a la región L1 del genoma viral²¹. Para una reacción se usaron 100-250 ng de ADN templado, 10 mM de Tris HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl; 3 mM de

Mg₂Cl₂; 100 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada *primer*, 5 U de AmpliTaq (5 U/µl; Perkin Elmer), en un volumen final de 10 µl. Las ampliificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp 2 400 con un programa que incluía: 94 °C, 3 min y 40 ciclos de 94 °C, 30 seg/45 °C, 30 seg/72 °C, 30 seg. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en agarosa 1.5%.

Reacción de secuenciación: Los productos de la PCR anterior, previamente purificados por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión²², fueron amplificados usando los reactivos del equipo *AmpliCycle* (Perkin Elmer) y el protocolo del fabricante, con algunas modificaciones. Brevemente, la mezcla para cada una de las muestras contenía alrededor de 5 a 8 µl del ADN templado, 60 pmoles del *primer* (MY 11 o MY 9), 4 µl de la mezcla de secuenciación 10 X, 0.1 µ Ci (α-P³²) dCTP y H₂O hasta completar 30 µl. Se distribuyeron 6 µl de esta mezcla en cada uno de los cuatro tubos conteniendo 2 µl de los reactivos para las reacciones de terminación (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). El ciclado se realizó en un termociclador Perkin Elmer 2 400 con un programa que incluía: 94 °C, 3 min y 25 ciclos de 95 °C, 30 seg/55 °C, 30 seg/72 °C, 30 seg. La reacción se realizó con uno de los *primers*; en los casos en que se observaron cambios respecto del virus prototipo, se procedió a secuenciar ambas cadenas.

Gel de secuencia: Se preparó un gel de acrilamida/bisacrilamida 8%, urea 7 M. Se recorrió durante 20 a 60 minutos a 50-70 vatios y 1 700 V. Las muestras de la reacción de secuenciación fueron desnaturalizadas por calentamiento durante 3 min a 94 °C y se sembraron 1-3 µl por calle. La corrida se realizó durante 1 hora 30 min - 2 horas, en las mismas condiciones que la pre-corrida. Los gels fueron secados y expuestos a películas Kodak X-OMAT-AR con pantalla amplificadora, entre 1 y 5 días.

Resultados

Se analizó la presencia de HPV en 23 biopsias fijadas y embebidas en parafina con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de cérvix. Todas las muestras amplificaron el fragmento del gen de la β-globina humana por lo que fueron consideradas adecuadas para este estudio.

La PCR-SSCP permitió detectar HPV en el 95% de los casos (22/23), siendo positivos el 39% (9/23) para HPV 16, el 39% (9/23) para HPV 18 y el 4% (1/23) para HPV 31; el 4% (1/23) resultó HPV negativo (Fig. 1). En tres muestras (13%), el patrón de bandas obtenido no

coincidió con ninguno de los controles ensayados, por lo que el tipo viral no pudo ser determinado por esta metodología.

Los estudios de secuenciación realizados en un fragmento de 450 pb del gen L1, permitieron caracterizar los casos HPV positivos y analizar la variabilidad genética viral. Las tres muestras que habían permanecido indeterminadas por PCR-SSCP correspondieron a 2 variantes intratípicas de HPV 16 (1 AA y 1 E) y variante E de HPV 18 (Tabla 1). La variante HPV 16-AA mostró seis

