

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
PEDECIBA

Detección y Genotipificación de Virus Papiloma Humano (VPH) circulante en Uruguay, diversidad y análisis de la expresión de marcadores oncogénicos.

Lic. Viviana Ramas

ORIENTADOR: Dr. Juan Arbiza

CO-ORIENTADOR: Dra. Dora Ruchansky

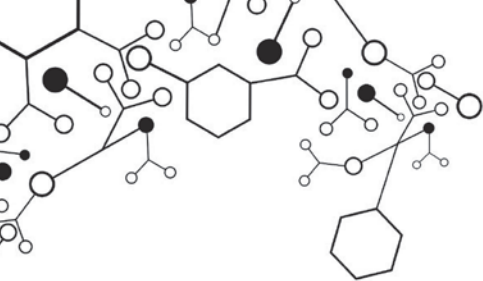
LUGAR DE REALIZACIÓN: Sección Virología, Facultad de Ciencias y Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, UdelAR y Departamento de Laboratorios de Salud Pública, MSP.

FECHA DE DEFENSA: 15 de diciembre de 2016



Contenido

RESUMEN	3
ANTECEDENTES	5
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	5
Historia	5
Clasificación Taxonómica	6
Clasificación Epidemiológica	8
Principales características de la estructura viral	8
Organización Genómica	9
Ciclo Viral	10
Expresión de proteínas virales	14
Patogenia	16
Inmunidad	19
CLÍNICA DE LAS LESIONES CAUSADAS POR INFECCIÓN CON VPH MUCOSOS	22
Verrugas anogenitales o condilomas	22
Condilomas en la cavidad oral	22
Cáncer de cabeza y cuello	22
Papilomatosis respiratoria recurrente	23
Lesiones Intraepiteliales de bajo y alto grado y cáncer de cérvix	23
Cáncer de cérvix	23
EPIDEMIOLOGÍA	24
Situación mundial	24
Situación en Uruguay	25
MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VPH Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	26
Detección molecular	26
Detección citológica e histopatológica	27
Detección Serológica	28
VACUNAS	29
FACTORES DE RIESGO Y POSIBLES MARCADORES ONCOGÉNICOS	30
IMPORTANCIA DE LA TEMÁTICA A ABORDAR	30
OBJETIVOS	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
FLUJOGRAMA DEL MANUSCRITO	32



CAPITULO 1	33
CIRCULACIÓN DE GENOTIPOS Y VARIANTES DE VPH 16 EN URUGUAY	33
FRECUENCIA Y CIRCULACIÓN DE GENOTIPOS DE VPH EN URUGUAY	33
Genotipos circulantes en población general	33
Genotipos circulantes en población viviendo con VIH	41
Materiales y Métodos	41
Resultados	45
Discusión	50
VARIABILIDAD GENOTIPO 16	51
Población general	52
Población viviendo con VIH	65
Materiales y Métodos	65
Resultados	65
Discusión	70
CAPITULO 2	73
POLIMORFISMOS DEL GEN SUPRESOR DE TUMOR p53	73
Introducción	73
Materiales y Métodos	74
Resultados	77
Discusión	81
CAPITULO 3	83
CARGA VIRAL	83
EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES e6 Y e7	84
Materiales y métodos	84
Resultados	92
Discusión	99
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	101
Discusión general	101
Conclusiones	105
Perspectivas	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

Resumen

Desde la época de griegos y romanos, los condilomas genitales fueron agrupados con otras infecciones de transmisión sexual como la sífilis o gonorrea. No fue hasta 1907, donde se determinó la etiología viral por la inoculación de un filtrado libre de células y observación del desarrollo de un tumor. Sin embargo, hoy en día, el principal interés en la infección por el virus de papiloma humano (VPH) radica en su asociación con el desarrollo de carcinomas. Varios estudios a gran escala en muestras de carcinomas de cérvix, demostraron que la infección por éste virus era causa necesaria, aunque no suficiente, del desarrollo de carcinomas, hallándose una positividad de más del 90%, y que la distribución de genotipos de VPH de tropismo mucoso varía de acuerdo a la región geográfica de donde provienen la muestras analizadas.

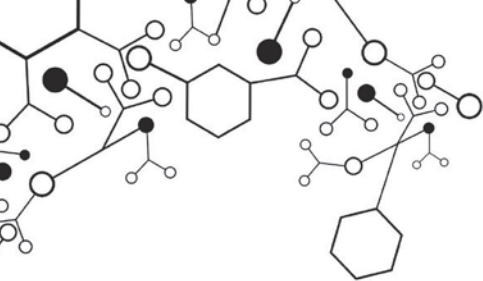
El carcinoma de cérvix ocupa la séptima posición de los carcinomas más frecuentes para ambos sexos y es el tercer tipo de cáncer más común en mujeres, además es la cuarta causa de muerte por cáncer entre la población femenina, después del cáncer de mama, el de pulmón y el colorectal. Aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de cuello de útero tiene lugar en países en desarrollo, donde representa el 12% de los cánceres de mujeres; en los países desarrollados sólo representa el 3,5% de los nuevos casos de cáncer.

El objetivo general de ésta tesis radica en investigar los genotipos circulantes de VPH procedentes de pacientes con distintos grados citológicos, inmunocompetentes y viviendo con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). También indagar en otros aspectos virológicos que aportan a la epidemiología de la infección en nuestro país, además de evaluar algunos posibles marcadores oncogénicos.

Los genotipos de VPH hallados en células cervicales recogidas de mujeres uruguayas en población general y en pacientes viviendo con VIH, fueron de 41,9% y del 32% respectivamente, aunque es importante notar, que la frecuencia de éste último en su mayoría proviene de muestras sin lesión. En cuanto a la distribución de genotipos de alto riesgo oncogénico, el VPH 16 fue el primero en frecuencia, seguido del 58 y 68 en población general y 18, 31 y 62 en población viviendo con VIH. Los VPH de bajo riesgo oncogénico más comúnmente detectados, resultaron el VPH genotipo 6 y 61 en ambas poblaciones.

Estudios moleculares del VPH 16 mostraron una variabilidad dentro del genotipo, región geográfica dependiente, revelando que las distintas variantes se diferencian según su potencial oncogénico, demostrando que las variantes no Europeas son más agresivas que las variantes Europeas. En este estudio se analizaron secuencias de pacientes de





población general y de pacientes viviendo con VIH para la región de control (LCR) del genoma viral, y para los oncogenes, e6 y e7. De éstos análisis se determinó que LCR es la región más variable, presentó el mayor número de mutaciones, seguida de e6 y e7. Las transversiones G7521A para LCR y la T350G en e6, fueron las más frecuentes en ambas poblaciones. Las mutaciones puntuales C712A, T789C y T795G, fueron detectadas en el gen e7 en población general, en pacientes viviendo con VIH no se observaron mutaciones en éste gen. Los estudios filogenéticos realizados para las 3 regiones estudiadas, presentaron una amplia mayoría de variantes Europeas, 90% en población general, 6% de variantes Asiático-americanas y 4% de variantes Africanas. En población viviendo con VIH el 100% fueron Europeas, pero esta diferencia puede deberse a la menor cantidad de muestras analizadas en este grupo.

Los distintos polimorfismos del gen supresor de tumor p53, en algunos estudios realizados en muestras de carcinomas, mostraron que los alelos Arg/Arg son más frecuentemente detectados en carcinomas que los Arg/Pro y los Pro/Pro, por lo que podría usarse como marcador oncogénico. Los resultados de este estudio revelaron una frecuencia del polimorfismo Arg/Pro mayor al 50%, seguida del polimorfismo Arg/Arg y el detectado en menor frecuencia fue el polimorfismo Pro/Pro. Sin embargo, los estudios estadísticos realizados no mostraron evidencias significativas en la asociación de pacientes con lesión y sin lesión con los polimorfismos Arg/Arg, lo que podría estar sesgado por el uso de lesiones precancerosas en lugar de muestras de carcinomas.

La persistencia de una infección por VPH está asociada a altas cargas virales, implicando una replicación viral muy activa, el uso de las mismas como marcador oncogénico es hoy día aun discutido. En este trabajo se diseña y optimiza una PCR en tiempo real, metodología, que no ha sido descrita que fuera aplicada para muestras de cérvix en nuestro país, se determinaron por cuantificación absoluta, las cargas virales de 30 muestras de población general y 10 de mujeres viviendo con VIH. Los resultados obtenidos revelaron un aumento de las cargas virales del grupo de muestras de pacientes con lesión con respecto al grupo control, pudiendo utilizarse éste dato como marcador oncogénico. Varios estudios determinaron que la expresión de las oncoproteínas se correlaciona con el aumento en la severidad de la lesión, se logró poner a punto una RT-PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de los oncogenes del VPH 16, sin embargo, no se pudo asociar la cuantificación con la gravedad de la lesión.

Este es el primer estudio transversal que describe la distribución de genotipos del VPH circulantes y sus frecuencias en mujeres uruguayas, la diversidad genética del genotipo más prevalente y la asociación con posibles marcadores de oncogénicos. Esta información podrá ser de utilidad para el médico tratante en cuanto al tipo de tratamiento a seguir, según el tipo de lesión, el genotipo descrito y el estado general del paciente. La información que se reporta aquí, es a un nivel macro, de importancia para los tomadores de decisiones locales en pro de una mejora en las estrategias de prevención y vacunación.



Antecedentes

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

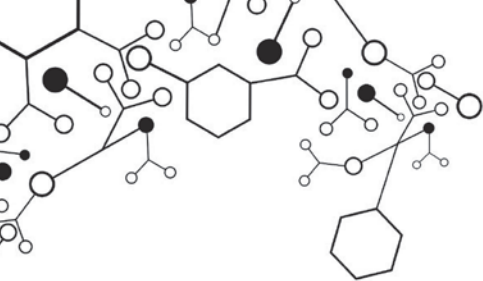
HISTORIA

No fue hasta el siglo XX que las verrugas genitales se estudiaron y se les adjudicó un origen viral. Sin embargo, ya en tiempos de griegos y romanos, las verrugas genitales se agrupaban con otras enfermedades de transmisión sexual como la sífilis y gonorrea.

En 1907, Ciuffo y colaboradores, establecieron el origen viral de las verrugas comunes en la piel, al demostrar que era posible inducir su formación mediante la transmisión de persona a persona de un filtrado del tumor libre de células (Ciuffo, 1907).

En 1933 Shope, aisló el primer virus papiloma (VP) en conejos colas de algodón, caracterizando la naturaleza transmisible de los papilomas cutáneos que afectaban a los conejos silvestres. Este VP, actualmente denominado CRPV (por sus siglas en inglés, Papilomavirus del Conejo Cola de Algodón), fue el primer virus oncogénico animal identificado (Shope and Hurst, 1933).

Históricamente, los VP fueron clasificados dentro de la familia *Papovaviridae*, junto con los poliomavirus por compartir apariencia cuando se observan por microscopía electrónica y propiedades biológicas similares, cápside icosaédrica de 72 capsómeros, virus no envueltos, ADN doble cadena circular, etc. Sin embargo, más tarde por diferencias en la estructura genómica y en los mecanismos de transcripción, el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, siglas en inglés) separa en dos familias a estos virus, los poliomavirus dentro de la familia *Papovaviridae* y los PV en la nueva familia llamada *Papillomaviridae* (Hoory et al., 2008).



CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

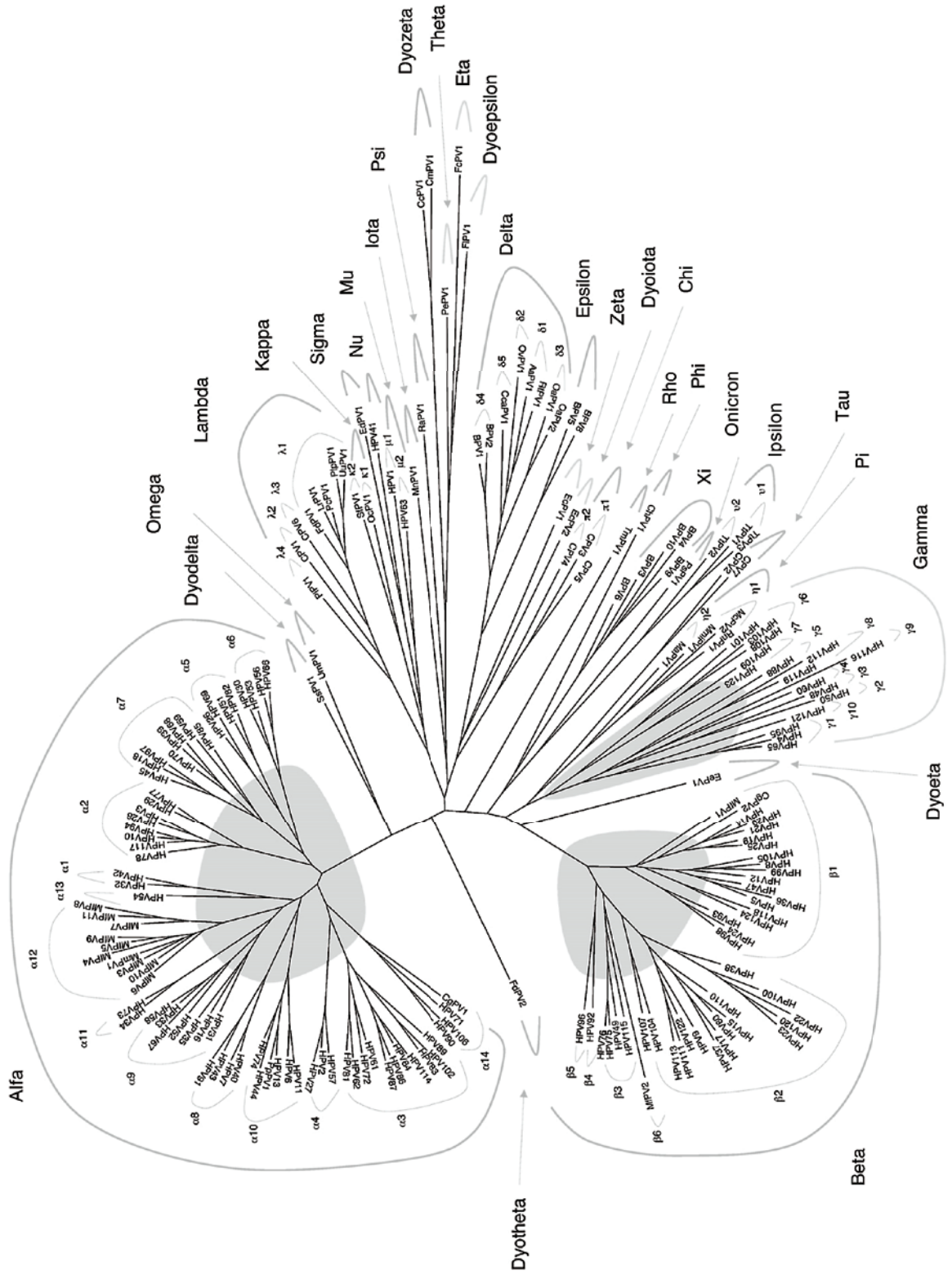
La familia *Papillomaviridae* comprende una serie de virus productores de papilomas específicos del hospedador, que han sido detectados en una gran variedad de animales, incluido el hombre (Bernard et al., 1994; de Villiers et al., 2004). Se han descrito más de 200 genotipos de PV; en el presente, se han reportado más de 100 genotipos distintos de VP que infectan específicamente al hombre, alrededor de 40 de éstos, tienen tropismo por la mucosa genital (Trottier and Burchell, 2009; Trottier and Franco, 2006).

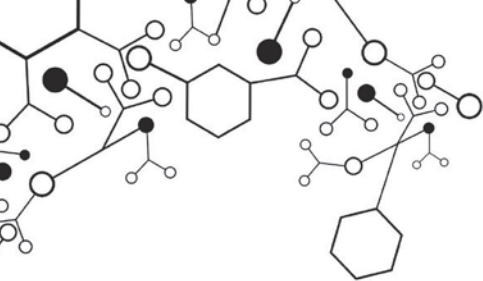
El gen L1 codifica para la proteína mayoritaria de la cápside y es el más conservado del genoma, es por ello que ha sido utilizado para la clasificación de éste virus y la identificación de nuevos tipos en los últimos años, aunque la clasificación taxonómica de esta familia está en constante revisión, sigue siendo la diferenciación de la secuencia nucleotídica de L1 la única forma de clasificación. Cuando existe una homología entre secuencias del 60%, es un mismo género; cuando la homología es entre 60% y 70%, es una especie dentro de ese género (clasificación de uso común); hablamos de genotipo cuando la homología es entre el 71% y 89% (llamada especie por el ICTV, genotipo es el nombre de uso común); de subtipo entre 90% y 98% y de variante cuando existe más de un 98% de homología en la secuencia del gen que codifica la proteína L1. Esta definición fue llevada a cabo por un grupo de trabajo de científicos en el International Papillomavirus Workshop en Quebec 1995, pero revisada y actualizada posteriormente (Bernard et al., 2010; Burk, 2016; de Villiers, 2013).

En la actualidad, existen 30 géneros, nombrados con las primeras letras del alfabeto griego (Alfa-Zeta, 24 y 6 nombrados con el prefijo Dyo+letra griega), cada uno de ellos contiene varias especies, genotipos, subtipos y variantes. Dentro de los 30 géneros sólo cinco de ellos infectan humanos: alfa, beta, gamma, mu y nu-papilomavirus, el resto infecta otros animales. Por ejemplo, los del género delta y lambda infectan ungulados y perros causando fibropapilomatosis y lesiones benignas en mucosa y piel, respectivamente (Figura 1) (Bernard et al., 2010; de Villiers, 2013).

FIGURA 1:

Árbol filogenético inferido de 189 secuencias nucleotídicas del marco de lectura abierto de L1. Los números en los extremos de cada rama identifican el genotipo de VPH, los números sobre los semicírculos internos que abarcan varias ramas, identifican las especies dentro de cada género, y los externos, que incluyen más clústeres, indican los géneros. Adaptado de (Bernard et al., 2010).





CLASIFICACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

En el género *Alfapapilomavirus* existen alrededor de 40 genotipos que infectan la mucosa genital, estos se han clasificado en dos grandes grupos según su asociación epidemiológica con el cáncer cervical, en virus papiloma de alto riesgo (VPH-AR), por su asociación a carcinomas, y de bajo riesgo (VPH-BR), definidos así por su limitada evidencia en cáncer. Los VPH-AR son aquellos relacionados con la progresión de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés) y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, por sus siglas en inglés), y el desarrollo de carcinomas. Por otra parte, los VPH-BR están asociados a estados asintomáticos o a LSIL o verrugas genitales (Bosch et al., 1995; Munoz et al., 2003).

El genotipo 16 es el VPH-AR más potente y conocido, que causa carcinomas en diversos sitios del tracto genital y el más prevalente a nivel mundial. Los genotipos 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 son considerados también VPH-AR por presentarse con suficiente evidencia en los estudios de cáncer. El genotipo 68 exhibe una limitada detección en carcinomas, sin embargo presenta fuerte evidencia de mecanismos oncogénicos en cáncer cervical. Los genotipos 26, 53, 66, 67, 70, 73 y 82 son posibles VPH-AR pero la evidencia en cáncer cervical es escasa. En este grupo también se encuentran el genotipo 30, 34, 69, 85 y 97 que se clasifican así por su analogía filogenética con los VPH-AR pero tienen limitada evidencia en humanos. Por otro lado los únicos VPH-BR, son 6, 11, 61 y 81 estos infectan mucosas, causan verrugas genitales o condilomas que son de simple y rápido tratamiento y nula evidencia en carcinomas. El resto de los VPH del género *Alfapapilomavirus* están menos estudiados, sus frecuencias en lesiones pre-cancerosas y carcinomas son pequeñas o inexistentes y están poco documentadas (Bouvard et al., 2009).

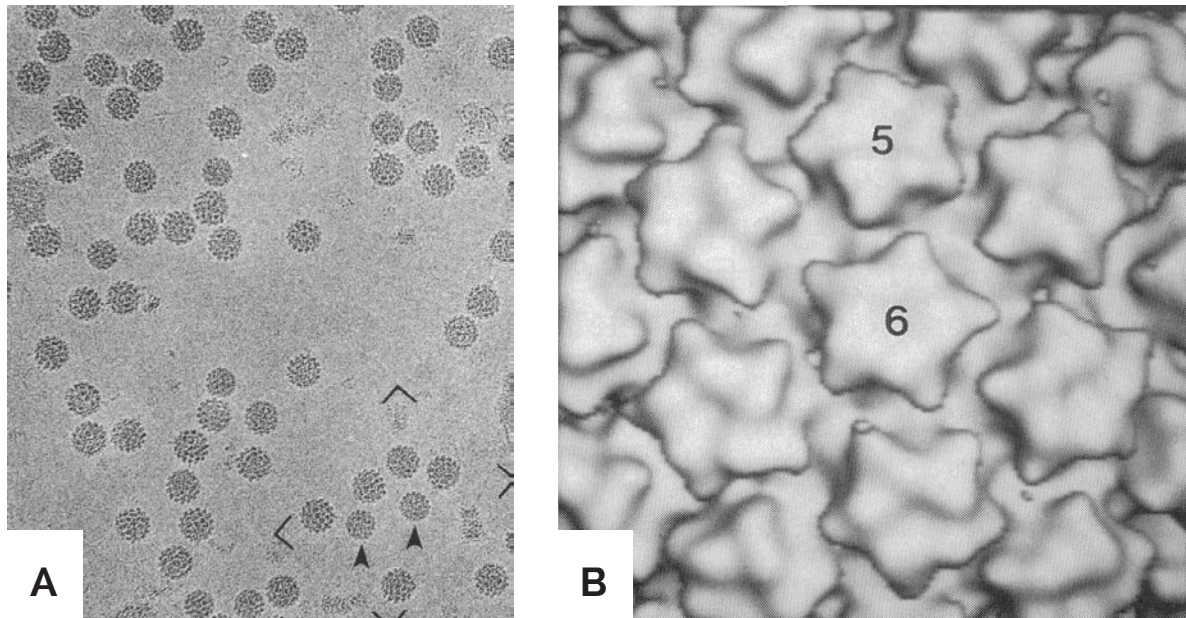
PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA ESTRUCTURA VIRAL

Los VPH son virus pequeños, con un diámetro que varía de 52 a 55 nanómetros, con genoma de ADN doble cadena circular de aproximadamente 8000 pares de bases, todos los marcos de lectura abiertos se localizan en una de las hebras del ADN, indicando que todos los genes virales están localizados en una sola hebra del ADN. Además, estudios transcripcionales indicaron que solo una hebra es la que sirve como molde para la transcripción viral. Los viriones están formados por un core central de ADN incluido por una estructura icosaédrica de proteínas sin envoltura externa, una de las causas de su baja antigenicidad (Reid and Campion, 1988). La cápside icosaédrica está compuesta por 72 capsómeros que se agrupan en una organización triangular, T=7. El uso de crio-microscopía electrónica, reveló que las cápsides se forman por dos tipos de capsómeros. Los hexavalentes contactan 6 capsómeros vecinos y los pentavalentes que unen 5 capsómeros vecinos (Figura 2).

La cápside viral está constituida por dos proteínas estructurales L1 y L2, L1 tiene un peso molecular de aproximadamente 55 KDa, y representa el 80% del total de proteína viral. La proteína minoritaria de la cápside L2, tiene un peso molecular de alrededor de 70 KDa, y se piensa que juega un papel de soporte entre los 72 pentámeros de la proteína L1 (Baker et al., 1991).

FIGURA 2:

Crio-microscopía electrónica de Papilomavirus Bovino-1 (PVB-1). 2 B: Pentámeros y hexámeros que forman la cápside. Extraído de Baker, et al. 1991.



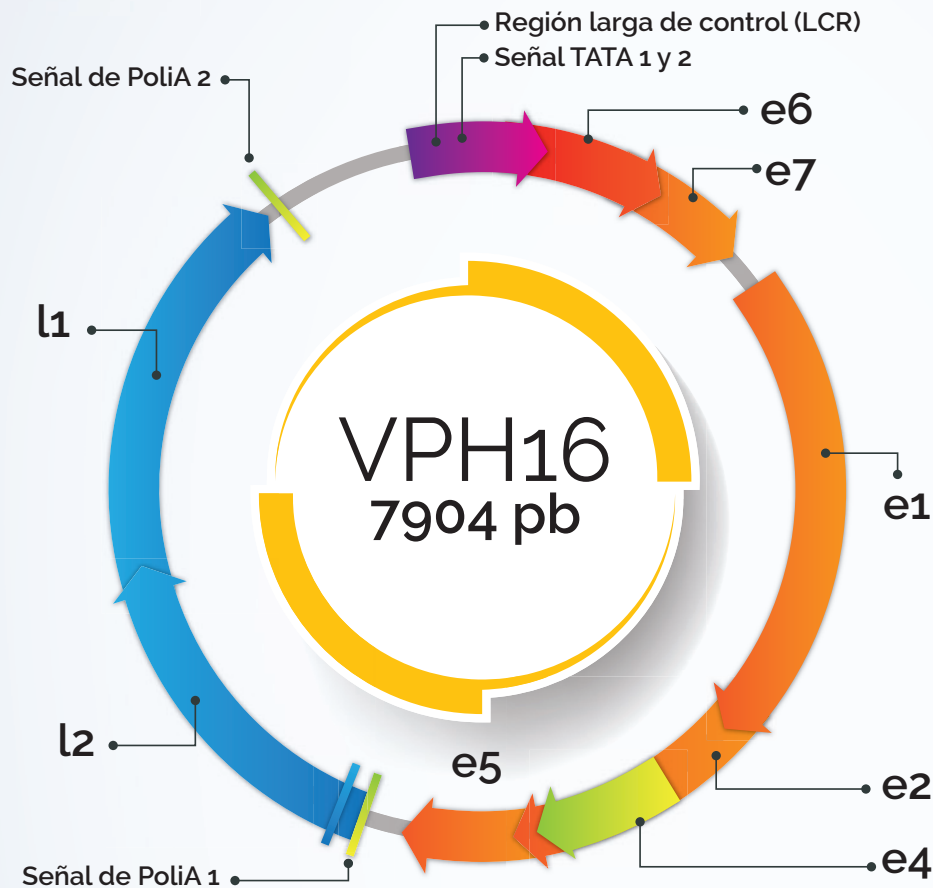
ORGANIZACIÓN GENÓMICA

En el genoma de los VP se distinguen tres regiones principales (Figura 3):

- La región de genes de expresión temprana, E**, que codifica las proteínas no estructurales, dentro de la cual se encuentran los genes que codifican para enzimas implicadas en la replicación (E1), regulación (E2), ensamblaje y liberación viral (E4), proliferación y escape de la vigilancia inmune (E5), y las oncoproteínas (E6 y E7).
- La región de genes de expresión tardía, L**, que codifica las dos proteínas de la cápside L1 y L2
- Una región no codificante, LCR** (del inglés, Long Control Region), que contiene varios elementos reguladores en cis.

FIGURA 3:

Representación del mapa genético del VPH.



CICLO VIRAL

Los VP son específicos de especie y presentan tropismo por las células epiteliales escamosas, los VPH transmitidos sexualmente se encuentran dentro del género Alfacapilomavirus, la explicación de las características del ciclo celular se basará en los VPH-AR.

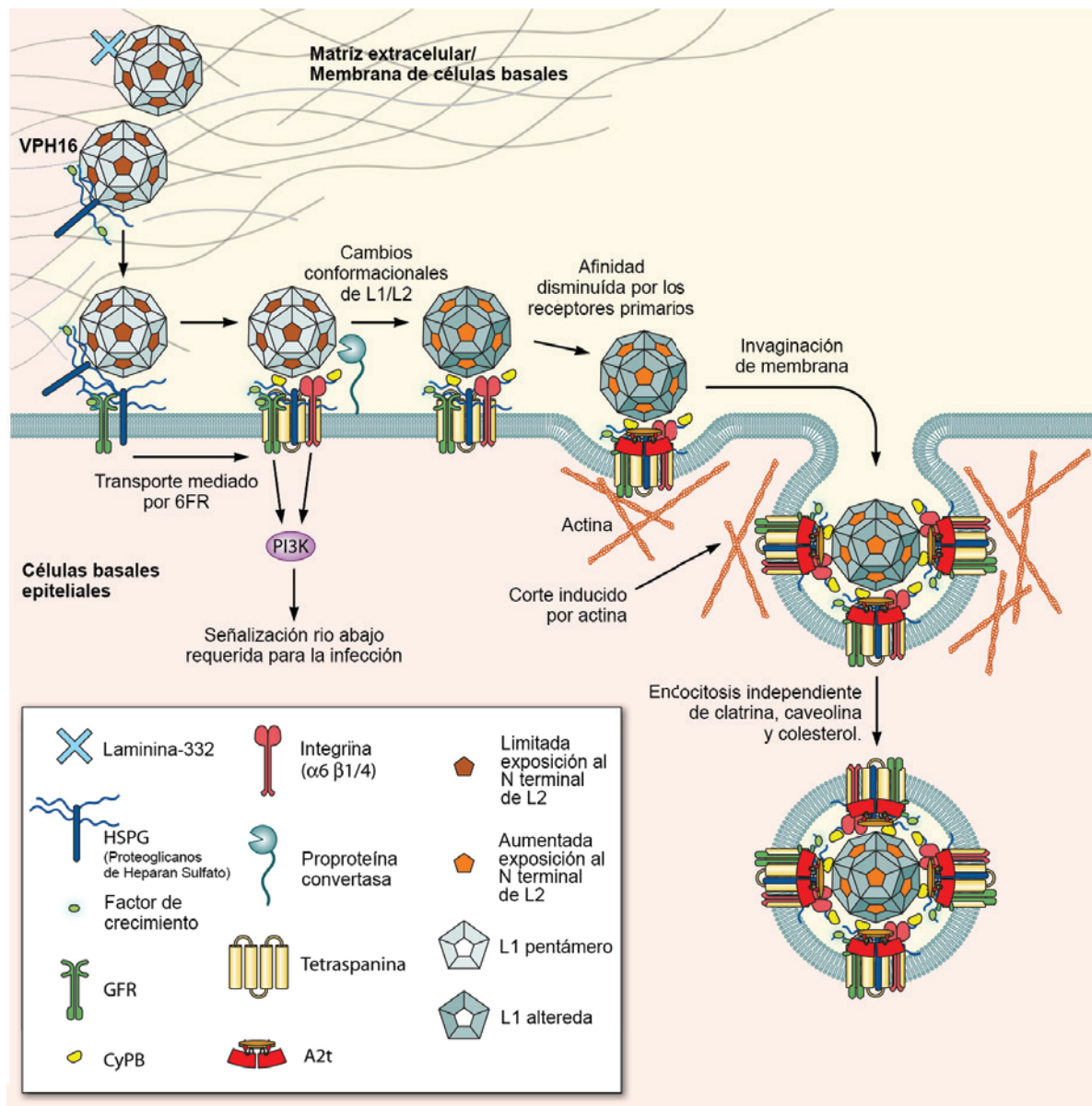
La infección natural por VP se inicia cuando una partícula viral accede a las células de las capas basales del epitelio estratificado, esto ocurre por heridas o micro-abrasiones de la piel o mucosas bajo condiciones de exposición al agua, o bien por desgaste o cuando se desarrollan micro-traumas (relaciones sexuales). Para los VPH-AR, como el genotipo 16, se cree que infecta lugares donde el acceso a las capas basales del epitelio se ve facilitado en forma natural, como la zona de transformación. La zona de transformación es la superficie del cérvix ocupada originariamente por epitelio columnar que luego de la pubertad comienza a transformarse en epitelio escamoso.

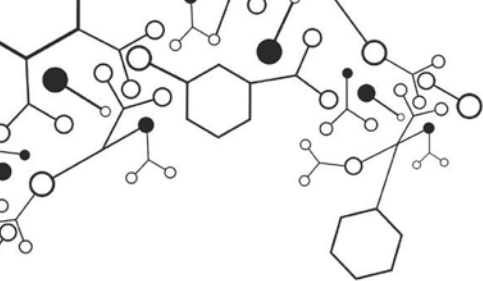
Los mecanismos de entrada viral aún son controversiales, sin embargo, estudios en el VPH genotipo 11 demostraron que la remoción de heparan sulfato y los glicosaminoglicanos similares a heparan sulfato de los queratinocitos, resultó en la reducción de la unión de partículas virales a la superficie celular, lo que no ocurrió con estudios sobre la integrina, otro posible candidato (Joyce et al., 1999).

Los estudios realizados sobre el proceso de internalización viral no han llegado a un consenso generalizado sobre el modo de endocitosis. Los diferentes mecanismos varían según los genotipos estudiados, las líneas celulares y el método de desarrollo de las partículas similares a virus (VLP, siglas en inglés) empleados. Es así que han propuesto la internalización por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina, vesículas endocíticas primarias, endocitosis vía caveola, o por macropinocitosis. Si se ha llegado a un consenso, respecto a que la entrada de VPH genotipo 16 es sensible a los agentes lisosomotropicos pero no es sensible a la remoción de colesterol. Figura 4. (Raff et al., 2013; Schelhaas et al., 2012).

FIGURA 4:

Esquema de la unión de VPH genotipo 16 a los proteoglicanos de heparan sulfato en la membrana celular, los cambios conformacionales y la encapsidación por las distintas vías, adaptado de Raff, et al. 2013.





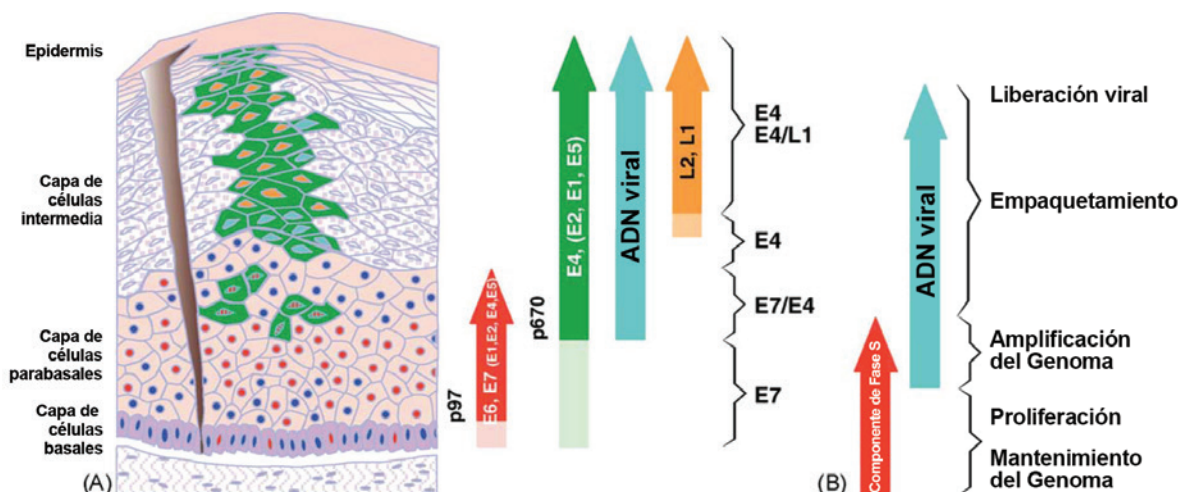
La decapsidación y la entrada al núcleo del genoma viral, pueden estar facilitadas por la proteína minoritaria de la cápside, L2. La actividad de un péptido de 23 aminoácidos, en su extremo C-terminal a pH moderadamente ácido, es la que desestabiliza y despolariza la membrana celular, ayudando a la decapsidación viral en los endosomas (Kamper et al., 2006). Luego L2 es clivada por furinas para escapar del endosoma y viaja al núcleo acompañando al genoma viral (Wang and Roden, 2013).

Una vez que ocurre la infección y la entrada del ADN viral al núcleo celular, el genoma viral se mantiene en forma episomal, entre 10 y 200 copias por célula, en las células de la capa basal del epitelio. El ciclo del VPH está íntimamente ligado al ciclo celular del queratinocito, es así que se distribuirá entre las células hijas, y se postula que al mantenerse en bajo número de copias, impedirá la activación de la respuesta inmune. En este estadio se supone que se expresan en forma basal E1 y E2, encargadas de la replicación, el mantenimiento del ADN viral en forma episomal y de ayudar en la segregación correcta de los genomas en la división celular (Doorbar, 2005).

Las células de la membrana basal infectadas comienzan su diferenciación celular y migran a las capas parabasal e intermedia. Es en la capa parabasal donde hay un aumento de la expresión de E1 y E2, pero también se expresan E6 y E7, que son necesarias para la progresión del ciclo celular de las células infectadas, retardando la diferenciación celular. Aquí hay un aumento en la replicación del ADN viral, hasta cientos de copias por célula. Esta amplificación viral requiere de la expresión de todas las proteínas, por tanto, hay un aumento en la expresión de E4 y E5. Se ha sugerido que la expresión continua de E7 en un ambiente con abundante E4 lleva al mantenimiento de la célula en fase S, lo que permite la acumulación del genoma viral en las células parabasales intermedias. Finalmente, en las capas superiores se expresan las dos proteínas de la cápside (L1 y L2), al final del ciclo productivo, los genomas se encapsidarán, generándose viriones que se liberarán con el desprendimiento normal de las células en las capas superiores del epitelio mucoso (Doorbar, 2005), (Figura 5).

FIGURA 5:

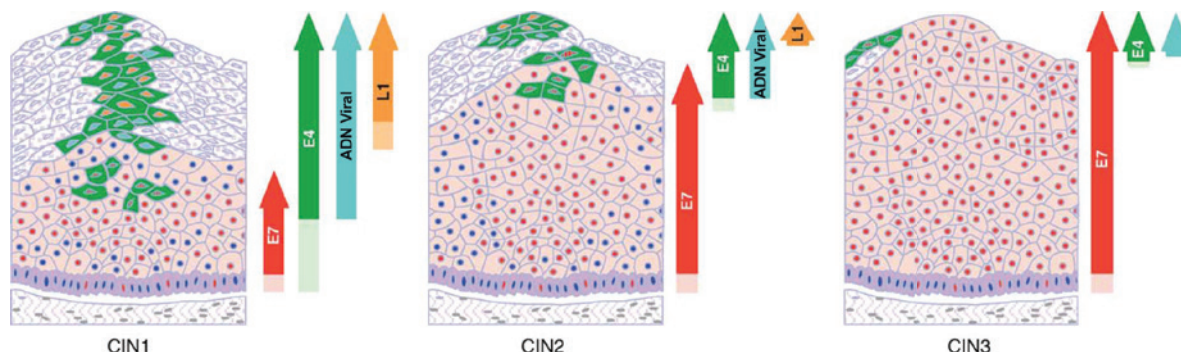
Organización del ciclo de VPH. En A) se observa que la infección comienza por una microabrazión, que permite el acceso de la partícula viral a las células de la capa basal del epitelio mucoso. En el esquema, se muestran las diversas proteínas expresadas en los distintos estadios, hasta la formación de la partícula viral. En B), Cuadro de las distintas fases del ciclo viral. Adaptado de (Doorbar, 2005).



El ciclo viral antes mencionado corresponde a una infección productiva, lo que ocurre generalmente, en más de un 90% de las infecciones naturales por VPH, luego de la cual tiene lugar la regresión de la misma, por el sistema inmune del hospedador. En ausencia de regresión, en el caso de una infección persistente por un VPH-AR, cuando la genética del hospedador lo propicia o por factores de riesgo asociados al hospedador, se puede generar una infección abortiva, pudiendo generar lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) que pueden progresar a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) y desarrollar carcinomas invasores, si no son controladas. Las LSIL generalmente indicarían una infección productiva, sin embargo el desarrollo de éstas a HSIL implicaría una infección abortiva con posibilidades de progresión a carcinomas. El evento clave para la progresión de las lesiones y el desarrollo de carcinomas es la integración del genoma viral al genoma celular. La rotura del genoma viral para la integración se produce a nivel del gen regulador *e2*. Ésto provoca un aumento descontrolado de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 que alteran las funciones celulares y genéticas ya que interfieren a varios niveles los controles del ciclo celular, induciendo transformaciones malignas, Figura 6, (Doorbar, 2005).

FIGURA 6:

Esquema de la progresión de lesiones y la expresión de las oncoproteínas. La figura es adaptada de Doorbar, et al. 2005. CIN (siglas en inglés): Neoplasia Intraepitelial Cervical, es la nomenclatura anterior al sistema Bethesda; CIN1 corresponde en la actualidad a LSIL y CIN 2 y 3 a HSIL, según el sistema Bethesda 2001 (Solomon et al., 2002).



La presencia de ADN viral en ausencia de cambios morfológicos en las células, ha sugerido que los VPH pueden existir como infecciones productivas y abortivas, y además, como infecciones latentes (Figura 7). Algunos estudios en modelos animales han determinado la presencia de ADN en sitios con infección previa, seguidos de remoción por el sistema inmune del hospedador (Doorbar, 2005). El lugar para la infección latente estaría en las células de la capa basal del epitelio. Estos estudios sugieren que la vigilancia inmune está restringida a la expresión génica en las capas basal y parabasal, sin una eficiente supresión de la replicación del genoma viral. Sin embargo, la pérdida en la detección ocurre pasado un tiempo en estos sitios latentes, implicando una regresión total por parte del sistema inmune (SI) del hospedador (Maglennon and Doorbar, 2012).

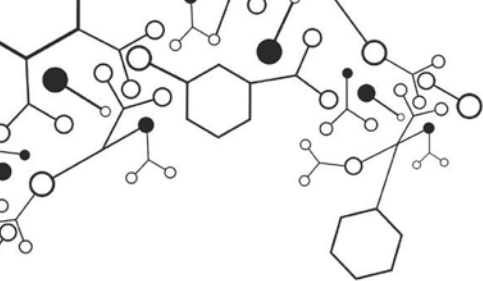
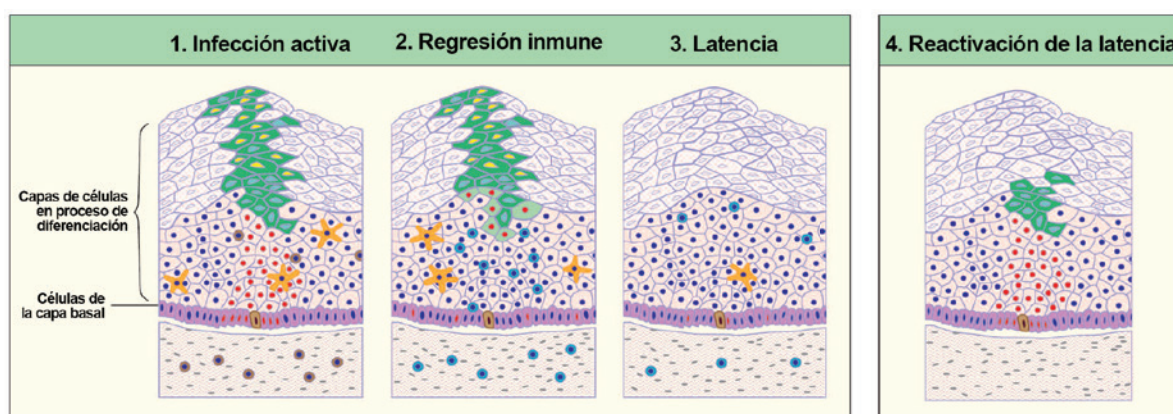


FIGURA 7:

Modelo de latencia de VPH, adaptado de Maglennon, 2012. 1) Infección activa, se pueden ver células de vigilancia del SI en las capas inferiores de epitelio, células T, en color marrón y células de Langerhans en naranja. 2) Regresión de la lesión por la respuesta inmune involucra la presentación de los antígenos virales al SI, probablemente vía células de Langerhans, y la subsecuente acumulación de células T activadas, CD4+ y CD8+, se pueden ver en color celeste, en los alrededores de la lesión. 3) Estado de latencia, involucra la supresión de la expresión viral por la infiltración de linfocitos y la acción de citoquinas. Los cambios en la expresión del genoma viral en las células basales explicarían la remoción tardía del genoma viral. 4) Reactivación de la latencia. Los modelos animales presentan cambios en el número de copias de VPH cuando se inmunosuprime el animal, y posiblemente aparezcan papilomas visibles.

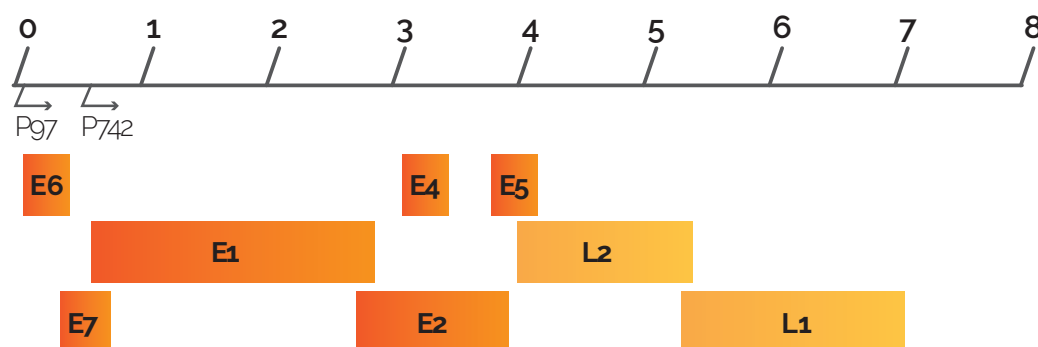


EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

La transcripción de las proteínas virales es un proceso complejo debido a que existen múltiples promotores, sitios de procesamiento múltiples, y expresión diferencial de especies de ARN mensajero. En los VPH-AR, existen dos promotores principales, (Figura 8), el promotor temprano controla la expresión en las células de la capa basal, células no diferenciadas. Éste promotor, inicia hacia arriba del marco de lectura abierto de e6. La expresión a partir de este promotor genera transcritos policistrónicos, que codifican las proteínas E6, E7, E1, E2, E4 y E5. Este promotor se denomina p97 en VPH genotipos 31 y 16 y es el análogo del p105 en VPH genotipo 18. El segundo promotor, el promotor tardío, dirige la expresión de las proteínas. E1, E4, E5, L1 y L2, en células diferenciadas de las capas parabasales. Iniciándose en diferentes sitios cercanos al nucleótido 742 (p742) en VPH genotipo 31, existen similares para VPH genotipos 16 y 18 (p670) (Longworth and Laimins, 2004).

FIGURA 8:

Organización genómica de VPH genotipo 31. La barra se corresponde con los pares de bases del genoma de VPH. Los marcos de lectura abiertos están en naranja oscuro, las proteínas de la cápside en naranja claro, el promotor temprano y tardío están indicados por las flechas. Extraído de (Longworth and Laimins, 2004) y modificado.

**E1**

Es una ATPasa y ADN helicasa, se une de manera específica al origen de replicación por medio de la interacción con E2, e inicia la síntesis y la elongación del ADN viral en asociación con factores celulares (Longworth and Laimins, 2004).

E2

Es una proteína de unión a ADN (específica de sitio), que además de reclutar a E1, es la reguladora principal de la transcripción, replicación y el mantenimiento de episomas. Los sitios de unión de E2 están localizados adyacentes a los factores celulares de transcripción que activan el promotor temprano. A bajos niveles de E2, ésta se une a secuencias reconocidas y activa el promotor temprano, sin embargo a altas concentraciones, la misma bloquea la unión de los factores celulares, reprimiéndose la transcripción (Longworth and Laimins, 2004).

E4

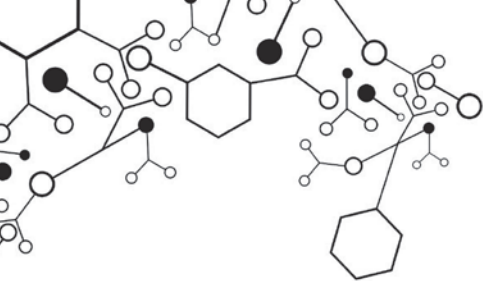
Actúa tarde en el ciclo viral, mediante la asociación con ciclinas dependientes de quinasas y con E2, puede modular la actividad del promotor temprano, regulando así la expresión de E7 y por tanto la entrada en fase S. Interacciona con el citoesqueleto de queratina y los filamentos intermedios, induce la detención de G2, se supone que para facilitar el ensamblaje viral y su liberación (Doorbar, 2007).

E5

E5 es una proteína hidrofóbica con diversas funciones; está involucrada en la fase productiva del ciclo viral, es un estimulador del crecimiento por interactuar con el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR, sigla en inglés) o con la subunidad de 16 KDa de la ATPasa vacuolar, inhibe la apoptosis, acción de transformación-carcinogénesis, y también está involucrada en la regulación negativa de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII) (DiMaio and Petti, 2013).

E6

Es una de las oncoproteínas virales, ejerce su función principalmente mediante la unión a la proteína celular, ubiquitin-ligasa, E6AP (Proteína asociada a E6). En VPH-AR, esta interacción tiene una gran afinidad y da lugar a la unión de moléculas de ubiquitina a la proteína supre-



sora de tumor, P53, que entonces será reconocida y degradada por el proteosoma 26S. La proteína P53 se activa cuando existen anomalías a nivel del ADN, induciendo así la entrada de las células anómalas en apoptosis. La degradación de P53 tiene como consecuencia la evasión del punto de control del ciclo celular G1/S, generando la fragmentación y reunión de cromosomas, proporcionando un cariotipo altamente inestable. Por otro lado, en los VPH-BR, la proteína E6 es capaz de unirse a P53 pero con baja afinidad, por eso su escasa o nula frecuencia en carcinomas (Jiang and Yue, 2014).

E7

E7 es la oncoproteína principal y su sola expresión es suficiente para inmortalizar células epiteliales. Su proteína blanco es la proteína del retinoblastoma, pRB. La pRB, regula la progresión del ciclo celular. Estando fosforilada es inactiva permitiendo la continuación del ciclo celular, su estado no fosforilado la vuelve activa, se une al factor de transcripción celular E2F y es cuando impide la progresión del ciclo celular. E7 tiene mayor afinidad por la pRB en estado no fosforilado que E2F, la unión de E7 a la pRB libera el factor E2F permitiendo la progresión del ciclo celular de las células dañadas, generando inestabilidad cromosómica. Otra función es la inactivación de los inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas p21 y p27, estimulando el crecimiento de las células infectadas por VPH. Al igual que E6, en los VPH-BR, E7 se une con una afinidad diez veces menor a la RB que en los VPH-AR (Jiang and Yue, 2014).

L1

Es la proteína mayoritaria de la cápside, es de aproximadamente 55kDa y tiene la habilidad de autoensamblarse espontáneamente en partículas virales similares a virus (VLP). Las proteínas L1 en la cápside viral se agrupan en 72 capsómeros pentaméricos o hexaméricos, interaccionando con L2. L1 tiene la función de unirse al ADN viral y empaquetarlo, también codifica epítopes neutralizantes y es la encargada de interaccionar con los receptores celulares para la entrada viral (Buck, Day, and Trus, 2013).

L2

Proteína minoritaria de la cápside, carece de la capacidad de autoensamblarse y formar VLP. Interacciona con L1 para formar la cápside de los VPH, potenciando su ensamblado y facilitando la encapsidación. No es requerida en la unión a la célula y la entrada viral, pero es la que acompaña al ADN viral en la célula infectada para la amplificación del genoma viral en el núcleo (Wang and Roden, 2013).