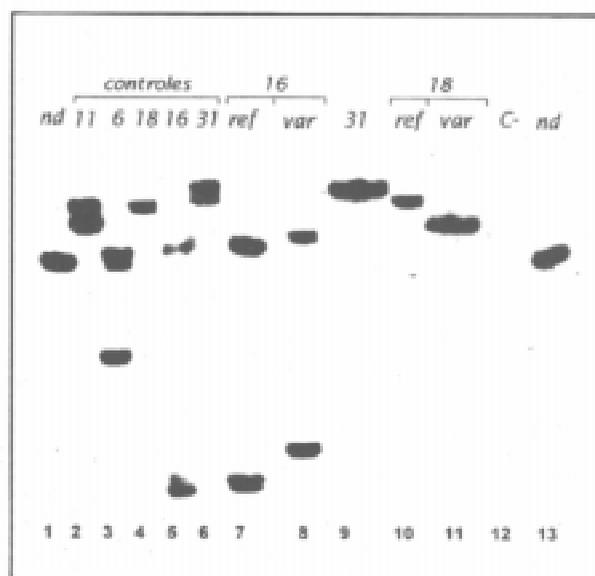


Fig. 1.- Tipificación de HPV por PCR-SSCP en adenocarcinomas de cérvix. Los ADN extraídos y purificados a partir de los cortes histológicos, fueron amplificados con los *primers* GP5+, 6+, empleando un precursor radiactivo. Los productos de la PCR fueron desnaturalizados y analizados por electroforesis en gels de poliacrilamida 6%-glicerol 10%, como se describe en Materiales y Métodos. Calles: 1 y 13, controles no desnaturalizados (*nd*); 2-6, controles de HPV; 7-11: muestras positivas para HPV tipo 16 referencial (*ref*) y variante (*var*), HPV y HPV 18 referencial (*ref*) y variante (*var*), respectivamente; 12, control negativo.

TABLA 1.- Cambios de nucleótidos y aminoácidos detectados en el gen L1 de las variantes de HPV 16 y 18

| HPV16 | | HPV18 | |
|-------------|---------------|------------|---------------|
| Variante AA | | Variante E | |
| nt | aa | nt | aa |
| 6694 A → C | 279 Thr → Pro | 5961 T → C | 6625 C → G |
| 6720 G → A | | 6241 C → G | 228 His → Asp |
| 6802 A → T | 415 Thr → Ser | 6433 A → G | 292 Thr → Ala |
| 6853 C → T | | | 6719 G → A |
| 6864 C → T | | | 6749 G → A |
| 6969 C → T | | | 6842 C → G |
| | | | 6917 C → A |
| | | | 399 Pro → Arg |

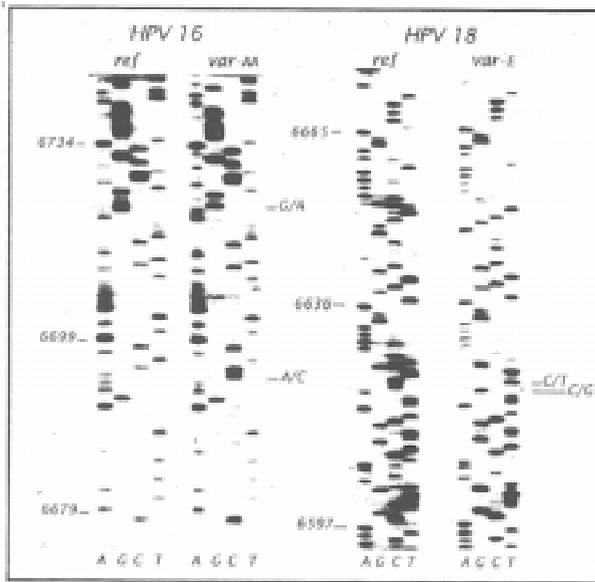


Fig. 2.— Variantes intratípicas de los HPV tipos 16 y 18. Se realizó la secuenciación directa de un fragmento de 450 pb de la región L1, previamente amplificado por PCR. La radioautografía muestra los cambios de secuencia observados en las variantes (*var*) respecto de los virus referenciales (*ref*). Las posiciones de las bases están indicadas en el margen izquierdo; los cambios de bases encontrados están señalados en el margen derecho.

cambios respecto del prototipo (Fig. 2); cuatro de ellos fueron silenciosos y sólo dos originaron modificaciones en codones: prolina reemplazó a treonina (aminoácido 279) y serina a treonina (aminoácido 415). La variante HPV16-E mostró tres cambios nucleotídicos, dos de los cuales produjeron cambios en aminoácidos: aspártico en lugar de histidina (codón 228) y alanina en lugar de treonina (codón 292). La variante de HPV 18-E presentó seis bases cambiadas respecto del prototipo (Fig. 2), cinco de ellas silenciosas y una resultó en una sustitución de prolina por arginina (codón 399). Los cambios de secuencia en HPV 16-AA y HPV 18-E estaban localizados en la región que codifica para epítopes de la proteína L1.