PATOGENIA

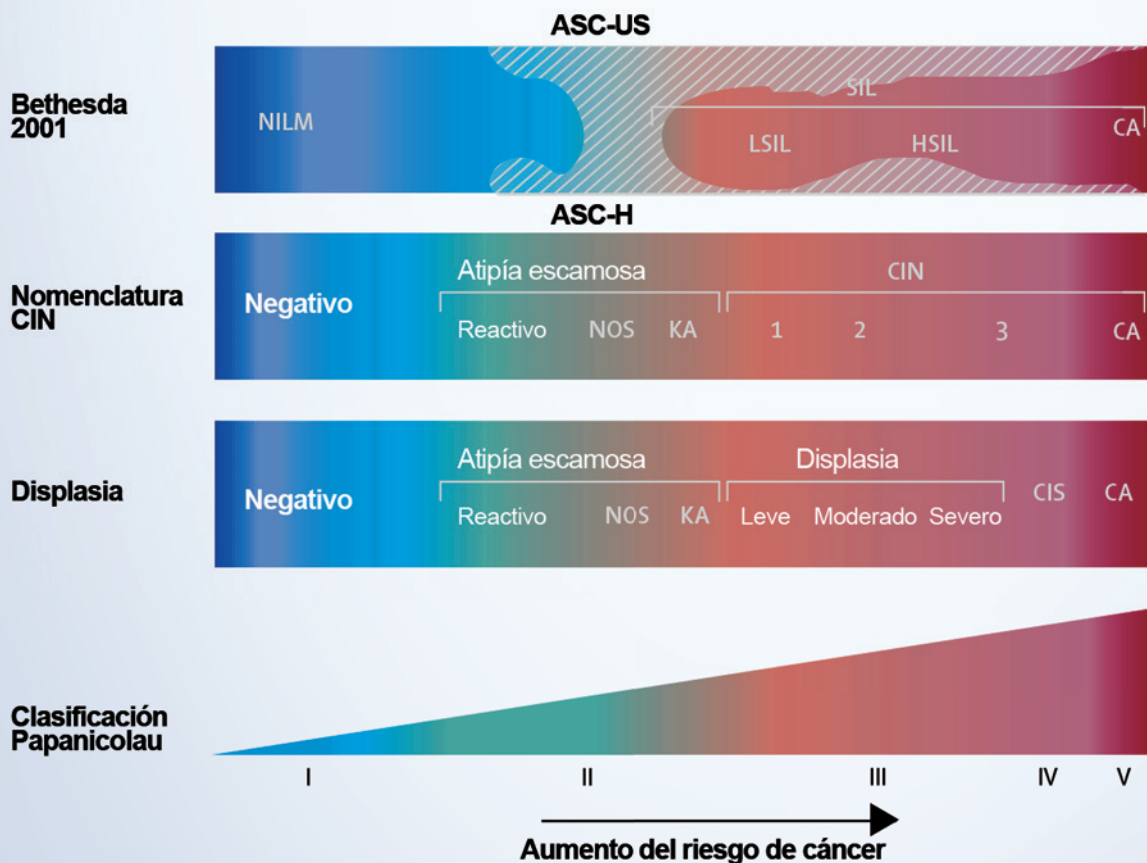
Para la transmisión del VPH se requiere el contacto entre dos epitelios y que éstos sufran microabrasiones o microtraumas. En el epitelio anogenital, la vía principal son las relaciones sexuales sin protección, aunque el uso de preservativo no bloquea enteramente el ingreso, protege en una gran parte de los casos y en las actividades sexuales sin penetración (Manhart and Koutsky, 2002). El VPH es la infección más frecuente entre jóvenes sexualmente activos, aproximadamente entre el 75% y el 80% de los individuos estarán infectados a lo largo de su vida.

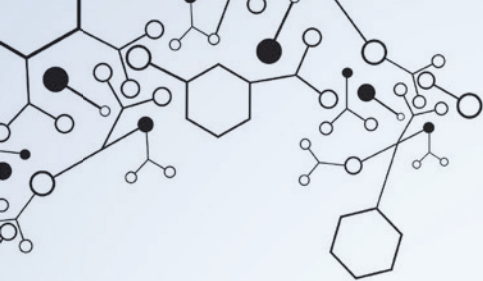
La mayoría de las infecciones por VPH mucosos ocurren sin cambios citológicos, aproximadamente el 30% puede producir alguna citopatología, en general atípica, son transitorias y removidas, en un periodo entre 1 a 2 años, por el sistema inmune del hospedador (Schiffman et al., 2007).

En presencia de un VPH-AR, y una infección que persiste en el tiempo por más de 2 años, la probabilidad de la remoción disminuye y aumenta el riesgo de desarrollar LSIL, HSIL y carcinomas, lo que generalmente ocurre en el 10% de los casos. Una LSIL es un signo histopatológico de infección por VPH pero no es indicador de cáncer. Varios casos estudiados en la actualidad revelan que estas lesiones representan un riesgo bajo de progresión a cáncer. Las HSIL son más heterogéneas que las LSIL, algunas veces producidas por VPH-BR, pero en general por VPH-AR, y es un diagnóstico más ajustado de una posible progresión a carcinoma. Sin embargo, el diagnóstico de las lesiones incorpora errores en la toma de muestra, procesamiento e interpretación de la biopsia guiada por colposcopia. Esta técnica tiene una sensibilidad del 70%, lo que indica que hay un 30% de lesiones que se diagnostican como sin lesión o como una lesión menos severa. Es así que una LSIL no predice una progresión a una HSIL, más que una biopsia negativa. El tiempo de la primera evidencia de lesión y su progresión a HSIL puede ser de hasta 5 años, por lo que es importante el control ginecológico cada 6 meses cuando se diagnostica una SIL (Figura 9), (Schiffman et al., 2007).

FIGURA 9:

Clasificación comparativa de las anomalías microscópicas relacionadas con la infección por VPH. Se observan las distintas histopatologías, su denominación anterior al sistema Bethesda 2001, CIN: neoplasias intraepiteliales cervicales 1-3, la dificultad de diagnóstico para las células de significado atípico, ASCUS (siglas en inglés), la relación con la citología, técnica de Papanicolaou y la progresión a carcinomas. ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado, NILM, diagnóstico negativo para lesión o malignidad, SIL: Lesiones intraepiteliales escamosas, LSIL: Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, HSIL: Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, CA, carcinoma invasor, ASC-H: Células escamosas atípicas, no se puede excluir HSIL, NOS: no especificado de otro modo, KA: coilocitos atípicos, CIS: cáncer in situ. Adaptado de (Schiffman et al., 2007).

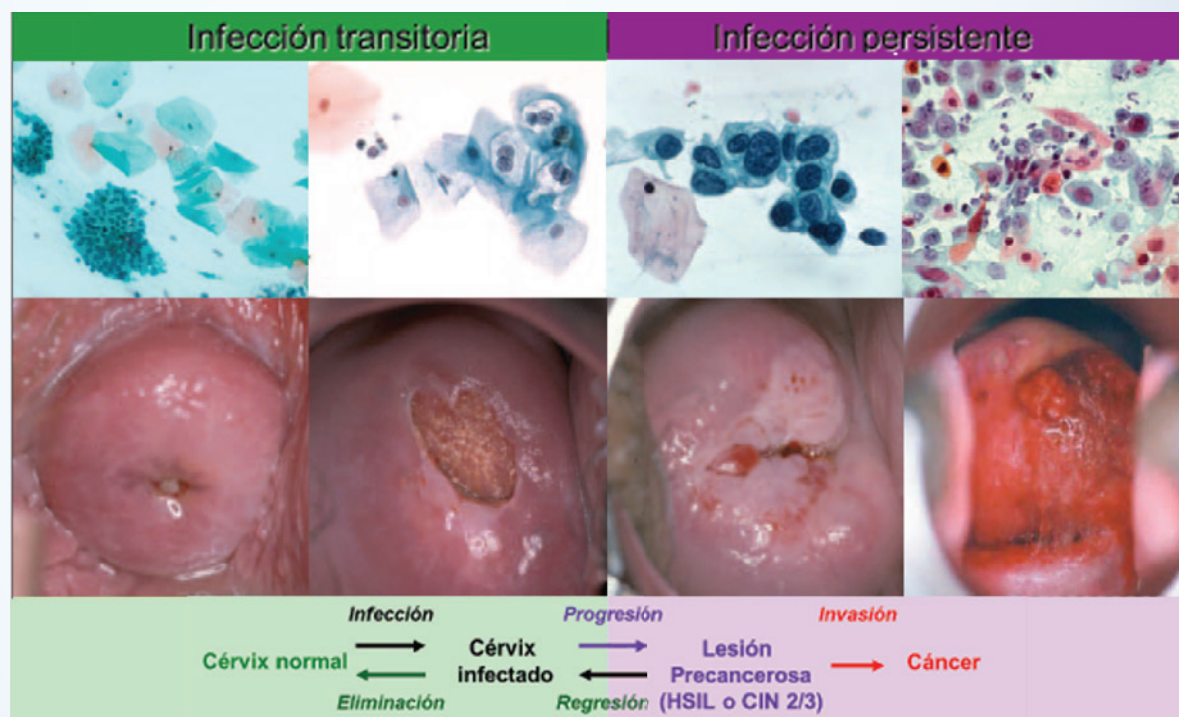




Durante las infecciones persistentes por VPH-AR, los genes e6 y e7 parecen ser los principales conductores de la progresión hacia HSIL y cáncer. La integración del ADN viral, vía recombinación no homóloga, está fuertemente asociada a la carcinogénesis, pudiendo ser esta un biomarcador que distinga entre infección por VPH y carcinoma. Sin embargo, la integración no necesariamente termina en cáncer invasor, los niveles de expresión de las oncoproteínas E6 y E7 sí están asociados no solo con HSIL, sino con la progresión a carcinomas y cáncer invasor. Este fenómeno se detecta en un 5% a 16% de las HSIL y en un 87% de los casos de cáncer invasivo. La integración del genoma puede observarse básicamente en todos los tumores relacionados con el VPH genotipos 16 y 18, sucede en sitios frágiles del genoma, y conlleva la ruptura episomal entre los genes e1 y e2. Lo que se traduce en una expresión constitutiva de E6 y E7 por la pérdida de la proteína reguladora E2, que es la principal represora de la expresión de las oncoproteínas (Schiffman et al., 2007).

FIGURA 10:

Principales pasos en carcinogénesis, arriba se pueden observar las distintas citologías de los estadios desde la infección al cáncer invasor, debajo están las colposcopias de cada estadio. Adaptado de Schiffman, 2007 (Schiffman et al., 2007). Extraído de MA Picconi, 2013.



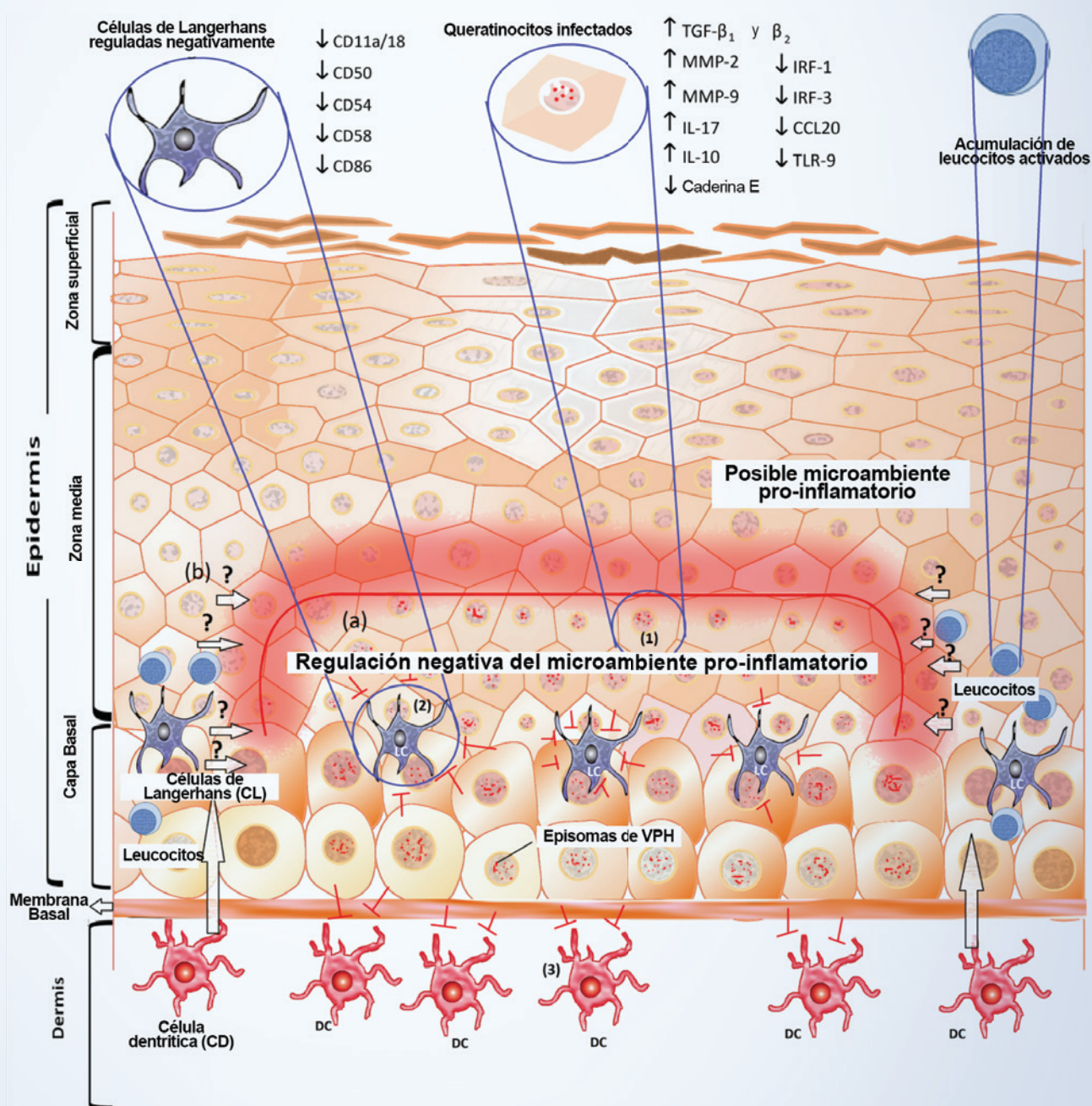
INMUNIDAD

La vigilancia inmunológica del epitelio escamoso del cérvix la realizan las células de Langerhans (CL), en su estadio inmaduro llamadas células dendríticas (CD), éstas son abundantes en piel y mucosas, y son las células presentadoras de antígeno por naturaleza, procesan los antígenos para presentarlos a las células B y T, desencadenando una respuesta inmune (RI) humoral y celular contra el virus. Sin embargo, en la zona de transformación que es el sitio de infección, comparada con el exocervix, hay una menor vigilancia inmunológica debido a una importante reducción en la densidad de las CL. En presencia de lesiones, las CD reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daño (DAMP), usando sus receptores similares a Toll, (TLR), por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentan los antígenos a las células T, algunas veces asistidas por agentes inflamatorios como citoquinas y quimioquinas que unen la respuesta innata con la adaptativa. El ADN viral es reconocido por el TLR 9 y desencadena una cascada de interferones ($\text{INF-}\alpha$, $\text{INF-}\beta$, e $\text{INF-}\gamma$) (Amador-Molina et al., 2013). Sin embargo en ausencia de lesiones, las CL, no producen suficiente respuesta de células T, esto puede ser debido a mecanismos de evasión virales en la modulación de la expresión de estas proteínas. En VPH genotipo 16, hay una regulación negativa de la expresión de TLR 9 debido a la acción de las oncoproteínas.

Los macrófagos fagocitan patógenos y estimulan linfocitos y otras células del SI. Proteínas como la proteína monocítica quimiotáctica -1 (MCP-1), y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIPa3) ayudan a la agregación de macrófagos frente a una infección, sin embargo estas proteínas parecen estar reguladas negativamente directa o indirectamente por el VPH. Otra parte importante de la inmunidad innata son las células asesinas, (NK). Estas células son linfocitos que responden rápidamente al estrés celular, sin necesidad del MHC. Recientemente, se ha observado que en HSIL y en cáncer cervical por VPH genotipo 16, los receptores NKp30 y NKp45 de las NK están considerablemente disminuidos, afectando su actividad citolítica (Figura 11), (Deligeoroglou et al., 2013).

FIGURA 11:

Representación esquemática del microambiente inmunológico en una infección por VPH. a) Microambiente predominante inducido por VPH, promueve una regulación negativa de la presentación de antígenos, lo que conlleva a: 1) modulación de la respuesta inflamatoria mediada por citoquinas, 2) inhibición de la activación y migración de las CL, 3) evasión de la infiltración de las CD desde el estroma. B) Posible microambiente pro-inflamatorio en los queratinocitos adyacentes a la lesión, caracterizado por la regulación negativa de la citoquina anti-inflamatoria, interleuquina, IL-10 y presencia de células T activadas. Las flechas indican procesos desconocidos que podrían revertir el microambiente inducido por la infección por VPH, adaptado de (Amador-Molina et al., 2013).



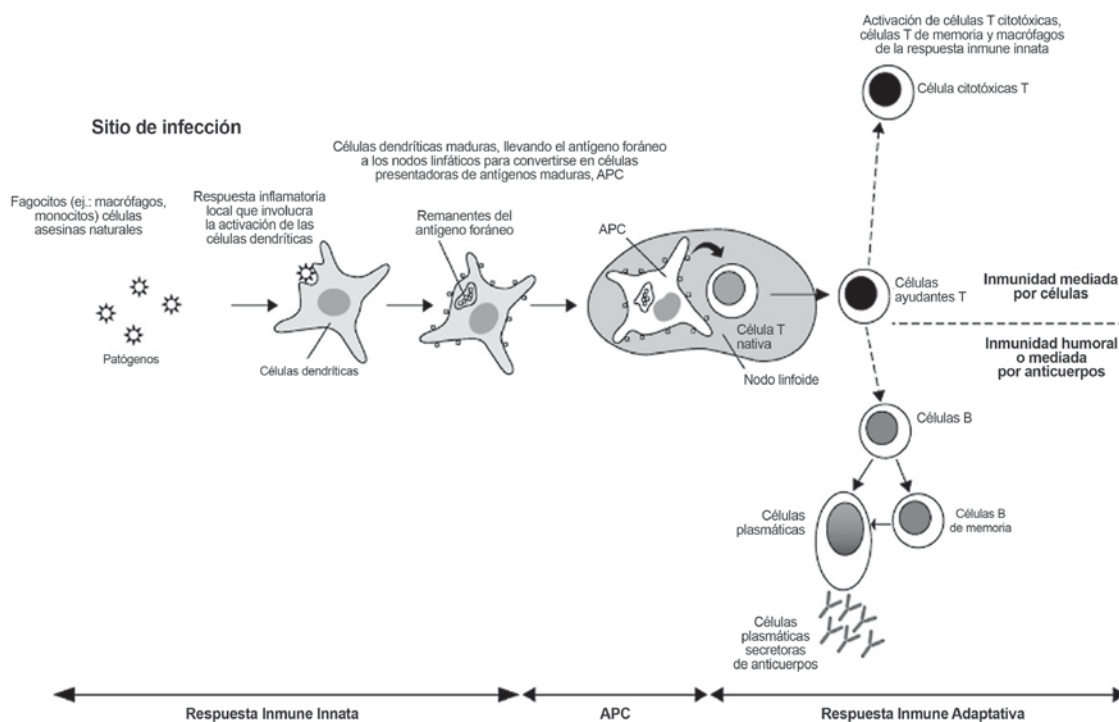
En general, en mujeres con distintos grados de lesiones, se observa una respuesta dominante de células T ayudantes Th, en los casos en que la infección es removida, se supondría que por ser una infección intracelular, invocaría la respuesta Th1, sin embargo, también se da una respuesta Th2. IL-2 y el factor de necrosis tumoral- α , TNF- α , pertenecientes a Th1, se encuentran en más bajas concentraciones en pacientes con lesiones por VPH que en mujeres sanas. Por otra parte, los niveles de IL-4, característicos de una respuesta TH2, parecen aumentar en presencia de SIL, pero disminuyen cuando éstas progresan a cáncer.

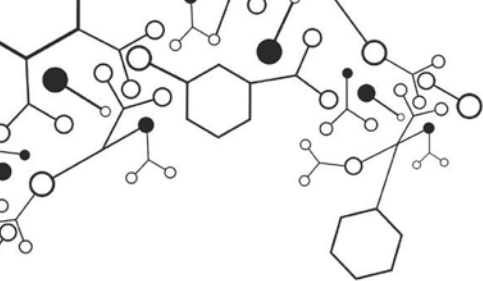
Las células citotóxicas, CTL, son las que reconocen antígenos con ayuda del MHC I, los pacientes viviendo con VIH o trasplantados presentan una disminución en su conteo luego de sufrir infecciones persistentes. La activación de las CTL es por medio de las oncoproteínas y su función es cumplida por una regulación positiva de la molécula de adhesión, similar a ICAM-a, VCAM-1 y la selectina-E en las células infectadas. Sin embargo, E7 puede regular negativamente la expresión del transportador de antígenos peptídicos-1, TAP-1, lo que es esencial para que actúe el MHC I, lo que suprime la presentación del antígeno por esta vía.

La respuesta humoral estimulada por la presentación de antígenos y el patrón de citoquinas reclutado por la respuesta Th2, depende de las células ayudantes CD4, que maduran las células B para que produzcan anticuerpos (Ac). Estos Ac son principalmente neutralizantes contra L1, pero también se generan aunque en menor proporción, Ac contra E2, E6, E7 y L2, la gran mayoría son inmunoglobulinas G (IgG). Existen dos tipos de Ac neutralizantes, el primer tipo obstruye la unión a la superficie celular, el segundo tipo previene la unión a la membrana basal, ambos bloquean la internalización viral, (Figura 12), (Schwarz and Leo, 2008; (Amador-Molina et al., 2013)).

FIGURA 12:

Esquema de la respuesta inmune innata y adaptativa, adaptado de (Schwarz and Leo, 2008).





CLÍNICA DE LAS LESIONES CAUSADAS POR INFECCIÓN CON VPH MUCOSOS

VERRUGAS ANOGENITALES O CONDILOMAS

Las verrugas o condilomas en la zona anogenital reciben el nombre de condilomas acuminados, son muy prevalentes dentro de los jóvenes y adultos sexualmente activos, con frecuencias similares a otras infecciones de transmisión sexual (ITS). En Estados Unidos, se estima una prevalencia del 1% entre jóvenes sexualmente activos de 19 a 45 años. El aumento de la promiscuidad a mediados de los años 60 se tradujo en un aumento de al menos cuatro veces en la incidencia de los condilomas. Los condilomas genitales normalmente son lesiones exofíticas benignas que en el hombre puede presentarse en el pene o en el ano, y en la mujer en la vagina, útero, periano y ano, pudiendo presentarse en múltiples sitios de manera simultánea. También pueden desarrollarse otros tipos de lesiones como son las verrugas planas, y lesiones intraepiteliales escamosas que sólo se observan cuando se tiñen con ácido acético. La mayoría de los condilomas reversion espontáneamente, aunque algunas lesiones pueden persistir durante años, e incluso recurrir tras el tratamiento de las mismas. Pueden también aumentar en número y tamaño durante el embarazo y revertir luego del parto. El 90% de las verrugas son causadas por VPH genotipos 6 u 11, siendo el primero el tipo predominante, si bien se pueden encontrar otros genotipos como el VPH 16 (Howley P.M., 2007).

CONDILOMAS EN LA CAVIDAD ORAL

Las infecciones benignas de la cavidad oral son frecuentes, pudiendo ser sintomáticas o asociarse con lesiones individuales o múltiples. Frecuentemente los VPH genotipos 6 y 11 son detectados en estas lesiones, aunque también el VPH genotipo 16. La hiperplasia epitelial focal (FEH), solo ocurre en la mucosa y aunque su distribución es mundial, es muy prevalente en la población indígena de América del Sur y Central y la población esquimal de Alaska y Groenlandia. Estas lesiones son atribuidas a los VPH genotipos 13 y 32, que aparentemente solo infectan la cavidad oral (Howley P.M., 2007).

CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Algunos tumores de cabeza y cuello se relacionan con infección por VPH, localizándose la mayoría en la zona orofaríngea, incluyendo las amígdalas, la base de la lengua y el velo del paladar, siendo el VPH genotipo 16 el más detectado. Son factores de riesgo para el desarrollo de estos carcinomas el consumo de alcohol y tabaco, además del sexo oral sin protección (Howley P.M., 2007).

PAPILOMATOSIS RESPIRATORIA RECURRENTE

También denominada papilomatosis laríngea, podría transmitirse verticalmente cuando la madre presenta historia de verrugas genitales, especialmente por los VPH genotipos 6 y 11, en la que los papilomas pueden comprometer seriamente la funcionalidad de las vías aéreas, especialmente en niños. Las cuerdas vocales y la laringe son los sitios afectados más comúnmente, pero pueden alcanzar la tráquea, pulmones, nariz y cavidad oral, pudiendo ser lesiones simples o múltiples (Howley P.M., 2007).

LESIONES INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO Y CÁNCER DE CÉRVIX

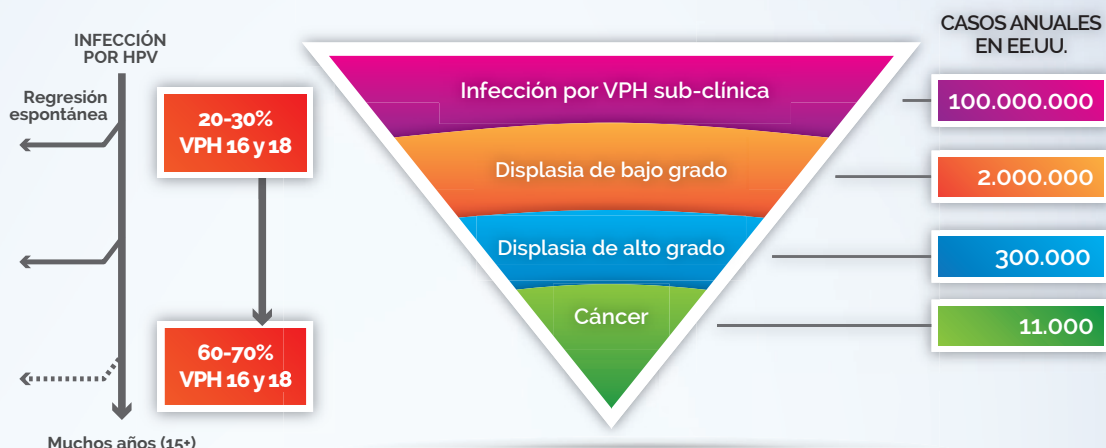
Las primeras terminologías para identificar los cambios morfológicos en las células del cérvix fueron introducidas por Papanicolaou en 1949, quien utilizó la palabra "displasia" para referirse a cambios en las células del epitelio mucoso presentando células basaloideas o coilocitos. En los '60, se cambió por el concepto de neoplasia cervical intraepitelial, clasificándose las lesiones en tres grados de severidad, I, II y III, de menor a mayor gravedad. Debido a la baja reproducibilidad diagnóstica de esta clasificación, en 1989 se impuso el Sistema Bethesda para describir las alteraciones citológicas, que fue modificado y revisado en el año 2001 (Solomon et al., 2002). En él, se sustituye el término neoplasia cervical intraepitelial, CIN, por el de lesión escamosa intraepitelial, SIL, con dos categorías: LSIL y HSIL. La categoría LSIL corresponde a infecciones por VPH, que generalmente son resueltas por el SI del hospedador, y que raramente evolucionan a carcinoma, los genotipos hallados en estas lesiones pueden ser de alto o bajo riesgo. Por otra parte, las HSIL corresponden a cambios malignos precursores de carcinogénesis y generalmente se ven implicados genotipos de alto riesgo (Clifford et al., 2005). También se habla de ASCUS, cuando se refiere a células anormales de significado indeterminado, es decir no se puede descartar la presencia de una SIL pero no es suficiente para diagnosticarla.