Las muestras restantes, tipificadas por PCR-SSCP, correspondieron en todos los casos a HPV referenciales. No se detectaron coinfecciones con más de un tipo viral o variantes.

Discusión

La asociación de HPV con la génesis del adenocarcinoma es un campo poco investigado²³. En este estudio se ha enfocado la probable vinculación de tipos y variantes de HPV con el desarrollo de esta neoplasia.

La incidencia mundial del carcinoma escamoso de cérvix tiende a declinar debido a la aplicación de progra-

mas de control, mientras que los casos de adenocarcinoma parecieran estar en aumento, en especial en mujeres entre 20 y 30 años; algunos autores han vinculado este hallazgo con el uso de anticonceptivos orales y/o con la infección por HPV^{24, 25, 26}.

El análisis por PCR-SSCP es uno de los ensayos más sensibles para la detección de diferencias mínimas en la secuencia nucleotídica, incluyendo las mutaciones puntuales²⁷. Este método fue adaptado para la tipificación de HPV, permitiendo identificar, en una única reacción, un amplio espectro de HPV que infectan el tracto anogenital. Esto fue posible debido a que los patrones de bandas obtenidos para cada tipo viral fueron específicos y las diferencias migratorias reproducibles, evitando así una posterior restricción enzimática o hibridación^{15, 19, 20}. La aplicación de PCR-SSCP en este estudio, permitió determinar satisfactoriamente el tipo viral en el 86% de las muestras positivas. Por otro lado, se observaron patrones de bandas atípicos en 3 muestras, que al ser secuenciadas resultaron ser variantes intratípicas; aunque no se detectaron en este estudio, dichos patrones podrían también corresponder a infecciones mixtas o tipos virales distintos de los ensayados.

Se ha demostrado que durante el proceso de transformación maligna genital asociada a HPV, el virus se integra en el ADN celular pudiendo perderse por delección algunas porciones de su genoma tales como L1, L2, E1 y E2, mientras que los oncogenes virales E6 y E7 siempre se conservan²⁸. Estas delecciones podrían explicar el caso HPV negativo, por lo que éste debería ser reevaluado analizando los genes E6 o E7, antes de descartar la participación viral.

La detección exclusiva de HPV de alto riesgo oncogénico (tipos 16, 18 y 31) confirma su fuerte asociación con adenocarcinomas. Si bien no se encontró un predominio de HPV 18 como habían informado previamente algunos autores^{1, 14}, la similitud hallada en los porcentajes de detección de los tipos 16 y 18 (48 y 43%, respectivamente), evidenció un patrón de distribución viral distinto al observado en los tumores cervicales de origen escamoso (50 y 14%, respectivamente)¹. Se ha demostrado una evolución más rápida hacia la malignidad en las lesiones escamosas de cérvix asociadas a HPV 18²⁹, por lo que su elevada frecuencia en adenocarcinomas podría explicar la mayor agresividad y peor pronóstico que en general muestran estas neoplasias.

Las tres muestras HPV positivas indeterminadas por PCR-SSCP, resultaron ser dos variantes de HPV 16 y una de HPV 18. La variante de HPV 16 asiática-americana detectada^{8, 10, 30}, fue también descrita en Brasil en una población indígena⁸ y en México¹⁵, en cáncer cervical en mujeres más jóvenes que las infectadas con el virus prototipo. Se ha especulado que la infección más temprana y persistente con esta variante, representaría mayor riesgo de evolución maligna y podría explicar, en

parte, la alta incidencia de cáncer de cérvix en ciertas regiones de Latinoamérica¹⁵. La otra variante HPV16 perteneciente a la rama europea^{8, 10, 30}, presenta una amplia distribución mundial¹¹. La variante europea de HPV 18 hallada^{9, 30} fue descrita también en pacientes mexicanas (var-1) asociada a lesiones cervicales escamosas, glandulares y mixtas¹⁵.