CÁNCER DE CÉRVIX

Las mucosas del cérvix están compuestas por dos tipos de epitelio, el escamoso formado por varias capas de células estratificadas, y el columnar, en la parte interna, formado por una sola capa de células, donde ambos epitelios se unen se denomina, unión escamo-columnar. Existe una zona, llamada, zona de transformación, donde el epitelio columnar es sustituido por el epitelio escamoso, la mayoría de los carcinomas de cérvix se dan en esta zona. La mayoría de las SIL, se resolverán espontáneamente, teniendo menos chance de regresar aquellas lesiones más graves. Generalmente las LSIL progresan a HSIL y luego a carcinomas, desarrollándose este carcinoma en cuestión de años. Sin embargo, algunos carcinomas pueden ser previamente HSIL, sin transcurrir una LSIL previa (Figura 13), (Koutsky et al., 1992). Por otro lado se observa que la detección de los VPH genotipos 16 y 18 es menor en SIL comparada con aquella realizada en carcinomas (Howley et al., 2007).

FIGURA 13:

La historia natural de la infección cervical por VPH, estudio realizado en Estados Unidos, en distintas categorías de lesiones. Adaptado de Howley P.M., 2007.



La infección por VPH es un factor necesario para la progresión a carcinoma. Los distintos genotipos de VPH se detectan por métodos moleculares y se encuentran en un 95% a 100% de los carcinomas estudiados. Existen alrededor de 40 genotipos de VPH de tropismo mucoso que se transmiten sexualmente, la mayoría de éstos son VPH-AR. El VPH genotipo 16 causa a nivel mundial más del 50% de los casos de cáncer de cérvix, seguido del genotipo 18 encontrado en un 20%, por lo que ambos son responsables de alrededor del 70% de los cánceres de cérvix. En el caso de infecciones asintomáticas persistentes, en un estudio de pacientes en seguimiento por 10 años, se ha observado que, cuando están implicados los genotipos 16 y 18 es más frecuente que se evolucione hacia HSIL o cáncer invasivo que si se trata de otros genotipos (Khan et al., 2005).

EPIDEMIOLOGÍA

SITUACIÓN MUNDIAL

La infección genital por el VPH es la ITS más común entre las mujeres, se estima que el número de mujeres infectadas por VPH es aproximadamente de 300 millones y que más de 490.000 desarrollarán cáncer de cuello uterino (Parkin and Bray, 2006). El carcinoma de cérvix ocupa la séptima posición de los carcinomas más frecuentes para ambos sexos y es el tercer tipo de cáncer más común en mujeres, además es la cuarta causa de muerte por cáncer entre la población femenina, después del cáncer de mama, el de pulmón y el colorectal. Se estimaron en 2012, 527.624 nuevos casos anuales y 265.672 muertes por cáncer de cérvix a nivel mundial (GLOBOCAN, 2012). Aunque el número de casos a nivel mundial ha aumentado, el cáncer de cérvix pasó de la segunda a la cuarta posición en la actualidad, comparada con un estudio similar realizado en 1975. Aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de cuello de útero tiene lugar en países en desarrollo, donde representa el 12% de los cánceres de mujeres, en los países desarrollados sólo representa el 3,5% de los nuevos casos de cáncer. Cerca de 9 de cada 10 mujeres muere a causa del cáncer cervical en los países en vías de desarrollo,

aproximadamente un 87%. El riesgo de morir de cáncer cervical antes de los 75 años de edad es 3 veces mayor en países en vías de desarrollo. Los datos aportados por Globocan 2012 muestran que las tasas de incidencia (TI) y mortalidad (TM) más altas, de 30 por 100.000, se observan en África del Este (TI 42.7 y TM 27.6), Melanesia (TI 33.3 y TM 20.6), África Central (TI 30.6 y TM 22.2) y las tasas más bajas corresponden a Australia y Nueva Zelanda (TI 5.5 y TM 2) y Asia del Oeste (TI 4.4 y TM) (Ferlay et al., 2015).

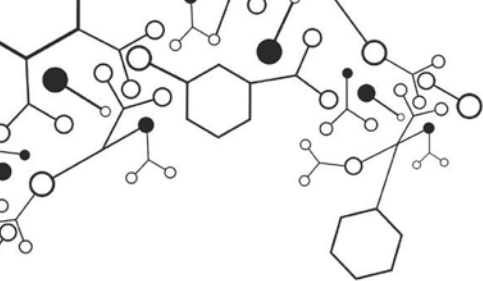
La epidemiología de los carcinomas de cérvix, así como el estudio de los VPH presentes en estos, se lleva a cabo empleando como marcador, la presencia de ADN viral en cepillados, biopsias frescas o bloques de parafina. La presencia del genoma de los distintos genotipos de VPH mediante técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta una gran variabilidad, según la edad y la situación geográfica, oscilando entre un 2% y un 44% de prevalencia de VPH en mujeres sin síntomas en población general (Trottier and Franco, 2006). En relación con la edad, la prevalencia es máxima en mujeres entre 16 y 30 años y disminuye en mujeres entre 30 y 45 y mayores de 50 años, observándose un segundo pico, entre los 45 y 50 años. No existen razones claras para este segundo pico, aunque éste aumento podría estar vinculado a la adquisición de nuevas infecciones, o por la reactivación de infecciones latentes relacionadas con los cambios asociados a la menopausia (Trottier and Franco, 2006).

Aunque la transmisión sexual es la mayoritaria a la hora de adquirir una infección por VPH, debe también considerarse otras vías de transmisión diferentes. La evidencia de que existen vías no sexuales ha sido establecida por múltiples autores aunque algunas son aún tema de controversia: (1) compartir fómites, (2) existen algunas evidencias de transmisión horizontal de tipos de bajo riesgo, (3) existe transmisión vertical y perinatal de VPH entre madres e hijos en el momento del parto, (4) piscinas y superficies (Mammas, Sourvinos, and Spandidos, 2014; Roden, Lowy, and Schiller, 1997; Ryndock and Meyers, 2014).

SITUACIÓN EN URUGUAY

En Uruguay, la incidencia y mortalidad en carcinomas la lidera el cáncer de mama 76 y 26 por 100.000, seguido del de colon y recto, 26 y 13 por 100.000, respectivamente. Nuestro país presenta las menores tasas de cáncer de cérvix comparando, nuestras tasas con las de la región. Sin embargo, siguen siendo altamente elevadas cuando las comparamos con las tasas halladas en Australia, Nueva Zelanda o Asia Occidental donde como se ha mencionado anteriormente son del 5 y 3 cada 100.000, respectivamente (Ferlay et al., 2015).

En Uruguay existe una tasa de incidencia de cáncer de cérvix estandarizada por edad de 19/100.000, que implica una incidencia de 402 casos anuales, y una tasa de mortalidad estandarizada por edad de 7.5/100.000, involucrando 175 muertes anuales, es el tercer carcinoma en frecuencia en cuanto a la incidencia y el sexto en mortalidad en Uruguay (Ferlay et al., 2015; GLOBOCAN, 2012).



Las variaciones en la tasa de incidencia y la tasa de mortalidad que se encuentran en los países de América del Sur puede deberse a varias razones independientes o a un conjunto de las mismas, hay escasez de datos de distribución geográfica de genotipos, de factores de riesgo y de cuáles son los que prevalecen en cada región; ya sea edad temprana del primer coito, multiparidad, número de parejas sexuales, estado socio-económico, nivel de educación, higiene, infecciones de transmisión sexual, genética del hospedador, variante de genotipo de alto riesgo, etc. (Castellsague and Munoz, 2003).

En nuestro país se realizaron tres estudios epidemiológicos de la frecuencia de VPH en una población de mujeres de la capital, dos de ellos estudiaron muestras pertenecientes a pacientes con lesiones pre-cancerosas y uno en biopsias de pacientes con carcinomas, en éstos se encontró un 39% de muestras positivas para genoma de VPH, de este porcentaje se destaca que un 17% pertenecían al grupo de mujeres sin lesión, un 50% al grupo de mujeres con lesiones leves y un 67% a un grupo de mujeres con lesiones graves precursoras de cáncer (Ramas et al., 2013, trabajo derivado de esta tesis), el otro estudio en lesiones pre-cancerosas tiene algunas diferencias en frecuencias de genotipos pero son similares las frecuencias halladas en los distintos grados citológicos (Berois et al., 2014). El estudio en muestras de carcinomas resultó en una detección de 92.6% del genoma de VPH (Berois et al., 2013).

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VPH Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

DETECCIÓN MOLECULAR

Los métodos moleculares se basan, en la gran mayoría, en la detección del ADN viral, aunque también se puede detectar la expresión de los ARN mensajeros, ambos métodos son directos, y pueden ser clasificados en dos grupos: Sistemas de amplificación de la señal y Sistemas de amplificación de secuencias blanco.

Sistemas de amplificación de la señal

El método más utilizado de amplificación de la señal se basa en una técnica de captura de híbridos ADN-sonda ARN específica (TestDigene Hybrid Capture™ HPV DNA). Es un método no radiactivo, permite la detección de 13 VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 VPH-BR (6, 11, 42, 43 y 44). Este método posee múltiples ventajas; es reproducible y automatizado, sin embargo, posee también algunas limitaciones; no genotipifica, presenta hibridaciones cruzadas entre las mezclas y con genotipos no incluidos en las mismas y tiene una sensibilidad inferior a la de la PCR.

Sistemas de amplificación de secuencias blanco

Los sistemas de amplificación de las secuencias blanco se basan en la amplificación empleando la técnica de PCR. Existen diferentes formas para detectar el ADN viral:

PCR con cebadores específicos:

Utilizan cebadores específicos diseñados para amplificar un único genotipo, y para determinar el genotipo presente en una muestra, hay que realizar múltiples reacciones una por cada genotipo que se quiera testar.

PCR con cebadores degenerados:

Se emplean cebadores degenerados, que amplificarán cualquier genotipo presente en la muestra. La mayoría están diseñados en base a la secuencia del gen *l1*, que es uno de los genes más conservados del genoma. Presentan bases atípicas, con variaciones intertípicas que se aparean tanto a un nucleótido u otro. Se necesitará una genotipificación por el largo de los polimorfismos de los productos de restricción (RFLP) (Bernard et al., 1994), seguida de electroforesis para su visualización, o por hibridación reversa en línea, donde los productos de PCR hibridan con su sonda específica inmovilizada en una membrana de nitrocelulosa, y éstos híbridos ADN copia-sonda, son detectados por una reacción colorimétrica que involucra biotina, o secuenciación directa con posterior análisis. En cuanto a la RLB, se puede realizar "in house", pero existen dos sistemas comerciales de esta tecnología: INNO-LIPA (Innogenetics) y Linear Array Genotyping HPV test (Roche-Diagnostics).

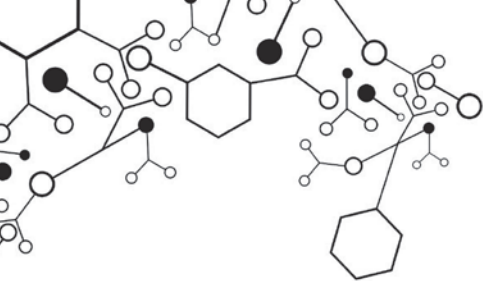
PCR en tiempo real:

Es una innovación de la PCR convencional, más rápida y sensible, donde es posible cuantificar la carga de ácido nucleico que presenta la muestra. Se pueden realizar los mismos protocolos con enzimas aptas para tiempo real, se pueden utilizar cebadores específicos e intercalantes de ADN o cebadores degenerados y una sonda específica de genotipo para lo que se quiere amplificar o cebadores específicos de genotipo y un intercalante de ácidos nucleicos en el caso de una PCR simple, esto no sirve para PCR múltiple. Además se puede también realizar una retrotranscripción de los ARN mensajeros de las oncoproteínas (RT) seguida de PCR, RT-PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos por esta metodología tienen importancia clínica porque se detecta una infección activa. Puede ser diseñada "in house", pero hay ensayos comerciales que combinan la amplificación con la detección por tiempo real con sondas en horquilla específicas de genotipo, incluyendo los 5 genotipos más comunes a nivel mundial, VPH 16, 18, 31, 33 y 45 (NASBA).

DETECCIÓN CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA

Test de Papanicolau

Esta metodología toma el nombre de su creador Dr. George Papanicolau en 1928, la cual se generalizó y comenzó a utilizar como herramienta de screening a partir de 1950. Consiste en la toma de muestra de las células del exocervix, por medio de cepillo o espátula, y se realiza un frotis. Una vez realizada la toma se dispone en una laminilla y se fija, para luego teñir las células con colorantes, hematoxilina, ácido clorhídrico, Naranja G y EA36, así se observan las estructuras citológicas de las células tomadas y se ven las anomalías o no por microscopía (Papanicolaou, 1942). Desde que es usada la técnica de PAP para el cribado en los programas de lucha contra el cáncer, entre un 80% y 90% de los carcinomas son prevenibles, sin embargo, la técnica posee algunas limitaciones; toma de muestra, condición de la paciente al momento de la toma (debe cumplir con ciertos requisitos), calidad de los extendidos, dificultad en la detección de lesiones inaccesibles a la toma y diferencias en la sensibilidad de la técnica, que varía según la clase citológica y es dependiente del operador. La detección de anomalías por PAP tiene una sensibilidad del 60%-85%, dependiendo de los factores mencionados y una sensibilidad de aproximadamente 90%. Tiene más de un 15% de falsos negativos, lo que podría ser un riesgo de manera de no detectar una lesión grave (Kulasingam et al., 2002; Mustafa et al., 2016).



Colposcopia

Es un examen macroscópico visual de la vagina y el cérvix, empleando un colposcopio. En general es una técnica que se realiza de apoyo al PAP, cuando los resultados de éste presentan anomalías. Para la identificación de las anomalías se utiliza ácido acético o lugol, sustancias que posibilitan la diferenciación de la mucosa normal y la patológica. También tiene limitaciones, es operador dependiente lo que encarece el cribado, puede no diagnosticar lesiones inalcanzables. Tiene una sensibilidad del 69% y una especificidad del 87% (Mustafa et al., 2016).

Biopsia

Es una toma de muestra con ayuda del colposcopio de una lesión en el cérvix, se emplea generalmente para confirmar el diagnóstico citológico y colposcópico. Se realiza un análisis anatomopatológico de las muestras biopsiadas. Es una técnica costosa porque requiere la intervención de varios especialistas.

Necesidad del diagnóstico de la infección por VPH

En 2008, la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (CHLCC) y el Programa Nacional de Control de Cáncer del Ministerio de Salud Pública publicaron un manual de procedimientos y estrategias de cribado primario para la prevención del cáncer de cuello uterino, en el que se recomienda el screening por PAP a mujeres entre 30 y 64 años. Luego de tres citologías normales se considera su repetición cada tres años, en caso de anomalías se realizará colposcopia y biopsia de la lesión y considera el seguimiento de la paciente según el diagnóstico; lo que dictamine el médico en caso de LSIL, y en caso de HSIL se recomienda el seguimiento por ambas tecnologías cada 6 meses por 2 años, si es carcinoma se deriva a un centro oncológico. En nuestro país aún no se realizan técnicas moleculares para el cribado en la prevención del cáncer de cuello debido al alto costo de las mismas (Rodríguez, 2008).

DETECCIÓN SEROLÓGICA

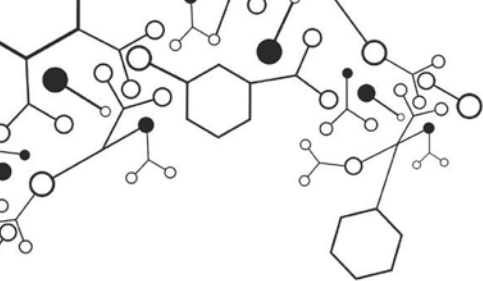
Como se describió con anterioridad en la sección de Inmunidad, la infección por VPH desencadena inmunidad celular y humoral, siendo la humoral productora de anticuerpos principalmente IgG dirigidos contra las proteínas de la cápside principalmente contra L1. Las IgG anti L1 y L2 presentes en la sangre del paciente pueden ser indicadores de infecciones recientes o pasadas, la seroconversión luego de una infección por VPH se lleva a cabo entre los 6 y 18 meses luego de la detección del ADN. Esto ocurre en una infección persistente, sin embargo, en una infección transitoria como son la mayoría de las infecciones por VPH, son pobremente detectables. En las mujeres, que han cursado una infección natural por VPH, la respuesta de anticuerpos es detectada en un 50-70%, y es pobre en título de anticuerpos, al contrario de lo que ocurre tras la vacunación donde los títulos de anticuerpos alcanzados son del 100% y se prolongan en el tiempo (Mesher et al., 2016).

Las metodologías serológicas comerciales se basan en ensayos inmunoenzimáticos, ELISA, o radioinmunoensayos, RIA o ensayos de neutralización, todos con baja sensibilidad, de alrededor del 50% (Gutierrez-Xicotencatl et al., 2009). Existe un estudio coordinado por la Organización Mundial de la Salud, cuyo propósito fue la estandarización de los métodos serológicos. Para ello se utilizaron 10 laboratorios que empleaban varias de las técnicas comentadas y de este estudio se observó que los ensayos de anticuerpos neutralizantes contra un genotipo no neutralizaban las muestras con otro genotipo. También hace notar que los títulos de una muestra varían según el ensayo utilizado y esto puede deberse a las VLP utilizadas y la definición de la línea de corte. Este estudio demostró que una norma internacional deberá ser usada para las técnicas de neutralización, para mantener un enfoque de confirmación en la evaluación de las muestras estudiadas por inmunoensayos y aun no existe tal patrón de referencia (Ferguson et al., 2006).

VACUNAS

El desarrollo de vacunas profilácticas contra VPH comenzó hace más de dos décadas, inició con el descubrimiento del autoensamblaje de L1 y su capacidad de ser neutralizada por anticuerpos, estas VLP son idénticas a los virus salvajes pero no tienen genoma en su interior, son partículas vacías, altamente inmunogénicas pero no infectivas (Rose et al., 1993).

En la actualidad, existen tres vacunas disponibles en el mercado aprobadas por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), para prevenir la infección por VPH, las mismas son: Cervarix de la compañía GlaxoSmithKline; Gardasil y Gardasil 9 de la empresa Merck Sharp & Dohme Corp. Las tres vacunas están diseñadas en base a VLPs y previenen infecciones contra VPH 16 y 18, dos de los genotipos de alto riesgo, que como fue mencionado, están presentes en más del 70% de los carcinomas de cérvix a nivel mundial y también presentes en alto porcentaje en cánceres no cervicales como los carcinomas anales o los de orofaringe (Chaturvedi et al., 2011; Gillison, Chaturvedi, and Lowy, 2008). Cervarix es bivalente, diseñada únicamente con VLP de VPH genotipos 16 y 18, los estudios de anticuerpos neutralizantes muestran títulos del 100% a partir de la primera dosis, muy superiores a los generados por una infección natural, además de presentar algo de protección cruzada contra otros dos VPH-AR, genotipos 31 y 45 (Draper et al., 2013). Gardasil es cuadrivalente, contiene VLP de VPH genotipos 16, 18 y también los genotipos de bajo riesgo 6 y 11, por lo que previenen la infección de los genotipos que causan en un 90% los condilomas genitales, en cuanto a los títulos de anticuerpos alcanzan más del 80% para VPH genotipos 6 y 11, y del 100% contra VPH genotipos 16 y 18, no son buenos los títulos de anticuerpos generados por reacción cruzada contra VPH genotipos 31 y 45 (Draper et al., 2013; Ferris et al., 2014). Gardasil 9 es una segunda generación de vacunas, es nonavalente, previene infecciones contra los VPH-BR genotipos 6 y 11, y contra los VPH-AR genotipos 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58, se estima un impacto potencial entre 85% a 92% en la prevención de carcinomas cervicales, 77% a 90% en la prevención HSIL, 26% a 56% para LSIL, 69% a 90% para condilomas genitales, 81% a 93% previniendo carcinomas anales y 41% a 44% previniendo carcinomas orofaríngeos (Riethmuller et al., 2015).



En base a los ensayos clínicos realizados, se evidencia que la vacunación contra VPH contribuiría a una reducción de las tasas de carcinoma de cérvix a nivel mundial, incluidos también otros carcinomas asociados a la infección por VPH, además de reducir las tasas de lesiones pre-cancerosas HSIL y LSIL y los condilomas genitales, en el caso de la implementación de las vacunas cuatri y nonavalente. En el mes de Octubre del corriente, el MSP anunció la obligatoriedad de la vacuna en nuestro país, a partir del 2017 se incorporará la vacuna cuadrivalente contra éste virus en el Certificado Esquema de Vacunación (CEV) para niñas de 12 años.

FACTORES DE RIESGO Y POSIBLES MARCADORES ONCOGÉNICOS

Existen muchos factores de riesgo asociados a la infección por VPH, la persistencia de la misma y la progresión a carcinomas. El inicio temprano de la actividad sexual y el número de parejas sexuales, aumentan la probabilidad de encontrarse con un VPH-AR, sin embargo, no tienen relación con la persistencia o la progresión de las lesiones pre-cancerosas a carcinomas. Existen factores del hospedador que sí actúan como factores de riesgo: el uso de anticonceptivos orales (ACO), la multiparidad, el consumo de tabaco y las coinfecciones con otros microorganismos.

Está establecido que el consumo de ACO por más de 5 años ininterrumpidos aumenta el riesgo a desarrollar carcinomas. La multiparidad está asociada con un aumento de 4 veces la carcinogénesis, esto podría deberse al mantenimiento de la zona de transformación o a la carga hormonal en cada concepción. El hábito de fumar también presenta un riesgo, varios estudios han demostrado la presencia de nicotina en el mucus cervical y se ha observado un aumento significativo del riesgo de cáncer de cuello de útero en pacientes fumadoras con respecto a no fumadoras. Por último, las coinfecciones con otros microorganismos de transmisión sexual como el virus de la inmunodeficiencia humano (VIH), Herpesvirus o Chlamydia trachomatis, aumentan el riesgo de progresión a carcinomas (Alam et al., 2008; Roura et al., 2016; Silva, Cerqueira, and Medeiros, 2014; Szostek et al., 2009).

Existen otros factores de riesgo propios del hospedador o del VPH-AR que detallaremos en los próximos capítulos de ésta tesis, que podrían actuar como marcadores oncoogénicos, entre ellos encontramos la diversidad del genotipo presente en la infección, la carga viral, características genéticas propias del hospedador y la expresión de las oncoproteína.

IMPORTANCIA DE LA TEMÁTICA A ABORDAR

El principal interés en este virus hoy día se encuentra relacionado con su rol en el desarrollo de carcinomas de cuello de útero. Sin embargo, desde la década del '70 varios investigadores han tratado de establecer la relación entre la infección por VPH y el desarrollo de carcinomas. Fue en esos días donde comenzaron los estudios de observación de frotis de cepillados cervicales y se detectaron coilocitos que indicaban la presencia de infección por virus. Fue a partir de observaciones "raras", en las que se desarrollaba malignidad, que se planteó la hipótesis de que los carcinomas de cuello uterino podrían desarrollarse a partir de la infección por un virus detectado en las verrugas genitales (Meisels and Fortin, 1976; zur Hausen, 1976; zur Hausen, 1977; zur Hausen et al., 1975). Más tarde se desarrollaron varios estudios a gran escala que demostraron

que éste virus era causa necesaria, aunque no suficiente, del desarrollo de carcinomas, hallándose una positividad de más del 90%, casi en el 50% de los carcinomas de cérvix donde se detecta un genotipo de alto riesgo, éste es el VPH genotipo 16, y en un 20% adicional, el genotipo 18, y en el resto de los carcinomas otros VPH-AR fueron detectados (Bosch et al., 1995; Munoz et al., 2003). Desde entonces se estableció la fuerte relación entre la infección por VPH y el desarrollo de carcinogénesis a nivel del cuello uterino, pero también su presencia en menor proporción, (alrededor del 5%), en carcinomas de pene, vulva, vagina y ano (Parkin and Bray, 2006).

En nuestro país existen informes sobre prevalencia de infección por VPH en población general y genotipos circulantes (citados en "Situación en Uruguay", página 27), sin embargo, no hay datos de pacientes viviendo con VIH, donde también de la literatura surge que el VPH 16 es el genotipo más frecuentemente hallado, y tampoco hay datos sobre variantes de ese genotipo. Con respecto a los distintos factores de riesgo que podrían estar involucrados y que podrían utilizarse como posibles marcadores oncogénicos asociados a la enfermedad hay escasos datos. Con respecto al virus, la carga viral, si bien es discutida su información como biomarcador, existen antecedentes de su utilización como pronóstico para la progresión a carcinogénesis; la expresión de oncoproteínas, también sería un posible marcador oncogénico y en cuanto a la genética del hospedador, los polimorfismos del gen supresor de tumor p53 también podrían actuar como marcadores oncogénicos, responder ésta falta de información por medio de los objetivos que nos planteamos conforma nuestra hipótesis de trabajo.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Identificar los genotipos circulantes de VPH procedentes de pacientes con distintos grados de citología, en población general y en una población de mujeres viviendo con VIH, y evaluar algunos posibles marcadores oncogénicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

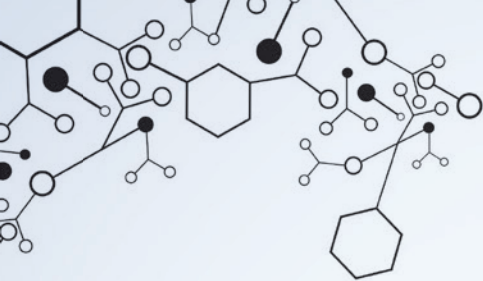
Estudio de la frecuencia y circulación de genotipos de VPH en Uruguay

Detectar genoma de VPH en muestras cervicales de pacientes con lesiones intraepiteliales asociadas a este virus mediante una PCR genérica en población general y en pacientes viviendo con VIH.

Genotipificar los VPHs detectados por medio de restricción enzimática del producto de PCR amplificado o por hibridación reversa en línea.

Investigar posibles remociones de la infección por VPH en pacientes con tratamiento antirretroviral de alta actividad (TARGA).

Correlacionar el estado viral e inmunológico de los individuos involucrados en el estudio coinfectados con VIH y VPH.



Investigar la variabilidad genética e identificación de variantes del VPH genotipo 16

Determinar la variabilidad genética de VPH genotipo 16 y la relación filogenética de los mismos con los circulantes en la región y el resto del mundo, mediante amplificación, secuenciación y análisis de los fragmentos génicos.

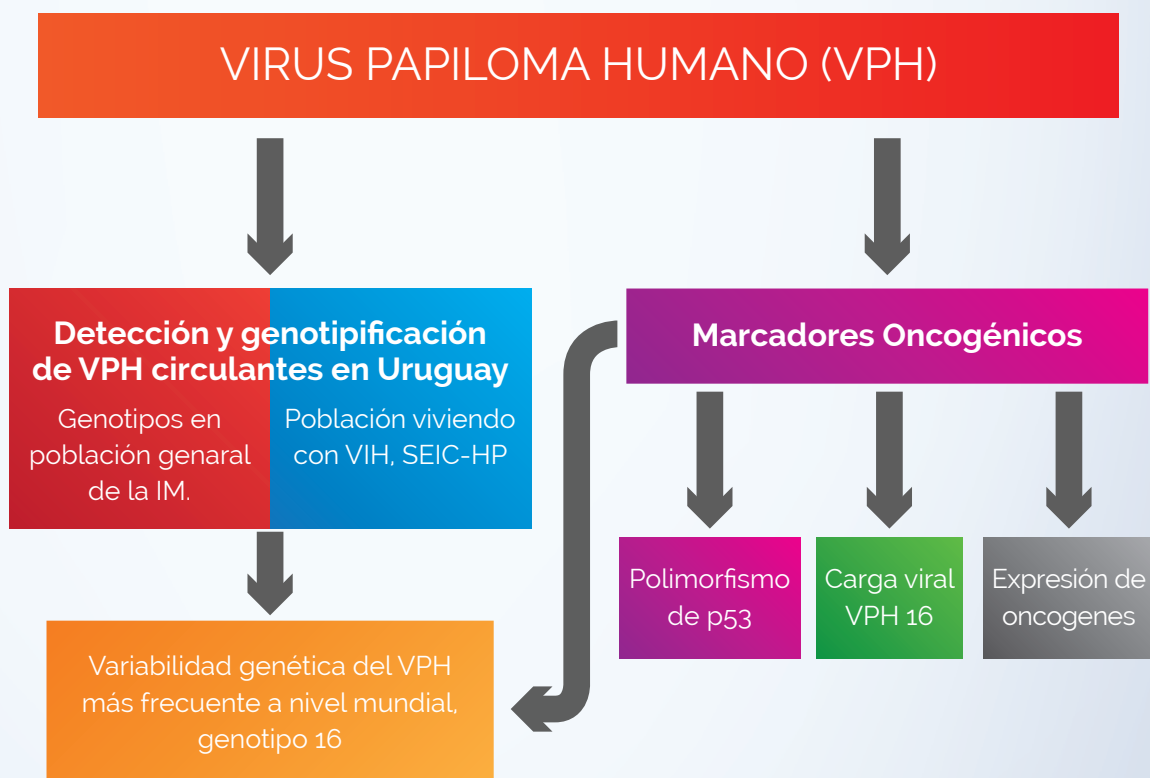
Indagación sobre posibles marcadores oncogénicos en los pacientes

Determinar los polimorfismos en el codón 72 del gen supresor de tumor p53 en muestras de pacientes positivas y controles.

Identificación de posibles marcadores oncogénicos virales

Determinar la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH y la carga viral en las muestras positivas para el VPH genotipo 16 detectado con mayor frecuencia, mediante amplificación en tiempo real de un fragmento de los genes que expresan las oncoproteínas.

FLUJOGRAMA DEL MANUSCRITO





Capítulo 1

CIRCULACIÓN DE GENOTIPOS Y VARIANTES DE VPH 16 EN URUGUAY

FRECUENCIA Y CIRCULACIÓN DE GENOTIPOS DE VPH EN URUGUAY

La infección por VPH-AR es la condición necesaria, aunque no estrictamente suficiente para el desarrollo de carcinomas, hoy en día, se conocen más de 40 genotipos diferentes que infectan el tracto genital, siendo la mayoría de los mismos de alto riesgo (Bernard et al., 2010; Bouvard et al., 2009; de Villiers, 2013). Varios estudios han revelado que la distribución y las frecuencias de los distintos genotipos de VPH varían según la zona geográfica de donde provienen las muestras de las pacientes, y además depende la gravedad de la lesión de las muestras estudiadas (Bosch et al., 1995; Clifford et al., 2005; Munoz et al., 2003).

En nuestro país, al igual que en otros países en vías de desarrollo, las tasas estandarizadas por edad de incidencia y mortalidad para el cáncer cervical son 19 y 7.5 por 100.000 mujeres, muy superiores a las que presentan los países desarrollados (GLOBOCAN, 2012). El manejo de datos sobre la epidemiología molecular de la infección por VPH en Uruguay podría proveer de información relevante para la optimización de los programas para la prevención contra el cáncer de cuello uterino, es por ello que fue planteado como uno de los objetivos de ésta tesis la determinación de la distribución y frecuencia de los genotipos circulantes en mujeres uruguayas inmunocompetentes y viviendo con VIH.

GENOTIPOS CIRCULANTES EN POBLACIÓN GENERAL

El trabajo enfocado en la detección y genotipificación de los VPH circulantes radicó en determinar la frecuencia de los genotipos en pacientes con lesiones intraepiteliales a nivel de cuello uterino. Desde el punto de vista diagnóstico, la caracterización de los genotipos circulantes nacionales y regionales es de importancia a la hora de aplicar e implementar nuevos programas de prevención y metodologías de tamizaje. Los resultados de este estudio se concretaron en una publicación, en la cual se detallan por primera vez estos hallazgos. El manuscrito titulado "Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from Uruguayan women" fue publicado en la revista internacional arbitrada *Journal of Medical Virology* (vol 85, 2013, 845-851. DOI: 10.1002/jmv.23479).

Human Papillomavirus Genotypes Distribution in Cervical Samples From Uruguayan Women

Viviana Ramas,¹ Santiago Mirazo,¹ Sylvia Bonilla,² Laura Mendoza,³ Olga Lago,² Jorge Basiletti,⁴ Joaquín González,⁴ María Alejandra Picconi,⁴ and Juan Arbiza^{1*}

¹Virology Department, Faculty of Science, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

²Cytology Laboratory, Health Care Service, Municipality of Montevideo, Uruguay

³Department of Public Health and Epidemiology, Research Institute of Health Science, University of Asunción, Asunción, Paraguay

⁴Institute for Clinical Effectiveness and Health Policy, Buenos Aires, Argentina

Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HPV) causes cervical preneoplastic lesions and invasive cervical cancer. This study evaluated the prevalence and distribution of HPV genotypes in cervical exfoliated cells from Uruguayan women. Five hundred sixty-eight cervical specimens were examined by PCR using MY09/11 primer set, and were genotyped by restriction enzyme digestion (RFLP). Some of the samples which remained undetermined were reanalyzed by PGMY PCR combined with reverse line blot hybridization. Overall, about 42% of samples were positive for HPV; 96% in high-grade squamous intraepithelial lesion, 66% in low-grade squamous intraepithelial lesion, 15% in atypical squamous cells of undetermined significance, and 19% in samples negative for intraepithelial lesion or malignancy. HPV 16 was the most commonly found genotype, followed by HPV 68 and 58. Within low risk—HPV genotypes 6, 61, and 11 were the most frequent. This is the first cross-sectional study, accounting for prevalence and genotype distribution of HPV in Uruguayan women. **J. Med. Virol. 85:845–851, 2013.**

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: HPV prevalence; squamous intraepithelial lesion; cross-sectional study

INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) infection is the major risk factor for the development of invasive cervical carcinoma and precancerous squamous intraepithelial lesions, being the DNA of HPV detected in nearly all invasive cervical cancer [Bosch et al., 1995; IARC, 1995; Munoz et al., 1996; Villa and Franco, 1998;

Walboomers et al., 1999; Bosch et al., 2002; zur Hausen, 2002].

To date, more than 60 different HPV genotypes have been found to infect the anogenital tract with some of the genotypes classified as high-risk (HR-HPV) genotypes due to their oncogenic potential. HR-HPV genotypes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, and 68 account for more than 90% of invasive cervical cancer cases, and are believed to increase the risk of precancerous lesions and the progression to carcinoma. Several genotypes including 30, 34, 69, 85, and 97 are classified by phylogenetic analogy to HPV types with sufficient evidence of carcinogenicity in humans. Finally, types 26, 53, 66, 67, 70, 73, and 82 have limited evidence for invasive cervical cancer in humans. Infections with low-risk genotypes (LR-HPV), such as HPV type 6 or 11 can cause benign or low-grade changes in cells of the cervix and condiloma acuminata, commonly referred as genital warts [de Villiers et al., 2004; Bouvard et al., 2009].

Invasive cervical cancer is the most common type of cancer in women worldwide, with an estimated incidence rate of about 500,000 cases annually and a mortality rate of approximately 50% [Parkin et al., 2005]. Women living in South America present a high prevalence of invasive cervical cancer with rates ranging from 19 per 100,000 in Uruguay to 55 per 100,000 in

Grant sponsor: Honorary Commission to Prevent Cancer-Manuel Pérez Foundation; Grant sponsor: Municipality of Montevideo; Grant sponsor: National Agency for Research and Innovation; Grant sponsor: Development Program of Basic Science.

Authors declare that there is no conflict of interest with regard to the work presented in this article.

*Correspondence to: Juan Arbiza, Facultad de Ciencias, Sección Virología, Universidad de la República, Montevideo, Iguá 4225, Uruguay. E-mail: jarbiza@fcien.edu.uy

Accepted 25 October 2012

DOI 10.1002/jmv.23479

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

© 2013 WILEY PERIODICALS, INC.

Bolivia in women aged 35 through 64 years [de Sanjose et al., 2010]. Uruguay has one of the lowest invasive cervical cancer rates in the region [Rodríguez et al., 2005; Comisión honoraria de lucha contra el cáncer, 2007]; however, these rates far exceed those found in the United States (approximately 4 per 100,000). In addition, mortality due to this cancer in Latin America is at least fourfold higher than in the United States [de Sanjose et al., 2010].

In Uruguay, a country located geographically in a region with high invasive cervical cancer rates, data on the epidemiology of HPV are not available. Therefore, this cross-sectional study was performed with the aim to establish the prevalence of HPV infection and genotype distribution in women with cervical squamous intraepithelial lesions and women without intraepithelial lesion or malignancy. The data reported provide relevant information for the implementation of invasive cervical cancer prevention programs and to understand better the molecular epidemiology of HPV infection in the Americas.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Patients

Patients were enrolled from the cervical screening clinics which are part of the National Cervical Cancer Prevention Sub-Program, Ministerio de Salud Pública, Uruguay. To be eligible, women had to be not pregnant, not to have history of previous neoplastic disease, be older than 14 and had not been vaccinated against HPV. During the period from October 2008 to December 2010, 568 patients were selected according to the inclusion criteria. For all participants, a general gynecological examination was conducted. After a conventional smear had been prepared, a second cell sample was taken using the same brush which was swirled in sterile physiological serum pH 7.4 and conserved at 4°C until processing. The cytology was made without knowledge of HPV results.

All volunteer participants gave their written informed consent for participation in this investigation. The study design had been approved by Faculty of Medicine's Ethics Committee.

Cytological Diagnosis and Sample Collection

Smears were cytologically diagnosed according to the Bethesda classification system [Solomon et al., 2002], and confirmed by histology in case of squamous intraepithelial lesion any grade results.

HPV-DNA Detection and Genotyping

Total DNA was extracted by a standard phenol-chloroform purification protocol [Maniatis et al., 1989]. HPV DNA was detected by PCR using degenerate consensus primers set MY09/11, targeting a region of approximately 450 bp of the viral L1 gene. Positive samples were genotyped by restriction enzyme digestion of PCR products (RFLP assay) [Manos et al., 1989;

Bernard et al., 1994]. Briefly, aliquots of the PCR products were mixed with 10 U of seven different restriction enzymes (*Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*FI, *Pst*I, *Rsa*I, and *Sau*3AI) in separate reactions. Digestion products were separated by 3% agarose gel and visualized with ethidium bromide staining under UV light exposure. Finally, the band patterns obtained were compared with published data [Bernard et al., 1994].

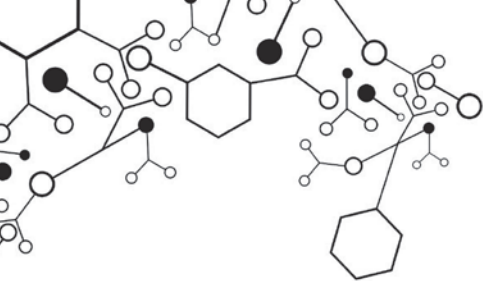
As internal control of quantity and quality of the specimens, the PC04/GH20 primer set previously reported [Saiki et al., 1985] was employed to amplify a 268 bp region of the human beta-globin gene. PCR was carried out in 5 µl mix volume, containing 2.7 µl of µRNase-free water, 1 µl buffer 10×, 0.3 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl dNTPs (2 mM), 0.22 µl of each PC04/GH20 primer (50 µM), and 0.1 µl of Taq polymerase, (Invitrogen by Life Technologies, Vila Guarani, Sao Paulo, Brazil). Five microliters of DNA template was added.

When the detection by PCR MY09/11 was positive but showed an unidentifiable restriction pattern, the untyped samples (U/T) with sufficient quantity were reanalyzed by the PGM09/11 PCR followed by reverse line blotting (RLB) hybridization system as described elsewhere [Estrade et al., 2011]. Briefly, a PCR using 17 primers (5 of which were biotin-labeled) was performed. These primers target a region of approximately 450 bp in the L1 viral region. The PCR products were typed by RLB hybridization using the type-specific oligoprobes corresponding to 36 HPV types (HPVs 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59a, 59b, 66, 68, 6, 11, 26, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57a, 57b, 69, 70, 73, 82/MM4, 82/IS39, 83 [MM7], and 84 [MM8]). Positive reactions were revealed by chemiluminescence using an ECL kit, according to the manufacturer's recommendations (Amersham™ ECL™ Detection Reagents, GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

For both PCRs, CaSki, and HeLa cell DNAs (which harbor HPV 16 and 18 sequences, respectively) were used as positive controls and water as a negative control.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using descriptive and analytical statistics with the help of the software pack, EpiInfo 6.0, Center for Disease control & Prevention, USA. Statistical significance (*P*-value) for differences in dichotomous variables was tested using a chi-square test or Fisher exact test, whichever was applicable. To estimate the distribution of HPV genotypes, single and multiple HPV infections were considered either separately. The prevalence ratios and their corresponding confidence intervals (CIs) were used to compare the relative frequency of the most common HPV types detected in HPV positive women with different degrees of cervical lesions with that of HPV positive women negative for squamous intraepithelial lesions. In the presence of zeros at all frequencies, a value of 0.5 was added.



RESULTS

Cytological and Histological Diagnosis

According to Bethesda system of classification [Solomon et al., 2002], 568 clinical specimens were grouped as follows: 179 low-grade squamous intraepithelial lesion, aged 17–59 years; 48 high-grade squamous intraepithelial lesion, aged 17–64 years; 26 atypical squamous cells of undetermined significance, aged 19–57 and 243 negative for intraepithelial lesion or malignancy, aged 18–62 years. Seventy two samples could not be properly diagnosed (n/d) and full epidemiological information, including age was not available. Additionally, in 12 of the samples with cytological diagnosis, age data did not exist.

For low-grade squamous intraepithelial lesion and high-grade squamous intraepithelial lesion, histological diagnosis was in concordance with cytological findings.

HPV-DNA Detection and Genotyping

Beta-globin amplification indicated that DNA obtained from all specimens was suitable for PCR. A total of 238 HPV infections were detected, 96 of which were genotyped by PCR My 09/11-RFLP and only single infections were detected. Sixty-six of the remaining positives samples were tested using PGMY09/11PCR followed by RLB hybridization. Using this technique, in 24 (36.4%) samples only one genotype was identified, while in 34 samples (20.7%) two or three genotypes were detected.

Among 238 positive samples, by using both techniques, 162 samples could be genotyped (68.1%) and in the 76 (31.9%) remaining samples, HPV genotype could not be determined (U/T samples), basically due to the absence of enough DNA material. HPV infection distribution, per age and cytological class is shown in Table I.

Positive samples distribution by cytological class were 18.5% in negative for intraepithelial lesion or malignancy, 15.4% in atypical squamous cells of undetermined significance, 65.9% in low-grade squamous intraepithelial lesion, 95.8% in high-grade squamous intraepithelial lesion, and 34.7% in undiagnosed samples. Within 238 HPV positive samples considering

single and multiple infections, HR-HPV types were more frequent than LR-HPV types (194/238; 81.5% vs. 13/238; 5.5%). The most common HR-HPV types were HPV 16 (28.6%), followed by HPV 68 (10.1%). Among LR-HPV, type 6 was the most frequent, followed by HPV 61 and HPV 11. Genotype distribution per cytological class is shown in Table II.

Figure 1 shows the age-related overall HPV frequency in all samples and prevalence of HR-HPV and LR-HPV infections in HPV positive samples. The overall HPV prevalence appeared in a reversed J-shaped with a slight higher frequency in women younger than 30 years (53–44.4%). By contrast, for HR-HPV a J-shaped curve was observed, indicating a higher prevalence in women older than 50 years. On the other hand, the frequency of LR-HPV showed a U-shaped curve.

Among the 139 cases with low-grade squamous intraepithelial lesion or high-grade squamous intraepithelial lesion and without an intraepithelial lesion or malignancy, and a valid HPV genotyping, a higher prevalence ratio of HPV 16 was observed with the severity of the cervical lesion, with a prevalence ratio of 2.0, 95% CI (0.9–4.5) detected in women with high-grade squamous intraepithelial lesion. Multiple-type infections were only detected in HPV positive women with low-grade squamous intraepithelial lesion and high-grade squamous intraepithelial lesion, presenting a prevalence ratio of 10.7 (0.7–170.7) and 16.5 (1.0–262.4), respectively (Table III).

DISCUSSION

This study describes the distribution of HPV types in exfoliated cervical cells collected from Uruguayan women according to the cytological and/or histological diagnosis. Several international meta-analyses have described previously the HPV genotypes detected in low-grade squamous intraepithelial lesion, high-grade squamous intraepithelial lesion and cancer [Bosch et al., 1995; Clifford et al., 2005]; however, the representation of Uruguayan samples in these studies was null.

Overall, the prevalence of HPV infection reported in these samples was 41.9%. It is important to consider the group studied when interpreting HPV prevalence because that infection type and frequency of HPV

TABLE I. HPV Infection Distribution, per Age and Cytological Class

HPV positive	≤30 years	31–50 years	≥51 years	Total
NILM	16/76 (21.1%)	24/143 (16.8%)	5/17 (29.4%)	45/236 (19.1%)
Ascus	2/6 (33.3%)	2/15 (13.3%)	0/4 (0%)	4/25 (16%)
L-SIL	70/100 (70%)*, ^a	42/70 (60%)*, ^a	5/6 (83.3%)	117/176 (66.5%)*, ^a
H-SIL	22/22 (100%)*, ^a	18/20 (90%)*, ^a	5/5 (100%)*, ^b	45/47 (95.7%)*, ^a
Total	110/204 (53.9%)	86/248 (34.7%)	15/32 (46.9%)	211/484 (43.6%)

NILM, negative for intraepithelial lesion or malignancy; L-SIL and H-SIL low and high squamous intraepithelial lesions, respectively; ASCUS, atypical squamous cells of undetermined significance.

Samples without cytological data are not included. Twelve samples from women without age data were not included.

*Statistical analysis is shown only for significant results ($P < 0.005$).

^a $P < 0.00001$.

^b $P < 0.01$.

TABLE II. HPV Genotype Distribution According to the Results of Cytological Diagnosis

	NILM	ASCUS	L-SIL		H-SIL		n/d	Total
			Single	Multiple	Single	Multiple		
LR-HPV								
6	2 (0.8%)			1 (0.6%)	1 (2.1%)	1 (2.1%)		5 (2.1%)
11			1 (0.6%)		1 (2.1%)		1 (1.4%)	3 (1.3%)
61	2 (0.8%)	1 (3.9%)	1 (0.6%)					4 (1.7%)
81			1 (0.6%)					1 (0.4%)
HR-HPV								
16	5 (2.1%)	1 (3.9%)	24 (13.4%)*,a	8 (4.5%)	13 (27.1%)*,b	9 (18.8%)	9 (12.5%)	69 (28.6%)
18	3 (1.2%)		1 (0.6%)				1 (1.4%)	5 (2.1%)
26			1 (0.6%)					1 (0.4%)
31	1 (0.4%)		1 (0.6%)	1 (0.6%)	1 (2.1%)	1 (2.1%)		5 (2.1%)
32			1 (0.6%)					1 (0.4%)
33	2 (0.8%)		2 (1.1%)		1 (2.1%)		1 (1.4%)	6 (2.5%)
39			1 (0.6%)			1 (2.1%)		2 (0.8%)
44				1 (0.6%)				1 (0.4%)
45					1 (2.1%)	1 (2.1%)	1 (1.4%)	3 (1.3%)
51			3 (1.7%)	7 (3.9%)		4 (8.3%)		14 (5.9%)
52	1 (0.4%)				1 (2.1%)	5 (10.4%)		7 (2.9%)
53†	1 (0.4%)			1 (0.6%)	1 (2.1%)	4 (8.3%)	2 (2.8%)	9 (3.8%)
56				1 (0.6%)				1 (0.4%)
58	3 (1.2%)	1 (3.9%)	7 (3.9%)	1 (0.6%)	4 (8.3%)*	2 (4.2%)	2 (2.8%)	20 (8.4%)
59	1 (0.4%)		1 (0.6%)	6 (3.4%)		1 (2.1%)		9 (3.8%)
62							1 (1.4%)	1 (0.4%)
66†			2 (1.1%)			7 (14.6%)		9 (3.8%)
68			8 (4.5%)	11 (6.1%)	1 (2.1%)	4 (8.3%)		24 (10.1%)
70				1 (0.6%)				1 (0.4%)
82†					1 (2.1%)		1 (1.4%)	2 (0.8%)
84			2 (1.1%)		1 (2.1%)		1 (1.4%)	4 (1.7%)
U/T	24 (9.9%)	1 (3.9%)	43 (24%)		3 (6.3%)		5 (6.9%)	76 (31.9%)
Total Positives	45 (18.5%)	4 (15.4%)	118 (65.9%)*,b		46 (95.8%)*,b		25 (34.7%)	238 (41.9%)
Total Negatives	198 (81.5%)	22 (84.6%)	61 (34.1%)		2 (4.2%)		47 (65.3%)	330 (58.1%)
Total	243	26	179		48		72	568

NILM, negative for intraepithelial lesion or malignancy; L-SIL and H-SIL, low and high squamous intraepithelial lesions, respectively; LR-HPV, low risk human papillomavirus; HR-HPV, high risk human papillomavirus.

†HPV with limited evidence in carcinogeny in humans [Bouvard et al., 2009], ASCUS: Atypical squamous cells of undetermined significance; n/d, not cytologically diagnosed; U/T, untyped.

*Statistical analysis is shown only for significant results ($P < 0.005$).

^a $P = 0.00001$.

^b $P < 0.00001$.

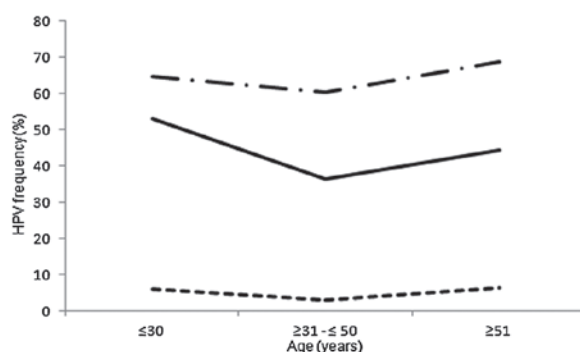


Fig. 1. HPV prevalence according to age range. Age-related overall HPV prevalence in total samples and prevalence of HR-HPV and LR-HPV infections in HPV positive samples. HPV positives samples. Overall frequency —; HR-HPV (high risk-HPV) -----; LR-HPV (low risk-HPV)

varies in different groups of age, geographic areas, and type of samples (normal cytology vs. lesions of different degree of severity) [Clifford et al., 2005].