En base a las inferencias filogenéticas y a los datos de co-evolución virus-hospedador, se ha propuesto que el origen de los distintos HPV estaría en concordancia con los patrones de migración humana⁸. Así, las variantes de HPV 16 de la rama asiática-americana estarían asociadas a etnias nativas americanas, cuyos ancestros habrían llegado cruzando el estrecho de Bering. Por otro lado, las variantes europeas, podrían haber llegado a Sudamérica principalmente durante la colonización española; en nuestro país debe, además, tenerse en cuenta la fuerte inmigración europea en las primeras décadas del siglo XX. Los datos obtenidos son coherentes con las características de la población estudiada, en su mayoría descendientes de europeos.

Otro aspecto de interés en el estudio de la variabilidad genética viral está relacionado con sus posibles implicancias patogénicas. Algunos autores han sugerido que las variantes de HPV 16 no europeas/no prototípicas mostrarían un mayor potencial oncogénico^{31, 32, 33}; sin embargo, posteriormente se señaló que este fenómeno dependería de la población en estudio, debido a polimorfismos en genes celulares involucrados en la carcinogénesis por HPV^{34, 35}. En los adenocarcinomas analizados en este trabajo, a nivel de tipos virales y variantes en la región L1, se observó un franco predominio de HPV 16 y 18 prototípicos, detectándose un 14% de variantes. Será necesario ampliar los estudios de prevalencia de tipos y variantes en la población a fin de establecer su frecuencia y el riesgo relativo asociado con el desarrollo del cáncer de cérvix.

Las variaciones de la secuencia nucleotídica de los HPV 16 y 18 encontradas en este estudio determinan cambios de aminoácidos que afectan epítopes lineares de la proteína L1^{31, 36, 37, 38}. Si bien se ha sugerido que las distintas variantes de HPV 16 presentarían seroreactividad cruzada³⁹, el tema genera aún controversias. Un aspecto a considerar es si la variabilidad de los epítopes de L1 induce cambios en la respuesta inmune, ya que de estos depende el efecto protector mediante anticuerpos neutralizantes y linfocitos T citotóxicos. La probable diferencia funcional entre las variantes y los virus prototípicos no es una cuestión menor si se considera que las vacunas profilácticas en desarrollo^{40, 41} están basadas en estos últimos y podrían no ser efectivas en poblaciones con alta frecuencia de variantes circulantes.

Este trabajo aporta los primeros datos de Argentina en el campo de la epidemiología molecular, referidos al

estudio de los tipos y variantes de HPV en adenocarcinomas de cérvix.

Agradecimientos: Los autores agradecen la asistencia técnica de Miriam C. Guido (UNAM) y Joaquín V. González (Instituto Malbrán) y la colaboración de Jorge A. Basiletti en la preparación de las figuras. Este trabajo fue subsidiado en parte por el Convenio CONICET (Argentina) - CONACYT (México) y la Fundación Mosoteguy, Buenos Aires.

Bibliografía

1. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, et al. International biological study on cervical cancer (IBSCC). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC)-Working group. Human Papillomaviruses. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 64. Lyon: IARC- World Health Organization, 1995.
3. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
4. zur Hausen H. Papillomavirus infection- a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288, F55-F78.
5. Villa LL. Human papillomavirus and cervical cancer. *Advances Cancer Res* 1997; 71: 321-41.
6. Münger K, Werness BA, Dyson N, et al. Complex formation of human papillomavirus E7 protein with the retinoblastoma tumor suppressor gene. *EMBO J* 1989; 8: 4099-105.
7. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-9.
8. Ho L, Chan SY, Burk RD, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 1993; 67: 6413-23.
9. Ong CK, Chan SY, Campo MS, et al. Evolution of Human Papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human groups. *J Virol* 1993; 67: 6424-31.
10. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States population characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2 and L1 coding segments. *J Virol* 1995; 69: 7743-53.
11. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71: 2463-72.
12. Villa LL, Rahal P, Franco EL. Molecular variant analysis as a tool in natural history studies of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. In: Franco EL, Monsonego J, (eds). *New Developments in Cervical Cancer Screening and Prevention*. London: Blackwell Science Ltd; 1997, p 379-85.
13. Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix: histologic variables associated with lymph node metastasis and survival. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 912-7.
14. Tase T, Okagaki T, Clark BA, et al. Human papillomavirus types and localization in adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix: a study by in situ DNA hybridization. *Cancer Res* 1988; 48: 993-6.
15. Lizano M, Berumen J, Guido MC, et al. Association between Human Papillomavirus type 18 variants and histology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1227-31.