Most of the HR-HPV genotypes detected in this work are associated commonly with invasive cervical cancer worldwide [Clifford et al., 2005] and its relative frequency is comparable with the findings reported from other Latin American countries (nearly 30% for the most frequent type and 10% for the second) [Torroella-Kouri et al., 1998; Ferreccio et al., 2004; Tonon et al., 2004; Paesi et al., 2009]. The specific HPV genotypes found in this study appear to be slightly different from the findings reported in some South American countries [Herrero et al., 2000; Rabelo-Santos et al., 2003; Ferreccio et al., 2004; Tonon et al., 2004]; however, it is important to note that the 31.9% of HPV positive samples that remained untyped may affect slightly the results.

In women without intraepithelial lesion or malignancy, a prevalence of 18.5% was observed in this study (Table II), being slightly higher than that

TABLE III. Prevalence of Selected Human Papillomavirus Types in 139 Women With Type Specific HPV-Positive Infection According to the Results of Cyto-Histological Diagnosis

HPV type	NILM, all (%) ^a	L-SIL all (%) ^a , prevalence ratio (95% CI)	HSIL all (%) ^a , Prevalence ratio (95% CI)
Total	21	75	43
HPV 16	5 (24)	32 (43); 1.7 (0.8–3.7)	22 (51); 2 (0.9–4.5)
HPV 16/18	8 (38)	33 (44); 1.14 (0.6–2.5)	22 ^b (51); 1.3 (0.7–2.4)
Other high-risk types	9 (43)	46 (61); 1.42 (0.9–2.4)	27 (63); 1.5 (0.9–2.5)
Multiple infection	0	18 (24); 10.7 (0.7–170.7)	16 ^c (37); 16.5 (1–262.4)

NILM, negative for intraepithelial lesion or malignancy; L-SIL and H-SIL, low and high squamous intraepithelial lesions, respectively; HPV, human papillomavirus; CI, confidence interval.

^aPrevalence data contain HPV types detected in single and/or multiple infections.

^bHPV 18 was not detected in women with high-squamous intraepithelial lesions.

^cAll women presented multiple infections with at least one type of high-risk HPV.

reported in a meta-analysis for South America (12.3%) [de San José et al., 2007]. HPV 16 was the most prevalent type in samples without intraepithelial lesion or malignancy with a prevalence of 2% similar to the estimated rates worldwide (2.6%) [Clifford et al., 2005; de San José et al., 2007]. Given the tendency of HPV 16 to persist and induce lesions with a greater risk of malignant progression in relation to other HR-HPV, the predominance of HPV 16 observed in women without an intraepithelial lesion or malignancy represents a risk factor for invasive cervical cancer development in the Uruguayan women [Castle et al., 2005; Kjær et al., 2010; Rodríguez et al., 2010]. Less frequent in women without an intraepithelial lesion or malignancy were HPV 18 and 58. However, the high relative frequency of HPV58 is in concordance with a report from southern Brazil [Paesi et al., 2009]. Of note, approximately 10% of the samples without an intraepithelial lesion or malignancy could not be typed. Among the LR-HPV, HPV 6 and 61 were the only genotype found with identical frequencies (50%) and surprisingly HPV 11 was not identified in any case.

In the present study, a total of 65.9% of low-grade squamous intraepithelial lesions were positive for HPV DNA (Table I); a rate slightly smaller than observed in Europe (67.1%), South and Central America (68.3%) [Clifford et al., 2005], and the value obtained in Venezuela (68%) [Correnti et al., 2011]. Although squamous intraepithelial lesions are the result of infection by HPV, HPV has not been detected in a proportion of women with squamous intraepithelial lesions. Previous studies, based on the ALTS data, found no evidence to support the existence of HPV-negative squamous intraepithelial lesion as a distinct biologic entity related to the risk of cervical carcinoma. Such results appear to represent cytological misinterpretations or false negative HPV results [Zuna et al., 2005].

HPV 16 was the most frequent type in single infections (13.4%), with a rate similar than observed in Africa (16.3%) and lower than that of Asia (32.6%) [Clifford et al., 2005]. Less frequent were the infections caused by HPV 68 and 58, 4.5% and 3.9%, respectively, different from Clifford's worldwide meta-

analysis that shows HPV 31 in the second place and HPV 51 and 53 in the third and fourth place. These discordances may be due to the variety of methods employed in the meta-analysis and in the present study. Of note, within the LR-HPV genotypes detected in this group HPV 6 was found as a co-infection with HPV 16.

A total of 95.8% of high-grade squamous intraepithelial lesions were positive for HPV DNA (Table II), which is a higher rate than the pooled proportion of 82.5% found by Ciapponi et al. [2011] in the meta-analysis that included 2,446 women from 18 Latin American and Caribbean countries. In Ciapponi's work, HPV 16 was detected in 47.8% of cases with a single and/or multiple infections, in agreement with the global HPV 16 prevalence in high-grade squamous intraepithelial lesions (46.5%), which ranges from 51.8% in Europe to 33.3% in Oceania [Smith et al., 2007; Bosch et al., 2008]. The prevalence of HPV 16 in Latin America and the Caribbean countries has been reported to be 46.5% [Ciapponi et al., 2011], followed by HPV 18 (8.9%), HPV 58 (8.7%), HPV31 (8%), and HPV33 (6.5%). Here, after HPV16 the most common types were HPV 58 (13%), HPV 68 (10.9%), and HPV 51 (8.7%). Therefore, the results are consistent with those observed worldwide and in Latin America and the Caribbean, confirming that the distribution of HPV types in high-grade squamous intraepithelial lesions does not match completely with that of invasive cervical cancer. HPV types 16, 18, and 45 are less common in high-grade squamous intraepithelial lesions than in invasive cervical cancer, whereas other HPV types are more common particularly, HPV 58, the second-most prevalent type in high-grade squamous intraepithelial lesions in this study. These differences emphasize the importance of HPV type in the risk of progression to cancer, even from high-grade squamous intraepithelial lesions [Ciapponi et al., 2011]. As expected in high squamous intraepithelial lesion, simple infection with LR-HPV was found in only two samples (one HPV 6 and one HPV 11).

Overall within LR-HPV, the most common HPV in squamous intraepithelial lesions is HPV 6 (1.8%), followed by HPV 61 (0.6%), a relatively uncommon

genotype. However, this was also observed in a recent study from southern Brazil [Goncalves et al., 2008].

In the present study, multiple HPV infections were found in 15.3% and 34.8% of positive samples in low-grade squamous intraepithelial lesions and high-grade squamous intraepithelial lesions, respectively. However, coinfections were not detected in samples from women without intraepithelial lesion or malignancy. These results agree with previous reports, where multiple infections are more common in women with squamous intraepithelial lesion (50%) than in those without intraepithelial lesion or malignancy (12.1%) [Herrero et al., 2005; Kjaer et al., 2008]. Recently, Quint et al. [2011] proposed that although there are many viruses that can infect the same anatomical site, only one genotype would be responsible for each lesion. Schmeink et al. [2011] also confirmed that the HPV genotype, multiple infections, smoking, and multiple lifetime sexual partners are co-factors that increase the risk of HR-HPV persistence and the development of high-grade squamous intraepithelial lesions.

Age-specific HPV prevalence has been estimated in different studies worldwide. After the age of 25 years, the prevalence of HPV is higher in less-developed countries than in developed countries, but both show a continuous decline with increasing age until the age of 45–54 years when estimates increase in both regions [Herrero et al., 2000; de San José et al., 2007].

In the present study, two peaks of HPV prevalence were found; in women younger than 30 years and older than 50 years age. There was a slight decrease in prevalence in patients between the age of 30 and 50 years.

According to the age range, a reverse J-shape curve for the overall HPV prevalence was observed (Fig. 1). The second peak of HPV prevalence detected in women older than 50 years, could reflect the recent history of the cancer prevention program implemented in the 1990s, and its lack of impact in the population [Comisión honoraria de lucha contra el cáncer, 2007].

HR-HPV has a strong predominance in all ages, which is in complete agreement with previously reported data from Colombia and Chile [Molano et al., 2002; Ferreccio et al., 2004], where a J-shape curve is detected. It is well known the high HPV prevalence in young women under 30 years old is associated with the initiation of sexual activity. The second peak observed in women older than 51 years old, is probably due to reactivation of cancer associated HPV types.

Regarding the prevalence of LR-HPV, a decrease was observed in women aged 30–50 years with a slight increment in women older than 50 years. However, it has to be considered that LR-HPV types are very uncommon. This U-shape curve may be explained by new exposures of women to HPV at this age. These last two patterns are consistent with several other recent studies [Molano et al., 2002; Ferreccio et al., 2004; de San José et al., 2007].

Apart from geographical differences and specimen type and amount of samples including in this study, HPV prevalence variation may also be the result of detection methods employed. The first genotyping approach of this study was PCR-RFLP strategy because it was used routinely in the Uruguayan laboratory; however, its limitation is known for multiple infections detection. Although the untyped samples with enough amount of material were retested by PGMY PCR-RLB, in about 31.9% of samples the HPV type remained undetermined. Although this study failed in the identity of known genotypes, it is even valuable because it gives for a first time a trend in relation to the HPV type circulation pattern in the Uruguayan population. Further studies should be carried out.

These data were obtained from women living in Montevideo city and represents nearly 50% of the inhabitants of the whole country. They belong to a medium-poor economic social level, with a limited education. Further investigations including a large number of samples from other cities of the country are needed in order to understand better the epidemiology of HPV infection in Uruguay.

REFERENCES

- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. 1994. Identification and assessment of known and novel HPVs by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170: 1077–1085.
- Bosch XF, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman HM, Moreno V, Kurman R, Shah VK, International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancers: A worldwide perspective. *J Nat Cancer Inst* 87:796–807.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244–265.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N. 2008. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26:K1–K16.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglian V. 2009. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogenesis—Part B: Biological agents. *Lancet Oncol* 10:321–322.
- Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM, for the ALTS Group. 2005. Human papillomavirus type 16 infections and two-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 97:1066–1071.
- Comisión honoraria de lucha contra el cáncer (CHLCC), editor. 2007. Programa de Prevención del Cáncer de Cuello Uterino en el Uruguay “Dr Enrique Pouey”. Montevideo, Uruguay: Ministerio de Salud Pública (MSP).
- Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. 2011. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 6:e25493.
- Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. 2005. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: Comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1157–1164.
- Correnti M, Medina F, Cavazza ME, Rennola A, Avila M, Fernandes A. 2011. Human papillomavirus (HPV) type distribution in cervical

- carcinoma, low-grade, and high-grade squamous intraepithelial lesions in Venezuelan women. *Gynecol Oncol* 121:527–531.
- de San José S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: A meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7:453–459.
- de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llobart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menendez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andujar M, Castellsague X, Sanchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Munoz N, Bosch FX. 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 11:1048–1056.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomavirus. *Virology* 324:17–27.
- Estrade C, Menoud PA, Nardelli-Haeffliger D, Sahli R. 2011. Validation of a low-cost human papillomavirus genotyping assay based on PGMV PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. *J Clin Microbiol* 49:3474–3481.
- Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, Ampuero SL, Snijders PJ, Meijer CJ, Vaccarella SV, Jara AT, Puschel KI, Robles SC, Herrero R, Franceschi SF, Ojeda JM. 2004. Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:2271–2276.
- Goncalves MA, Randi G, Arslan A, Villa LL, Burattini MN, Franceschi S, Donadi EA, Massad E. 2008. HPV type infection in different anogenital sites among HIV-positive Brazilian women. *Infect Agent Cancer* 3:5.
- Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, Balmaceda I, Greenberg MD, Alfaro M, Burk RD, Wacholder S, Plummer M, Schiffman M. 2000. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 92:464–474.
- Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Chen S, Rodriguez AC, Burk RD. 2005. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 191:1796–1807.
- IARC. 1995. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Human Papillomaviruses. Lyon, France. IARC Sci Publ 64:15–38.
- Kjaer SK, Breugelmans G, Munk C, Junge J, Watson M, Iftner T. 2008. Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. *Int J Cancer* 123:1864–1870.
- Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. 2010. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: Role of persistence. *J Natl Cancer Inst* 102:1478–1488.
- Maniatis T, Fritsch E, Sanbrook J. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker T, Wolinski SM. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 7:209–214.
- Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S, Meijer CJ, Arslan A, Munoz N. 2002. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* 87:324–333.
- Munoz N, Kato I, Bosch FX, Eluf-Neto J, De Sanjose S, Ascunce N, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, Tormo MJ, Moreo P, Gonzalez LC, Tafur L, Walboomers JM, Shah KV. 1996. Risk factors for HPV DNA detection in middle-aged women. *Sex Transm Dis* 23:504–510.
- Paesi S, Serafini EP, Barea F, Madi SR, Echeverrigaray S. 2009. High prevalence of human papillomavirus type 58 in patients with cervical pre-malignant lesions in southern Brazil. *J Med Virol* 81:1270–1275.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J. 2005. Pisani PGlobal cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74–108.
- Quint W, Jenkins D, Molijn A, Struijk L, van de Sandt M, Doorbar J, Mols J, Van Hoof C, Hardt K, Struyf F, Colau B. 2011. One virus one lesion—Individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol* 227:62–71.
- Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhaes AV. 2003. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:181–184.
- Rodríguez G, Barrios E, Vasallo J. 2005. Características epidemiológicas de una población que accedió al Programa de Prevención del Cáncer de Cuello Uterino en Uruguay. *Rev Med Uruguay* 21:200–206.
- Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Solomon D, Guillén D, Alfaro M, Morales J, Hutchinson M, Katki H, Cheung L, Wacholder S, Burk RD. 2010. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: Critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst* 102:315–324.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.
- Schmeink CE, Melchers WJ, Siebers AG, Quint WG, Massuger LF, Bekkers RL. 2011. Human papillomavirus persistence in young unscreened women, a prospective cohort study. *PLoS ONE* 6:e27937.
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. 2007. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer* 121:621–632.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Jr., Young N. 2002. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287:2114–2119.
- Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Nardari W, Mampaey M, Badano I, Di Lello F, Galuppo JA, Alonio LV, Teyssie AR. 2004. Human papillomavirus cervical infection in Guaraní Indians from the rainforest of Misiones, Argentina. *Int J Infect Dis* 8:13–19.
- Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV. 1998. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 70:115–120.
- Villa L, Franco E. 1998. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. *J Natl Cancer Inst* 81:332–340.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12–19.
- Zuna RE, Wang SS, Rosenthal DL, Jeronimo J, Schiffman M, Solomon D, Group, ALTS. 2005. Determinants of human papillomavirus-negative, low-grade squamous intraepithelial lesions in the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions triage study (ALTS). *Cancer* 25:253–62.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342–350.

GENOTIPOS CIRCULANTES EN POBLACIÓN VIVIENDO CON VIH

Introducción

A nivel de los países en vías de desarrollo también es problemática la cantidad de casos VIH/SIDA. En Latinoamérica y el Caribe se estima que hay 2.0 millones (1.7 a 2.3 millones) de personas infectadas con VIH a diciembre del 2015, con una incidencia de 100.000 (86.000 - 120.000) nuevos casos durante ese año [UNAIDS, 2016]. A julio 2016 se estima en 13.000 las personas diagnosticadas viviendo con VIH en Uruguay, aunque podría haber un 30% más de personas infectadas sin diagnosticar. En el 2015 se notificaron un total de 933 nuevos casos en adultos, mostrando una tasa de 27/100.000 habitantes. La relación hombre/mujer viviendo con VIH, fue de 2 a 1 (DEVISA, 2016).

Las mujeres infectadas con VIH se enfrentan a un aumento en la incidencia, persistencia y recurrencia de las infecciones por VPH que pueden desencadenar lesiones escamosas intraepiteliales (SIL) y culminar en carcinoma de cérvix (Fife et al., 2009). En población de mujeres infectadas con VIH, la detección de ADN de VPH mediante técnicas de biología molecular, es de dos a cinco veces más frecuente, que en muestras de mujeres VIH negativas (Jamieson et al., 2002; Palefsky et al., 1999; Sun et al., 1997).

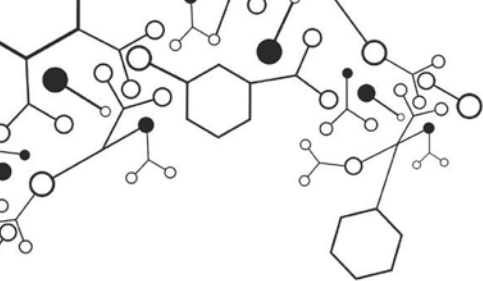
La introducción de los tratamientos antirretrovirales de gran actividad (TARGA) resultó en la mejora de la expectativa de vida de las personas viviendo con VIH, tal es así que las muertes relacionadas al VIH decrecieron en un 75% desde la introducción del mismo (Bower, Palmieri, and Dhillon, 2006; Engels et al., 2006; Gingues and Gill, 2006; Palefsky, 2006). También disminuyeron las complicaciones por infecciones oportunistas graves y algunas neoplasias como el sarcoma de Kaposi, sin embargo, las opiniones son controvertidas para otras neoplasias como las producidas por VPH. Existen estudios con resultados positivos para la reducción de las neoplasias producidas por VPH, donde la prevalencia de SIL disminuyó de 69 al 63% (Heard et al., 1998). Sin embargo, otro grupo publicó que con el tratamiento no se previene el desarrollo de SIL, ni su progresión, ni la remoción del virus (Del Mistro et al., 2004).

En nuestro país, no hay conocimiento hasta el momento de los porcentajes de pacientes con irritaciones a nivel del tracto genital producidas por VPH en pacientes VIH positivas, ni tampoco qué genotipos circulan en esta población.

Materiales Y Métodos

Muestras clínicas

Las pacientes incluidas en éste estudio se atienden en el Servicio de Enfermedades Infecto-contagiosas del Hospital Pasteur (SEIC-HP) en Montevideo. El criterio de inclusión fue: ser mayor de 18 años, tener diagnóstico reciente o crónico de infección por VIH, estar o no bajo TARGA, presentar o no lesiones intraepiteliales u anomalías a nivel del tracto genital, presentar disposición a la toma de muestra para PAP y detección de VPH cada 6 meses por un período de 18 meses y debían firmar un consentimiento informado, además de acceder a contestar una ficha clínica (el documento del consentimiento informado y de la ficha clínica se adjunta al final del capítulo). Durante el período entre marzo de 2012 a diciembre de 2013, 91 pacientes fueron seleccionados de acuerdo con los criterios de inclusión.



A todas las participantes se les realizó un cuestionario, se les leyó el consentimiento informado y se les realizaron dos cepillados cervicales. Con uno de los cepillados se realizó un frotis convencional y se fijó la muestra para su análisis por la técnica de PAP, y el otro cepillado de células se embebió en un tubo de 15 mL con 3 mL de suero fisiológico estéril pH 7.4.

Las tomas de muestra fueron realizadas por la licenciada Karina Nogueira del SEIC-HP.

Se incluyeron en éste estudio, 91 muestras de cepillados cervicales de pacientes que concurren a la primera toma, 43 muestras de cepillados cervicales de la segunda toma y solo 3 muestras de pacientes que concurren a la tercera toma. Todas las voluntarias dieron su consentimiento informado por escrito para la participación en esta investigación en el momento de la toma de muestra, el diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (Fecha de resolución, 7 de diciembre 2011, Exp. N° 071140-000982-11).

El diagnóstico citológico fue realizado por la Dra. Sylvia Bonilla de acuerdo con el sistema Bethesda, sin previo conocimiento de los resultados de la detección de genoma de VPH (Solomon et al., 2002).

Preparación de las muestras a analizar

Con una pipeta Pasteur estéril se arrastraron las células del cepillo al suero, el cepillo se descartó y el suero se centrifugó durante 5 minutos a 2000-3000 rpm, se descartó el sobrenadante. El pellet de células se lavó con tampón fosfato salino estéril (PBS, siglas en inglés), hasta la obtención de una solución límpida. Se agregaron entre 200 y 500 μ L de PBS estéril dependiendo del tamaño del pellet celular, se separó la muestra en un tubo cónico estéril, 200 μ L que se utilizaron para la extracción de ácidos nucleicos y el resto en un criotubo de respaldo.

Líneas celulares

Se desarrolló el cultivo de dos líneas celulares con genoma de VPH integrado, Hela y SiHa, para su uso como controles positivos para las técnicas moleculares. Hela, línea celular epitelial humana, procedente de un adenocarcinoma de cérvix, conteniendo VPH 18, ATCC (H1HeLa, ATCC®CRL-1958™). SiHa, línea celular epitelial humana, procedente de un carcinoma escamoso de cérvix, contiene VPH 16 integrado en una o dos copias por célula, obtenida por ATCC (SiHa, ATCC®HTB-35™). Las mismas fueron repicadas en MEM (GE Healthcare), al que se le agregó una mezcla de antibiótico-antimicótico (PAN Biotech) y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Biologos Inc.). El medio se cambió tres veces durante la semana de crecimiento celular, se realizó un pasaje a 3 botellas de 175 cm², una vez crecidas las células, cuando forman una monocapa confluyente, se tripsinizaron, centrifugaron y el pellet obtenido se congeló en criotubos con SFB y dimetilsulfóxido (DMSO), 0.9 mL SFB+0.1 mL de DMSO, se obtuvieron 9 criotubos totales, de cada línea.

Extracción de ADN

El ADN total presente en la muestra fue extraído utilizando un kit comercial según indicaciones del fabricante, kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). La única modificación fue realizada en el paso de elución, en lugar de hacerlo con 200 μ L de buffer de elución, AE, como lo indica el comerciante, se realiza con 120 μ L del mismo.

Detección del genoma de VPH y control de calidad de la toma de muestra, PCR screening

Todas las muestras fueron testeadas para la presencia de genoma de VPH utilizando una PCR con cebadores consenso degenerados, set My 09/11 diseñados por Manos y colaboradores en 1989, los mismos amplifican una región de aproximadamente 450 pares de bases del gen l1 (Manos, 1989). En la misma PCR se amplificó un fragmento de 268 pares de bases del gen de la β -globina humana, set de cebadores PC04/GH20, previamente descritos por Saiki y colaboradores (Saiki et al., 1985). Brevemente, la multiplex se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L, y las concentraciones finales de los reactivos fueron: Buffer 1X (20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,250 mM de dNTPs, 1 μ M de cada primer My 09/11, 0,1 μ M de cada primer PC04/GH20 y 0.04 U/ μ L de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Los tubos fueron cargados de la siguiente manera: 10 μ L de mix de PCR, 5 μ L de ADN extraído y 5 μ L de agua libre de DNasas y RNasas (calidad para biología molecular) en el caso de muestras y controles positivos, para el control negativo fueron cargados 10 μ L de mezcla de reacción de PCR y 10 μ L de agua libre de DNasas y RNasas (calidad para biología molecular). La amplificación se realizó mediante el siguiente ciclado: desnaturalización inicial a 94°C, 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión: 94°C, 1 minuto; 55°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Por cada ronda de PCR, se utilizó como control positivo ADN extraído de células SiHa o HeLa y un control negativo (agua libre de DNasas y RNasas pura para técnicas moleculares). Los productos de la técnica de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con un intercalante no tóxico GelRed (Oler up SSP), exponiéndolos a radiación UV.

Amplificación por PCR con My 09/11 volumen 100 μ L

Las muestras que fueron positivas para la detección de genoma de VPH, se volvieron a amplificar por PCR mediante los cebadores My09/11, para la obtención de un volumen necesario para la técnica de genotipificación. Se utilizaron las mismas concentraciones finales, mismo ciclado, en un volumen final de 100 μ L, Tabla 1.

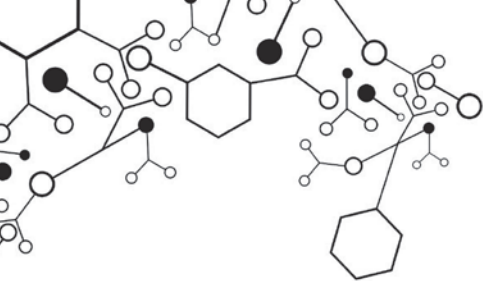


TABLA 1:

Cargado de tubos PCR volumen 100μL

Tubos	Muestras	Control Positivo	Control Negativo
Agua (calidad biología molecular), (μL)	30-35	40	50
ADN (μL)	15-20*	10	
Mezcla de reacción (μL)	50	50	50
Volumen Total (μL)	100	100	100

*La cantidad de ADN depende de la intensidad de la banda de la PCR screening.

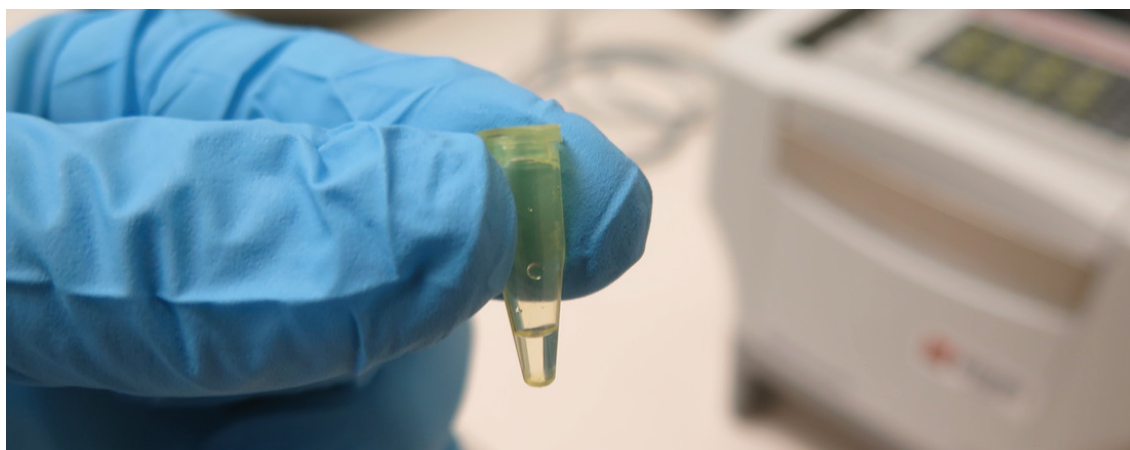
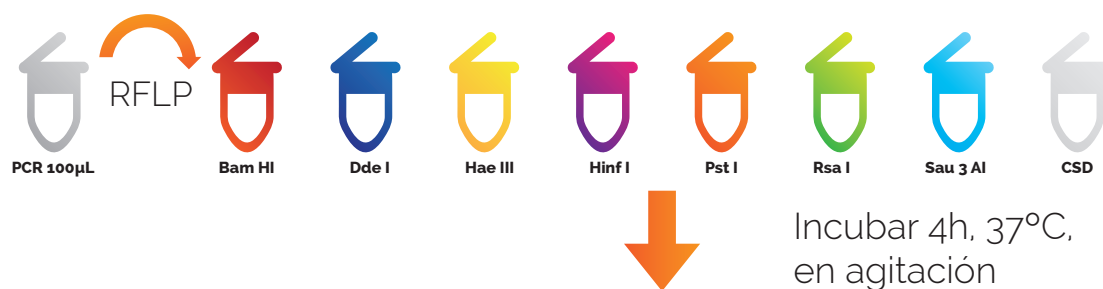
Los productos de la técnica de PCR son visualizados en geles de agarosa teñidos con un intercalante no tóxico GelRed (Oler up SSP), exponiéndolos a radiación UV.

Genotipificación por el polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP)

El producto de PCR fue distribuido en 8 tubos, aproximadamente 12,5 μL de ADN copia por tubo, se le adicionó a cada tubo en orden alfabético 2 μL de cada enzima de restricción, 20 unidades: Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, y Sau 3 AI (BioLabs) y 2 μL del buffer de cada enzima, el octavo tubo solo lleva los 12.5 μL del ADN copia y 4 μL de cualquiera de los buffers usados para completar el volumen, éste último oficia de control sin digerir. Se mezcló, centrifugó, e incubó durante 4 horas a 37°C. Finalmente los patrones de bandas obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa, y comparados con un mapa de restricción de referencia (Bernard et al., 1994). Figura 14.

FIGURA 14:

Esquema de la técnica de RFLP, C SD: control sin digerir, el conjunto de 8 tubos corresponde a una muestra.



Electroforesis en geles de agarosa

VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Se realizaron geles de agarosa (Thermo Scientific), 1.5% preparada en TBE 0.5X (TBE 10X: Tris-base 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 9.25 y H₂O c.s.p 1 L, pH 8), a la que se le agrega bromuro de etidio (Invitrogen) en concentración final 1 µg/mL o 0.030 mL de intercalante de ácidos nucleicos no tóxico, Gel Red (Olerup SSP) en 100 mL de agarosa líquida, según indicaciones del comerciante. Para el cargado de las muestras a visualizar en el gel, se utilizó un buffer de carga comercial 6X (Thermo Scientific) y marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Thermo Scientific). La técnica de electroforesis se realiza en buffer de corrida TBE 0.5X en una cuba Mupid-One (Advance) a voltaje constante 135 V, durante 45 minutos. Los geles fueron observados mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador conectado a un sistema de captura e impresión de imágenes (Image Master VDS).

VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE RFLP

Misma metodología que en la electroforesis para la visualización de productos de PCR, pero se utilizó agarosa al 3%, y la corrida se realizó a 100 V durante 1 hora.

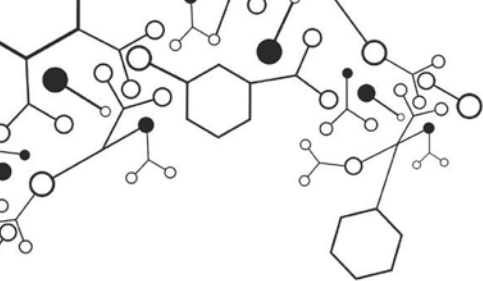
RESULTADOS

Diagnóstico Citológico

De acuerdo con el sistema de clasificación Bethesda (Solomon et al., 2002), 91 muestras procesadas en la primera toma fueron agrupadas: 90 resultaron negativas para lesión o malignidad (NILM), las pacientes con edades entre 22 y 71 años y 1 muestra fue diagnosticada como lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, (LSIL), paciente con 27 años de edad, en éste caso también fue realizada una biopsia guiada por colposcopia, en una policlínica de la IM, para el diagnóstico histológico, la cual concluyó en el mismo resultado. De las 43 muestras de segunda toma; 42 fueron diagnosticadas como NILM y el rango de edades fue de 26 a 67 años, y la paciente de 27 años, diagnosticada cito e histológicamente como LSIL. Las 3 terceras muestras fueron diagnosticadas como NILM y procedían de pacientes de 38, 39 y 30 años, respectivamente.

Detección y genotipificación del genoma de VPH

Resumiendo, 91 de 91 muestras (primera toma), 43 de 43 muestras en seguimiento (segunda toma) y 3 de 3 muestras en seguimiento (tercera toma) testeadas fueron positivas para el control interno (amplifican el gen de la beta globina). Tres muestras de la primera toma fueron negativas para la amplificación del fragmento de la beta globina usada como control interno, las pacientes fueron contactadas telefónicamente y se les realizó una retoma, cuyo resultado para el control interno fue positivo, Figura 15. Por tanto, todas las muestras resultaron apropiadas para su uso en la técnica de PCR. Un total de 48 muestras, 29 muestras colectadas en una primera toma y 19 en la segunda toma, resultaron positivas en la detección de genoma viral de VPH, 46 de ellas fueron genotipificadas por PCR seguida de RFLP, Figura 16. Solo 2 muestras quedaron sin determinar el genotipo presente por la metodología empleada, (4.2%), básicamente debido a la ausencia de cantidad suficiente de ADN de partida. Tabla 2.



La historia clínica de cada paciente fue examinada para la obtención de datos de carga viral de VIH y conteo de células CD4, tipo de antirretrovirales en las pacientes bajo TARGA y fecha de inicio del mismo, para cada toma o fecha aproximada a la misma. Se le adjuntan a la historia clínica los resultados del análisis molecular de detección de VPH y la citología para cada toma, en el caso de la paciente diagnosticada con LSIL se le adjunta también el resultado de la histopatología. El uso de la información de las historias clínicas de las pacientes estuvo bajo supervisión de la Dra. Mariela Mansilla. Tabla 3.

FIGURA 15:

Fotografía del gel de una reacción de PCR multiplex con los cebadores degenerados My09/11 y los de Beta-globina, 450 y 296 pares de bases, respectivamente [Saiki et al., 1985; Manos et al., 1998]. PM: peso molecular de 100pb, CP: control positivo, CN: control negativo.

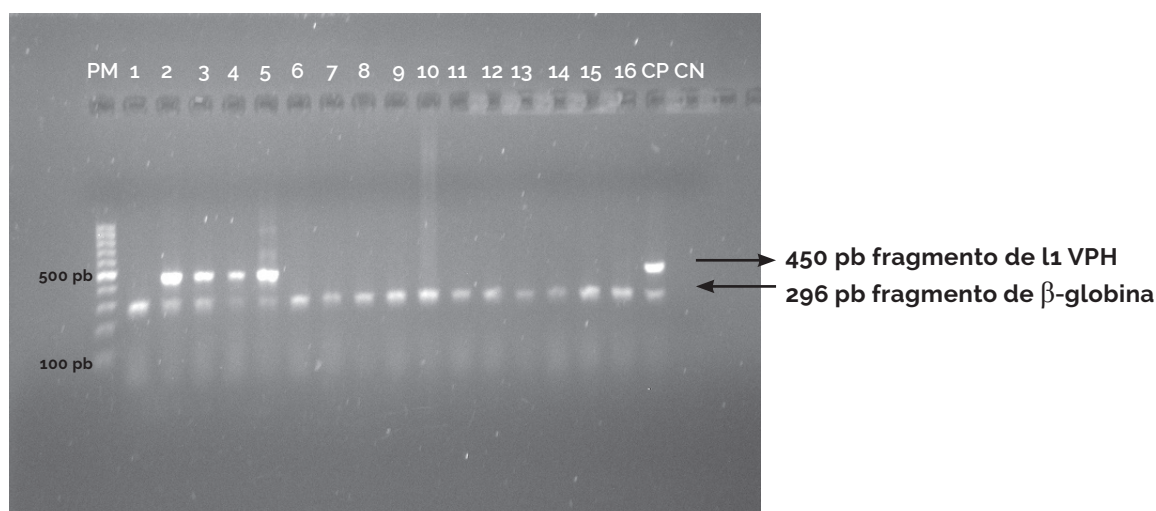


FIGURA 16:

Fotografía del gel de una RFLP, se pueden observar varios patrones de restricción que implican distintos genotipos, cada muestra está separada por un marcador de peso molecular de 100pb, PM. 1- Restricción con BamHI, 2-Restricción con DdeI, 3-Restricción con HaeIII, 4-Restricción con HinfI, 5-Restricción con PstI, 6-Restricción con RsaI, 7-Restricción con Sau3AI, 8-Control sin digerir.

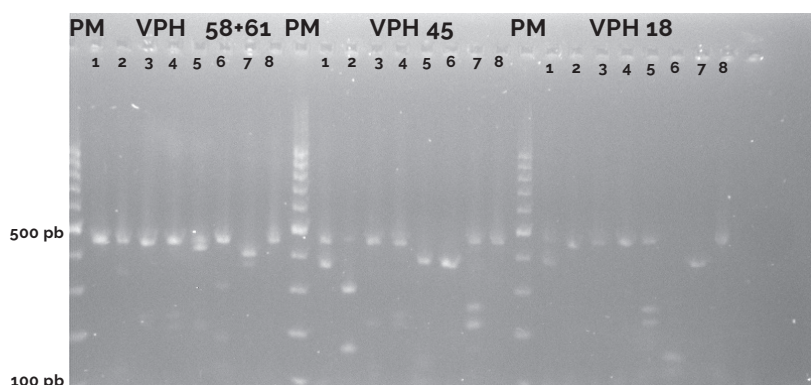


TABLA 2:

Tabla 2: Distribución de genotipos de acuerdo con los resultados citológicos, para la primera y la segunda toma.

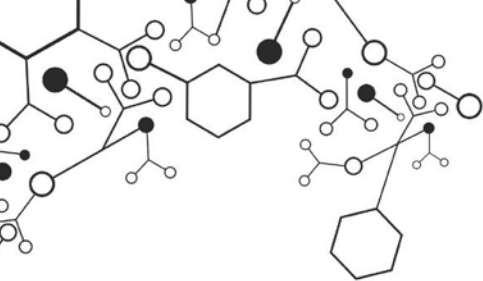
PRIMERA TOMA					SEGUNDA TOMA			
Genotipos	NILM		LSIL		NILM		LSIL	
VPH-BR	Simple	Múltiple	Múltiple	Total	Simple	Múltiple	Simple	Total
6	1 (3,57%)	1 (3,57%)		2 (6,89%)				
11		1 (3,57%)		1 (3,45%)				
61	1 (3,57%)	3 (10,71%)		4 (13,79%)	3 (17,65%)	2 (4,76%)		5 (26,32%)
81		1 (3,57%)		1 (3,45%)		1 (5,88%)		1 (5,26%)
VPH-AR								
16	5 (17,86%)	5 (17,86%)		10 (34,48%)	4 (23,53%)	4 (23,53%)		8 (42,11%)
18	1 (3,57%)	2 (7,14%)		3 (10,34%)		3 (17,65%)		3 (15,79%)
26					1 (5,88%)			1 (5,26%)
31	1 (3,57%)	5 (17,86%)		6 (20,69%)		3 (17,65%)		3 (15,79%)
40		1 (3,57%)		1 (3,45%)				
45	1 (3,57%)	1 (3,57%)	1 (100%)	3 (10,34%)			1 (100%)	1 (5,26%)
58		2 (7,14%)		2 (6,89%)	1 (5,88%)			1 (5,26%)
62	1 (3,57%)	4 (14,29%)	1 (100%)	6 (20,69%)		3 (17,65%)		3 (15,79%)
66*		1 (3,57%)		1 (3,45%)				
67	1 (3,57%)			1 (3,45%)				
68		1 (3,57%)		1 (3,45%)				
69		1 (3,57%)		1 (3,45%)				
71	1 (3,57%)	1 (3,57%)		2 (6,89%)				
83		2 (7,14%)		2 (6,89%)		1 (5,88%)		1 (5,26%)
ST	1 (3,57%)			1 (3,45%)	1 (5,88%)			1 (5,26%)
Positivos	13 (46,43%)	14 (50%)	1 (100%)	29 (31,87%)	9 (52,94%)	8 (47,06%)	1 (100%)	19 (44,18%)
Negativos	62 (68,13%)			62 (68,13%)	24 (57,14%)			24 (55,81%)
Totales	90		1	91	42		1	43

NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad, LSIL: lesión intraepitelial de bajo grado, VPH-BR: virus papiloma humano de bajo riesgo, VPH-AR: virus papiloma humano de alto riesgo, ST: muestras sin genotipificar. * Muestra con limitada evidencia en progresión a carcinogénesis (Bouvard et al., 2009).

TABLA 3:

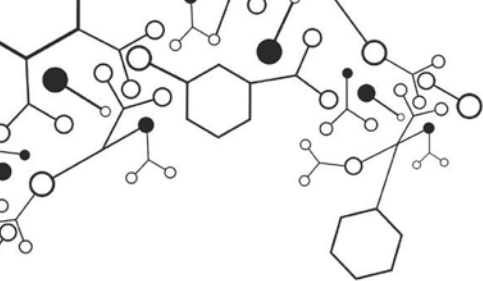
Seguimiento del paciente con coinfección VIH-VPH, datos sobre carga viral de VIH, conteo de CD4, genotipo de VPH y tipo de lesión, si está o no bajo TARGA, el inicio del mismo, el tipo de TARGA administrado y la fecha de las tomas de muestra.

1ª Toma	TARGA	TIPO	CD4 (C/mm ³)	CV (cp/mL (log10))	Result. PAP	Result. VPH	2ª Toma	CD4 (C/mm ³)	CV (cp/mL (log10))	Result. PAP	Result. VPH	3ª Toma	CD4 (C/ mm ³)	CV (cp/mL (log10))	Result. PAP	Result. VPH
29052012	2005	AZT/3TC/NVP	719	<50	NILM	Negativo	29012013	849	<50	NILM	VPH 16	9072013	868	<50	NILM	Negativo
20062012	2012*	AZT/3TC/SQV/r	214	184049 (log 5,26)	NILM	VPH 62	3012013	391	<50	NILM	VPH S/T	2072013	356	<50	NILM	Negativo
8062012	2010	AZT/3TC/EFV	344	100 (log 2)	NILM	Negativo	27112012	363	62 (log 1,79)	NILM	Negativo	3092013	364	<50	NILM	Negativo
10072012	2012*	ABV/3TC/LPV/r	556	52	NILM	Negativo	9072013	481	<50	NILM	Negativo					
4092012	2006	AZT/3TC/NVP	636	135 (log 2,13)	NILM	VPH 71	9042013	676	<50	NILM	Negativo					
11092012	2010	ABV/3TC/EFV	746	<50	NILM	Negativo	4042013	719	<50	NILM	Negativo					
18092012			418	3936 (log 3,59)	NILM	VPH 6	30042013	412	464 (log 2,66)	NILM	Negativo					
4102012			294	11305 (log 4,05)	NILM	VPH 18/16	9042013	342	13028 (log 4,11)	NILM	VPH 16/18					
4102012	2011	AZT/3TC/LPV/r	353	2268 (log 3,35)	NILM	Negativo	9042013	372	1682 (log 3,22)	NILM	Negativo					
4102012	2000	ABV/d4T/SQV	972	<50	NILM	Negativo	17042013	850	139 (log 2,14)	NILM	Negativo					
4102012	2000	AZT/3TC/SQV	877	<50	NILM	Negativo	9042013	952	<50	NILM	Negativo					
9102012	2003	ABV/3TC/LPV/r	33	123678 (log 5,04)	NILM	Negativo	6082013	41	111790 (log 5,04)	NILM	VPH 18					
9102012	2009	AZT/3TC/LPV/r	473	<50	NILM	VPH 26	17042013	396	<50	NILM	Negativo					
30102012			623	268 (log 2,42)	NILM	Negativo	23042013	438	152 (log 2,18)	NILM	Negativo					
30102012	2012*	ABV/3TC/NVP	184	1243 (log 3,09)	NILM	Negativo	7052013	346	<50	NILM	Negativo					
30102012	2011	AZT/3TC/EFV	198	<50	NILM	Negativo	7052013	293	1243 (log 3)	NILM	VPH 61					
6112012	2012*	AZT/3TC/EFV	1021	<50	NILM	Negativo	24042013	1072	162 (log 2,20)	NILM	VPH 26					
6112012	2011	3TC/EFV/LPV/r	20	152000 (log 5,2)	NILM	VPH 18	3092013	23	4281 (log 3,6)	NILM	VPH 18/61					
13112012	2012*	AZT/3TC/EFV	250	<50	NILM	Negativo	30042013	241	<50	NILM	Negativo					
13112012	2012*	AZT/3TC/NVP	569	130 (log 2,11)	NILM	Negativo	7052013	456	81200 (log 4,9)	NILM	Negativo					
13112012	2012*	AZT/3TC/LPV/r	98	172 (log 2,23)	NILM	VPH 16	23042013	112	<50	NILM	VPH 16					
20112012	2010	AZT/3TC/LPV/r	830	<50	NILM	Negativo	24032013	846	<50	NILM	Negativo					
20112012	2000	AZT/3TC/EFV	1248	56 (log 4,4)	NILM	Negativo	30042013	1254	<50	NILM	Negativo					



1ª Toma	TARGA	TIPO	CD4 (C/mm ³)	CV (cp/mL (log10))	Result. PAP	Result. VPH	2ª Toma	CD4 (C/mm ³)	CV (cp/mL (log10))	Result. PAP	Result. VPH	3ª Toma	CD4 (C/ mm ³)	CV (cp/mL (log10))	Result. PAP	Result. VPH
27/11/2012	2012*	AZT/3TC/LPV/r	123	242390 (log 5,39)	NILM	VPH 18	14052013	210	<50	NILM	Negativo					
27/11/2012	2012*	TFV/3TC/LPV/r	104	209 (log 2,3)	NILM	VPH 58/61	18062013	226	129 (log 2,11)	NILM	VPH 61					
4/12/2012			721	1127 (log 3,05)	LSIL	VPH 45/62	18062013	414	1634 (log 3,21)	LSIL	VPH 45					
11/12/2012	1999	AZT/3TC/EFV	348	<50	NILM	Negativo	30072013	430	<50	NILM	Negativo					
11/12/2012	2012*	ABC/3TC/EFV	333	437 (log 2,1)	NILM	Negativo	18062013	352	<50	NILM	VPH 61					
11/12/2012	2007	AZT/3TC/EFV	431	60 (log 1,67)	NILM	Negativo	9072013	530	<50	NILM	Negativo					
8/01/2013	2006	AZT/3TC/NVP	495	<50	NILM	Negativo	4062013	557	<50	NILM	Negativo					
8/01/2013	2013*	AZT/3TC/LPV/r	291	615 (log 2,78)	NILM	VPH 67	2072013	553	<50	NILM	Negativo					
8/01/2013	2011	AZT/3TC/LPV	490	<50	NILM	VPH 31	16072013	511	<50	NILM	Negativo					
15/01/2013	2000	AZT/3TC/EFV	963	<50	NILM	Negativo	18062013	996	<50	NILM	Negativo					
15/01/2013	2008	AZT/3TC/ABC	706	<50	NILM	Negativo	13082013	781	<50	NILM	Negativo					
15/01/2013	2006	ABV/3TC/LPV/r	812	<50	NILM	Negativo	18062013	847	<50	NILM	Negativo					
29/01/2013			578	2380 (log 3,4)	NILM	VPH 45/58	30072013	395	2588 (log 3,41)	NILM	Negativo					
13/02/2013	2013*	AZT/3TC/SQV/r	233	10814 (log 4,03)	NILM	VPH 62/83	6082013	219	16254 (log 4,21)	NILM	VPH 62/83					
19/02/2013	1999	AZT/3TC/LPV/r	369	<50	NILM	VPH 62/69	27082013	486	<50	NILM	Negativo					
26/02/2013	2013*	AZT/3TC/NVP	194	459025 (log 5,66)	NILM	VPH 11/31/62/81	6082013	382	61 (log 1,78)	NILM	VPH 31/62/81					
12/03/2013	1998	ABV/AZT/EFV	1690	54 (log 1,73)	NILM	VPH 31/40	20082013	1252	<50	NILM	Negativo					
19/03/2013	2012*	TNF/3TC/EFV	358	92 (log 1,96)	NILM	VPH 31/61/68	27082013	257	1149 (log 3,06)	NILM	VPH 31/61					
19/03/2013	2004	AZT/3TC/EFV	84	276183 (log 5,74)	NILM	VPH 31/58	6092013	286	621 (log 2,79)	NILM	VPH 31/58					
19/03/2013	2011	ABV/3TC/EFV	540	140 (log 2,14)	NILM	Negativo	20082013	614	<50	NILM	Negativo					

TARGA: tratamiento antirretroviral de gran actividad. CD4: conteo de células CD4, CV: carga viral de VIH, PAP: Resultado de la técnica de Papanicolaou, VPH: virus papiloma humano, NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad, LSIL: lesión intraepitelial de bajo grado, AZT: Zidovudina o Azidotimidina, 3TC: Lamivudina, NVP: Nevirapina, SQV: Saquinavir, LPV/r: Lopinavir/ritonavir, ABV: Abacavir, EFV: Efavirenz, ETR: Etravirina y TNF: Tenofovir. Las muestras indicadas con * son aquellas que comenzaron o retomaron el TARGA cuando comenzaron con el estudio de VPH.



Discusión

La frecuencia de la infección por VPH en la población en estudio fue de un 31% en pacientes sin lesión y un 32% contando todas las muestras (incluyendo el único diagnóstico de LSIL). Es importante notar que tanto la frecuencia como el tipo de genotipo pueden variar según el grupo de edad, el área geográfica y el tipo de lesión diagnosticada, a mayor severidad de lesión más prevalencia en la detección, por tanto podríamos decir que éstos valores de frecuencia se verían incrementados en lesiones más graves, mostrando una prevalencia general mayor (Clifford et al., 2005).

La mayor parte de los genotipos detectados en éste trabajo son VPH-AR, y son los más comúnmente asociados a carcinomas cervicales; VPH 16, 18, 31, 45 y 58, entre otros probablemente asociados a carcinomas 26, 67, 71 y 72 (Bouvard et al., 2009; Munoz et al., 2003) pero el espectro de genotipos detectados es más amplio comparado con los hallados en población no infectada con VIH y se encuentran en concordancia con las frecuencias descritas en estudios similares en Brasil (Goncalves et al., 1999). En cuanto a los VPH-BR, los más frecuentes detectados fueron el 6 y el 61, tanto en infecciones simples como múltiples, a diferencia de los más prevalentes a nivel mundial en población general que son VPH genotipos 6 y 11 (Broker et al., 2001).

De acuerdo con hallazgos a nivel mundial, en pacientes viviendo con VIH hay un aumento en la prevalencia de infecciones múltiples, comparados con población general. Es de notar, aunque está en debate, si las infecciones múltiples podrían ser un factor de riesgo para la progresión de las lesiones a la malignidad, más que las infecciones simples, particularmente en lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) (Clifford et al., 2005). En nuestro estudio y en concordancia con resultados de Brasil, la población analizada mostró un porcentaje de infecciones múltiples cercano al 50% (Goncalves et al., 2008).

Con respecto al conteo de CD4, carga viral de VIH y el estado general del paciente, de acuerdo con el estudio de Palefsky en 1999, donde se presenta una alta prevalencia de cualquier genotipo de VPH, e infecciones múltiples en pacientes con conteo de CD4 menor a 200 células por mm^3 , en la población en estudio, se observa que la mayoría de las pacientes con conteos de CD4 menores a 200 células por mm^3 , presentan infección por VPH (Palefsky et al., 1999).

Las tasas de mortalidad y la esperanza de vida de los pacientes viviendo con VIH, cambiaron significativamente desde la introducción de los TARGA, logrando convertirla en una enfermedad crónica, con una mejor calidad de vida que evita la ocurrencia de enfermedades oportunistas y otras morbilidades, a su vez permiten restaurar y preservar la función inmune (Palefsky, 2006). Algunas investigaciones sobre los efectos de los TARGA en lesiones intraepiteliales y carcinomas de cérvix son controversiales, unos estudios presentan una regresión de las lesiones una vez aplicado el TARGA, otros sin embargo, plantean que no existen diferencias en las lesiones una vez aplicado el TARGA (Del Mistro et al., 2004; Heard et al., 1998). En los resultados obtenidos, no podemos concluir sobre la regresión de las lesiones, porque la población estudiada con TARGA no presentaba lesiones. Sin embargo, en siete pacientes que iniciaron el tratamiento cuando iniciaron el estudio de VPH, se observa una negativización de la

detección del genoma de VPH por la técnica empleada. Es decir en la primera toma de la muestra se detectó genoma de VPH, y a los seis meses luego de aplicado el TARGA, la detección de genoma de VPH en la segunda toma, fue negativa. Por otra parte, ésta negativización podría deberse a otros factores como la toma de muestra, la sensibilidad de la técnica empleada, por lo que debería de continuarse el estudio y tener en cuenta éstos parámetros para poder corroborar los datos obtenidos.

Una de las limitaciones de éste estudio es el pequeño número de pacientes incluidos, además de que todas las pacientes estudiadas, excepto una, no presentaban lesiones intraepiteliales, por tanto no se pueden sacar conclusiones al respecto de la coinfección y asociación con las distintas clases citológicas. Sin embargo, siendo el primer acercamiento del estudio de la coinfección VIH-VPH pudimos obtener información sobre genotipos circulantes, frecuencias de los mismos, porcentaje de infecciones múltiples y correlación del estado viral e inmunológico de los individuos involucrados en el estudio coinfectados VIH-VPH. Es de notar que este estudio deberá de expandirse aumentando el número inicial de muestras, incluyendo distintos grados de lesiones, además de realizar el seguimiento por un período mayor de tiempo.