16. Wright D, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In Innis M, editor. PCR protocols. A Guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich; 1990. pp 153-8.
17. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, et al. Analysis of enzymatically amplified beta-globin HLA-DQalpha DNA with alleles-specific oligonucleotide probes. *Nature (Lond)* 1986; 324: 163-6.
18. Jacobs MV, De Roda Husman AM, van den Brule AJ, et al. Group-specific differentiation between high and low human papillomavirus genotypes by general primers-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 901-5.
19. Distéfano A, Picconi MA, Alonio LV, et al. Persistence of human papillomavirus in cervical lesions after treatment with diathermic large loop excision. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1998; 6: 214-9.
20. Picconi MA, Eiján AM, Distéfano AL, et al. Human Papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: Analysis of primary tumors and lymph nodes. *J Med Virol* 2000; 61: 65-9.
21. Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.
22. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
23. Teshima H, Beaudenon S, Koi S, et al. Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Arch Gynecol Obstet* 1997; 259: 169-77.
24. Quinn MA. Adenocarcinoma of the cervix. *Ann Acad Med Singapore* 1998; 27: 662-5.
25. Tenti P, Zappatore R, Carnevali L. Analysis of human papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol* 1999; 12: 1192-3.
26. Lacey JV, Brinton LA, Abas FM, et al. Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 1079-85.
27. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 875-9.
28. Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk association of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-37.
29. Kurman RJ, Schiffman RH, Lancaster WD, et al. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 293-6.
30. Myers G, Baker C, Wheeler C, et al. Human papillomaviruses 1996. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos (NM): Theoretical Biology and Biophysics Group. 1996.
31. Zhebe I, Wilander E, Delius H, et al. Human Papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998; 58: 829-33.
32. Xi LF, Koutsky LA, Galloway D, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 796-802.
33. Zehbe I, Tommasino M. The etiological significance of human papillomavirus type 16 variants for the development of cervical neoplasia. *Papillomavirus Rep* 1999; 10: 105-16.
34. Zehbe I, Voglino G, Delius H, et al. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet* 1998; 352: 1441-2.
35. van Duin M, Snijders PJF, Vossen MTM, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000; 81: 317-25.
36. Pushko P, Sasagawa T, Cuzik J, et al. Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1994; 75: 911-6.
37. Heino P, Skyldberg B, Lehtinen M, et al. Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. *J Gen Virol* 1995; 76: 1141-53.
38. Touzé A, El Mehdaoui S, Sizaret PY, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2046-51.
39. Cheng G, Icenogle JP, Kimbauer R, et al. Divergent human papillomavirus type 16 variants are serologically cross-reactive. *J Infect Dis* 1995; 172: 1584-7.
40. Muñoz N, Crawford P, Coursaget P. HPV vaccines and their potential use in the prevention and treatment of cervical neoplasia. *Papillomavirus Rep* 1995; 6: 54-5.
41. Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses: prophylactic vaccine prospects. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1423: M1-8.

It was a high counsel that I once heard given to a young person, 'Always do what you are afraid to do'.

Fue un importante consejo el que una vez oí darle a un joven 'Haz siempre lo que tengas miedo de hacer'

Ralph Waldo Emerson (1803-1882)

Essays: Heroism, 1841