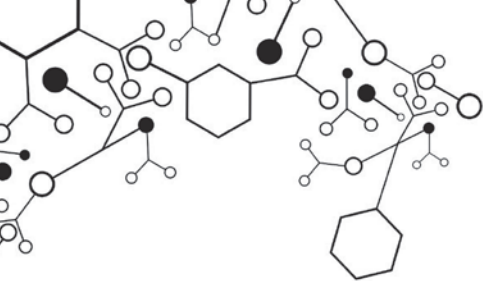
Este trabajo describe por primera vez en nuestro país, la distribución de los genotipos de VPH en células cervicales colectadas de mujeres uruguayas viviendo con VIH y su asociación con el resultado de la citología y el estado general del paciente, en un período de seguimiento de 18 meses. Estos hallazgos son hoy en día, el primer acercamiento a la epidemiología de la coinfección VIH/VPH en nuestro país.

VARIABILIDAD GENOTIPO 16

Los virus papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) son la causa necesaria, aunque no suficiente de la progresión de las lesiones intraepiteliales a la malignidad, lo que no sucede con los VPH de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR). De hecho un estudio realizado en la oncoproteína E7 de VPH 16 (VPH-AR) y de E7 de VPH 6 (VPH-BR), reveló una menor actividad por parte de ésta última de unirse a la proteína del retinoblastoma, pRB, comparada con E7 de VPH 16. Esta diferencia de afinidades es debido a la composición aminoacídica que cambia una aspartato en la E7 del VPH 16 por una glicina en la E7 del VPH 6, lo que lleva a la escasa probabilidad de progresión a carcinomas por parte de VPH 6 (Heck et al., 1992).

El VPH-AR más prevalente a nivel mundial es el genotipo VPH 16. Existen una gran cantidad de estudios que demuestran que el riesgo de padecer lesiones pre-cancerosas y cáncer es más probable en determinadas variantes de VPH 16, más que en otras variantes de éste genotipo (Berumen et al., 2001; Xi et al., 1997). De éstos antecedentes inició el interés de estudiar las variantes del genotipo 16 circulantes en nuestro país.

El análisis de secuencias nucleotídicas de la región LCR, de distintos aislamientos que provenían de muestras de pacientes de distintos continentes, comparadas con un virus clon referencial o prototipo, que fue el primer VPH 16 descrito (Seedorf et al., 1985), resultó en la definición del primer agrupamiento filogenético con cinco ramas denominadas según la región de donde provenían las secuencias; Africanas tipo 1 y 2 (Af-1 y Af-2), Asiático-Americanas (AA), Europeas (E) y Asiáticas (As), quedando el clon prototipo dentro de la rama de las variantes E. Los estudios se llevaron a cabo en LCR debido a



que comúnmente, se generan mutaciones puntuales, lo que le brinda a la misma un mayor grado de diversidad (Ho et al., 1993). Se estudiaron también los oncogenes e6 y e7, con el objetivo de determinar si las variaciones en la secuencia nucleotídica en estos genes tenía alguna asociación con la oncogenicidad, cambios en la respuesta inmune o regulación del ciclo celular, así como determinar filogenéticamente si se agrupaban en ramas definidas por región (Wheeler et al., 1997; Xi et al., 1997; Yamada et al., 1997). Más tarde, Berumen y colaboradores establecieron que las variantes AA son mucho más oncogénicas que las E. La alta oncogenicidad de AA puede deberse a una actividad neoplásica aumentada de los oncogenes e6 y e7, una replicación viral más eficiente o una mejor estimulación de la expresión de los oncogenes (Berumen et al., 2001). También se determinó que las variantes AA, estimulan la degradación de la proteína supresora de tumor, P53, mejor que las variantes E y que la actividad del promotor p97 es de 1.7 a 3.3 veces mayor en variantes AA que en la variante E de referencia, lo que sugiere una mayor expresión de los oncogenes. La carga viral de las variantes AA es mucho mayor a las de las variantes E en carcinomas cervicales, lo que sugiere que las variantes AA replican mejor (Kammer et al., 2000; Stoppler et al., 1996). Además, como ya vimos, E2 regula la transcripción de los oncogenes e6 y e7, en las variantes E, E2 reprime la transcripción de e6 y e7, la sobre expresión se comienza a generar cuando VPH se inserta en el genoma celular y lo hace partiendo el gen regulador e2. Sin embargo, el e2 de las variantes AA se retiene completo en la mayoría de los carcinomas por ende existen distintos mecanismos de regulación por parte de e2, lo que sugiere que los oncogenes e6 y e7 permanecerían activos desde el inicio de la infección con éstas variantes, y esto podría asociarse con el hecho de que las pacientes con estas variantes desarrollan carcinomas más tempranamente que aquellas infectadas con variantes E (Casas et al., 1999).

En Uruguay, en más del 60% de los carcinomas de cuello uterino, se detectó un VPH genotipo 16 (Berois et al., 2013). Un objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de las variantes de VPH 16 en nuestro país, buscar cambios de nucleótidos específicos presentes dentro de los oncogenes, comparar la diversidad entre los fragmentos estudiados, partiendo de la premisa que el gen e6 tiene una variabilidad moderada, que e7 es el gen más conservado y que LCR es la región más variable.

POBLACIÓN GENERAL

Este trabajo se concretó en un manuscrito sometido a publicación, titulado "Human papillomavirus Type 16 variant analysis of E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women".

Running head: Human papillomavirus type 16 variant analysis
Title: Human papillomavirus Type 16 variant analysis of E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women.

AUTHORS AND AFFILIATIONS:

Viviana Ramas, Biochemist. Sección Virología, Facultad de Ciencias and Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Santiago Mirazo, PhD. Sección Virología, Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Sylvia Bonilla, MD. Laboratorio de Citología. SAS. Intendencia Municipal de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

Dora Ruchansky, PhD. Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Juan Arbiza, PhD. Sección Virología, Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

This work was performed in: Sección Virología, Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay and Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Correspondence to: Dr. Juan Arbiza. Sección Virología, Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Iguá 4225. Zip Code 11400. Tel: (05982)5258618. Fax: (05982)5258617

E-mail address: jarbiza@fcien.edu.uy

ABSTRACT

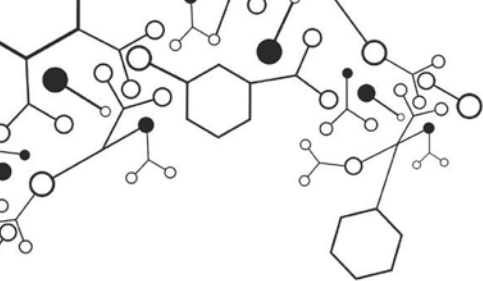
Human papillomavirus type 16 (HPV16) plays an important role in the etiology of cervical cancer, a major health problem among women worldwide. The disease presents high incidence and mortality rates in developing countries, and it accounts for most of the reported cases annually. It has been previously showed that HPV16 is the more frequently found genotype in Uruguay and the South American region. This study investigates the

HPV16 variant distribution, by sequence analyses of E6 and E7 genes and the long control region (LCR), from cervical exfoliated cells collected from Uruguayan women. Research focused on the description of the HPV16 genetic variability and on the reconstruction of phylogenetic relationships among variants. Forty-seven HPV16 variants were included in the analyses, identified in HSIL, LSIL, ASCUS and NILM cytological classes. An extremely high variability was observed among LCR sequences, which were distributed in 18 different variants. In turn, E6 and E7 sequences exhibited novel non-synonymous substitution of unknown biological implications. Uruguayan sequences mainly belonged to the European lineage (89.6%), and only 5 sequences clustered in non-European branches: 3 of them in the same clade of Asian-American sequences and 2 in an African branch. Additionally, 6 new variants from European and African clusters were identified. Herein, is reported for the first time the distribution and molecular characterization of HPV16 variants from Uruguayan women, and novel insights area provided on the molecular epidemiology of this infectious disease in the South American region.

Key Words: HPV16 variants distribution; single point mutation; phylogenetic analysis.

1.INTRODUCTION

Genital human Papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted disease among women. It is estimated that 300 millions of women are infected worldwide and more than 490.000 will develop cervical cancer [Parkin and Bray, 2006]. Cervical cancer is the fourth most common cancer in women, with 528,000 new cases and 266,000 deaths in 2012 [Ferlay et al., 2015]. Latin American countries together with other developing areas from Africa and Asia are the regions with the highest incidence and mortality rates of cervical cancer, carrying the 85% of the burden of disease. In these areas, it account for 12% of female cancers, in contrast to the 3.5% observed in developed countries [Ferlay et al., 2015].



Among HPV genotypes, those belonging to the high-risk (HR) are capable of generating pre-neoplastic lesion and cervical cancer. Persistent infection with a HR genotype is essential for the progression of cervical lesions and the development of cancer [Munoz et al., 2003; de Villiers et al., 2004]. HR HPV16 is, by far, the most prevalent genotype found in cervical cancer and lesions worldwide.

Several studies have compared the nucleotide sequences of multiple isolates of HPV16 from patients coming from different continents and epidemiological settings with the reference virus clone or prototype [Seedorf et al., 1985; Chan et al., 1992; Ho et al., 1993]. In these studies, the highly variable long control region (LCR) was chosen for the analyses because it generates a greater degree of diversity. Findings have described the existence of five phylogenetic branches; African type 1 and 2 (Af-1 and Af-2), Asian American (AA), European (E) and Asian (As), being the prototype clone (KO1827) within the E cluster. Concerning E6 gene variability, some studies were performed with the aim to determine a potential association between variations in the nucleotide sequence of these genes and cancer development, changes in the immune response or cell cycle regulation [Wheeler et al., 1997; Yamada et al., 1997; Zehbe et al., 1998b]. It is now clear that AA variants seem to be more tumorigenic than E variants. This difference may be partially due to an enhanced neoplastic activity of the oncogenes, a more efficient viral replication or better stimulation of the oncogenes expression [Berumen et al., 2001]. In this sense, it has been proposed that any mutations in these oncogenes and the LCR may induce changes in the biological functions of the oncoproteins or a deregulation of their expression, thus increasing the risk to progression [Wheeler et al., 1997; Yamada et al., 1997; Casas et al., 1999].

Uruguay, where cervical cancer occupies the fourth position in frequency, has a standardized incidence rate by age of 19 per 100,000 women, involving 402 cases per year and a mortality rate of 4.7 per 100,000, with 175 deaths annually [GLOBOCAN, 2012]. Interestingly, this epidemiological picture suggests that Uruguay has incidence rates comparable with that observed in developing countries, but exhibits mortality rates similar to that found in most of the developed countries [Ferlay et al., 2015]. Previous studies on the genotype prevalence and distribution have shown that HPV16 genotype is the most frequently found in pre-cancerous lesions and carcinomas (28.6% and 65.9%, respectively) [Berois et al., 2013; Ramas et al., 2013]. This study aimed two targets: first, to determine the distribution and frequency of HPV16 variants among Uruguayan women with different cytological and histological lesion degree, by sequence analyses of the LCR and E6 and E7

oncogenes. And second, to reconstruct the phylogenetic relationships among HPV16 variants, in order to identify the currently circulating lineages.

2. MATERIALS AND METHODS.

2.1. Study Population

Forty-seven HPV16 positive samples were selected from 568 cervical samples screened by standard procedures as previously reported [Ramas et al., 2013]. Patients (mean age 33 years, 18-53) were enrolled from the cervical screening medical centers which are part of the National Cervical Cancer Prevention Sub-Program, Ministerio de Salud Pública, Uruguay. The study design had been approved by Faculty of Medicine's Ethics Committee (Res. 071140-000927-07) and all participants gave their written consent.

Smears were cytologically diagnosed and then confirmed by histology according to the Bethesda classification system [Solomon et al., 2002]. Samples included 7 high grade intraepithelial lesion (HSIL), 16 low grade intraepithelial lesion (LSIL), 6 atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), 7 with no lesion or malignancy (NILM) and 11 without cytological data.

2.2. HPV DNA Detection

A 364 pb region within LCR was amplified as previously described [Chan et al., 1992]. HPV16 E6 and E7 PCR assays were performed with the specific primers reported by Pande et al. [2008] with modifications: for HPV16-E6 nucleotide positions 83-559 with an amplicon size of 476 pb, 5'-GAAACCGGTTAGTATAAAAGC AGAC-3' and 5'-AGCTGG GTTCTCTACGTGTTCT-3', and for E7 nucleotide positions 562-858 with an amplicon size of 296 pb 5'-CCATAATATAAGGGGTCGGTGGA-3' and 5'-TTTTTCCACTAACAGCCTCTACAT-3'.

Specific PCR products were purified from gel by NucleoSpin Gel and PCR kit (Macherey-Nagel) according to manufacturer's protocol, and sequenced twice in both directions on an automated DNA sequencer (3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems) in Sequencing Service from Institut Pasteur de Montevideo.

2.3. HPV16 genetic variability

Viral variants were identified by comparative sequence analysis with the prototype sequence of HPV16 (GenBank accession number K02718), which belongs to the European lineage [Seedorf et al., 1985]. Sequence analyses and alignment of LCR, E6 and E7 of HPV16 isolates were performed with MUSCLE, included in MEGA v6.0 software.

The E6, E7 and LCR sequences of the viral strains detected in this work were submitted to the GenBank

database (Supplementary Table).

2.4. Phylogenetic analysis

Sequence alignment was made by MUSCLE software and phylogenetic analyses were carried out by the Neighbour-Joining method (MEGA v6.0). JModel Test was used to estimate the optimal evolutionary model that best fitted to the dataset. Trees reliability was assessed by bootstrapping of the Neighbour-Joining tree and consensus trees were generated. Bootstrap values greater than 50% provided significant evidence for phylogenetic grouping.

For comparison, LCR, E6 and E7 sequences from the five phylogenetic branches as proposed by Ho et al. (1993) were retrieved from GenBank. In addition, regional HPV16 variants sequences from Argentina, Brazil and Paraguay were specifically selected and included [Ho et al., 1993; Picconi et al., 2003; Cornet et al., 2012; Mendoza et al., 2013; Gurgel et al., 2015; Vidal et al., 2016].

3. RESULTS

3.1. LCR nucleotide sequences analysis

Forty-seven HPV16 samples were compared with the prototype clone, by analysis of the region comprising nucleotides 7480 to 7784. Study of HPV16 LCR showed 30 single nucleotide polymorphisms (SNP) within this region; 15 transitions and 15 transversions. Eighteen variants were detected among the study population and 37 sequences differ from the prototype clone in at least one position (Table 1). Of these 18 isolates, 6 sequences (URU4, 18, 19, 39, 55 and 62) that had not been ever reported, were newly identified in this work.

3.2. E6 and E7 nucleotide sequences analysis

Twelve HPV16 E6 and E7 gene sequences were amplified and compared with the prototype clone from nucleotides 83 to 559 and 562 to 858, respectively. Analysis of E6 region evidenced 7 variable sites; 3 transitions (A131G, A289G and C335T) and 4 transversions (G145T, T286A, T350G and T387A). Eight sequences, grouped in 4 variants, displayed at least one single nucleotide change compared to the K02718 reference strain. Five of the seven SNPs were missense mutations, R10G (A131G), Q14H (G145T), H78Y (C335T), L83V (T350G) and D98E (T387A).

In turn, four of the five SNPs detected in E7 (transitions T732C, C785T and T789C and transversion T795G) were synonymous mutations. In addition, a non-synonymous change, histidine for asparagine, was identified in the position 51 (C712A). Alignment of E6 and E7 sequences is shown in Table 1.

3.3. Phylogenetic reconstruction

Phylogenetic analysis performed by aligning the LCR 364 pb region from the 47 Uruguayan strains and reference sequences, showed that most of the HPV16 strains belonged to the European branch (89,4%) and clustered with the prototype clone K02718. Non-European variants accounted for 5 (10.6%) infections; 3 were AA and 2 clustered with Af2 strains. Novel Uruguayan variants (URU4, 18, 19, 39 and 62) belonged to E lineage with the exception of URU55, which grouped within Af2 cluster.

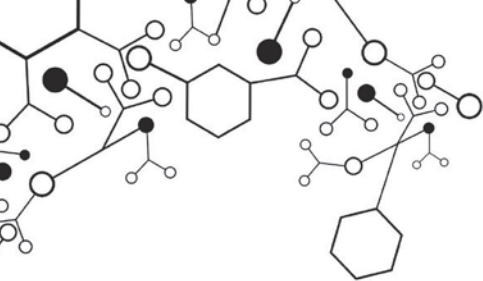
HPV16 E6 tree reconstruction performed with 41 sequences (including 12 from this study) showed a high sequence diversity among Uruguayan strains from E lineage, and grouped them in three different clusters (Fig. 2A). Remaining two isolates clustered in the AA clade, and were phylogenetically related to two Brazilian strains (KP965018 and KP965143).

Phylogenetic analysis and tree reconstruction of E7 region in turn, clustered most of the Uruguayan sequences (10 out of 12) within the E clade (Fig. 2B). Same as observed in the analysis of E6, they grouped in at least three sub clusters. In the other hand, two sequences clustered with AA variants.

4. DISCUSSION

Cervical cancer is a public health problem of major concern in developing countries. Uruguay exhibits high incidence and mortality rates, with HPV16 being the most prevalent genotype among women. Several studies have suggested that HPV16 non-European variants may be associated to the persistence of the infection and its progression to cervical cancer, which partially explains the high incidence and mortality rates of HPV infection in developing regions [Zehbe et al., 1998; Berumen et al., 2001]. Herein, is reported the genetic variability and distribution of HPV16 by phylogenetic reconstruction and nucleotide sequence analyses of E6 and E7 genes and the LCR.

The sequence analysis of LCR performed with 47 HPV16 variants showed 30 SNPs (15 transversions and 15 transitions). This is an interesting observation since LCR is the upstream regulatory region of HPV, with various cellular and viral factors binding there, thus activating or suppressing the p97 promoter activity [Kammer et al., 2000]. Of note, 13 of these point mutations were found to be previously reported: G7488A, T7495C, A7507G, G7521A, G7552A, C7669T, C7689A, A7729C, T7743G, C7764T, T7781C, C7786T and G7799A [Buonaguro et al., 2000; Picconi et al., 2003; Chen et al., 2005; Pande et al., 2008; Mendoza et al., 2013; Freitas et al., 2014; Marongiu et al., 2014; Badano et al., 2015; Gurgel et al., 2015]. The most common mutation observed (in 70% of the sequences)



was the transversion, G7521A. This SNP is localized in one of the multiple binding sites of the transcription factor YY1, which binds to the LCR and represses E6 and E7 expression [Pande et al., 2008]. Several studies of LCR variants have shown that substitution G7521A may increase the oncogenic potential by reducing the repression of oncogenic proteins [Kammer et al., 2000]. Supporting this hypothesis, this SNP was detected in 33 out of 47 sequences included in this study and in 66.7% of patients diagnosed with precancerous lesions. The remaining 17 point mutations were detected for the first time in this study: two in non-European variants (C7484A and A7726C) and the rest in sequences included in the European cluster (C7482A, C7535A, G7552C, G7554C, G7556T, C7557T, C7558T, T7615C, G7768A, C7771G, G7789A, A7793C, A7793T, A7801T, G7806C, A7823T and T7828A). In order to confirm these findings (and those observed in E6 and E7 respective analyses) and to avoid misinterpretations of the substitutions due to polymerase error, PCR and sequencing reactions were performed twice with newly extracted material. Of note, six new, previously non-reported variants are described in this work. Surprisingly, one of these strains, named URU19 (accession number KX901347), exhibited 9 SNPs within the LCR, in respect to the reference sequence. This observation fully agrees with the extremely high variability reported for the LCR and its impact in the regulation of oncogenes transcription and expression [Chen et al., 2005; Pande et al., 2008]. Furthermore, considering that URU19 was isolated from a patient with HSIL, these mutations may likely play a role in the development of carcinogenicity. To support this hypothesis, a larger cohort and a more detailed epidemiological survey should be conducted.

Regarding E6 gene, six out of seven detected mutations (A131G, G145T, T286A, A289G, C335T and T350G) have been previously identified [Chen et al., 2005; Pande et al., 2008; Boumba et al., 2015]. The SNP T350G, was the most frequently observed in this study (in 5 of 12 sequences), and the only one detected in the European lineage. The other four mutations were found in strains belonging to the non-European lineage.

Similarly, the analysis of E7 variants revealed five SNPs, of which three, T732C, T789C and T795G, had been previously described as synonymous changes [Pande et al., 2008]. However, two novel non-synonymous substitutions were identified in this study: D98E (T387A) in E6 and H51N (C712A) in E7. The implications of these two mutations remain unclear and further research is needed. It has been suggested that this type of substitution may indeed lead to differences in the E6 biological or functional properties; for example in its ability to bind and degrade p53 [Stoppler et al., 1996; Sichero et al., 2007].

Phylogenetic analysis performed with LCR, E6 and E7 sequences revealed several interesting results. First, almost 90% of the HPV16 variants belonged to the European lineage, and they clustered in at least two different phylogenetic groups. This observation is not surprising, since more than 90% of the Uruguayan population has an European origin, as a result of several immigration waves coming from Europe that have occurred in the last 120 years [Sanz, 2009; Cabella, 2013]. On the other hand, three samples were found to cluster with Asiatic-American (AA) sequences, and were phylogenetically related to a set of Brazilian isolates. This result suggests that the influence of Asiatic-American genetic burden in Uruguayan population may be greater than initially expected. Recent findings has demonstrated a frequency of 0.2% of people with Asiatic origin living in Uruguay [Cabella, 2013].

Finally, the remaining two sequences, URU9 and URU55 grouped within the African type 2 (AF2) lineage. This rate (4%) of African sequences completely agrees with previous reports from the region [Mendoza et al., 2013].

To assess the distribution and genetic variability of HPV16 variants, the most frequently cervical cancer-associated genotype, is crucial to the knowledge of the viral population dynamics and to survey the prevalence of certain viral subtypes and variants. This information may contribute to develop novel strategies that help to decrease the incidence and mortality rates of this disease. However, it is known that it may have no impact on clinical management or treatment, as suggested by Harari et al. (2016).

Unfortunately, the small size of the study population, the main limitation of this work, prevented this investigation to detect associations between the HPV16 variant and the severity of lesion. Further research is needed in the field. A broader study with a high number of samples from all the cytological classes would provide a better understanding of the epidemiological context of HPV 16 variants in Uruguay. However, and despite this, the identification of several non-reported mutations in the LCR and E6 and E7 genes together with the characterization of novel HPV16 European and Af2 variants, will contribute to shed light over the molecular epidemiology of HPV infection in this developing region with a high burden of disease.

CONCLUSION

In summary, HPV16 genetic variability has been addressed among women from Uruguay, a country with a high incidence of cervical cancer. A clear predominance of European variants was detected, with substantial variability among strains. Additionally, six novel

variants within the E and Af2 lineage are described. These data will contribute to a better understanding of the molecular epidemiology of HPV in the region and to reconstruction of the natural history of this viral infection.

Conflict of interest statement

Authors declare that there is no conflict of interest with regard to the work presented in this article.

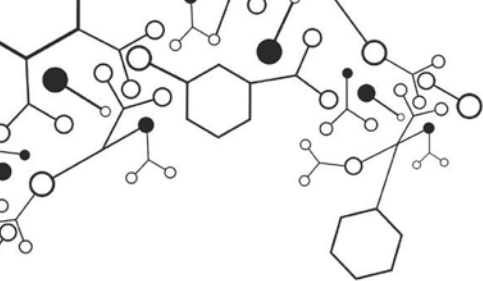
ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Agencia Nacional de Investigación e Innovación and Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República. Authors would like to thank to Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

Authors also thank Verónica Gutierrez and Luciana Gillman for their help in bioinformatics issues.

REFERENCES

- Badano I, Totaro ME, Culasso AC, Sanabria DJ, Schurr TG, Balette IC, Roisman A, Basiletti J, Picconi MA, Campos RH, Liotta DJ. 2015. Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. *Infect Genet Evol* 29:103-109.
- Berois N, De Cremoux P, Mazal D, Sica A, Cedeira M, Caserta B, Barrios E, Osinaga E, Sastre-Garau X. 2013. Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus genotypes in invasive carcinoma of the uterine cervix in Uruguay. *Int J Gynecol Cancer* 23(3):527-532.
- Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93(17):1325-1330.
- Boumba LM, Assoumou SZ, Hilali L, Mambou JV, Moukassa D, Ennaji MM. 2015. Genetic variability in E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus Type 16 from Congolese cervical cancer isolates. *Infect Agent Cancer* 10:15.
- Buonaguro FM, Tornesello ML, Salatiello I, Okong P, Buonaguro L, Beth-Giraldo E, Biryahwaho B, Sempala SD, Giraldo G. 2000. The uganda study on HPV variants and genital cancers. *J Clin Virol* 19(1-2):31-41.
- Cabella W, Nathan M and Tenenbaum M. 2013. Atlas Sociodemográfico y de la Desigualdad del Uruguay. In: Estadística IND, editor: Trilce
- Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. 1999. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 83(4):449-455.
- Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, Tommasino M, Clifford GM. 2012. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 86(12):6855-6861.
- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, ter Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN, et al. 1992. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 66(4):2057-2066.
- Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. 2005. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* 79(11):7014-7023.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1):17-27.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5):E359-386.
- Freitas LB, Chen Z, Muqui EF, Boldrini NA, Miranda AE, Spano LC, Burk RD. 2014. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One* 9(7):e100746.
- GLOBOCAN. 2012. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. In: Ferlay J. SI, Ervik M., Forman D., Bray F., Dikshit R., Elser S., Mathers C., Rebelo M and Parkin D.M., editor. Access date: 9th October 2016. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.
- Gurgel AP, Chagas BS, do Amaral CM, Nascimento KC, Leal LR, Silva Neto Jda C, Cartaxo Muniz MT, de Freitas AC. 2015. Prevalence of human papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil. *Biomed Res Int* 2015:130828.



Harari A, Chen Z, Rodríguez AC, Hildesheim A, Porras C, Herrero R, Wacholder S, Panagiotou OA, Befano B, Burk RD, Schiffman M; Costa Rica HPV Vaccine Trial Group. 2016. Cross-protection of the Bivalent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Against Variants of Genetically Related High-Risk HPV Infections. *J Infect Dis* 213(6):939-947.

Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. 1993. 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* 67(11):6413-6423.

Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 81(Pt 8):1975-1981.

Marongiu L, Godi A, Parry JV, Beddows S. 2014. Human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants stratified by cervical disease stage. *Infect Genet Evol* 26:8-13.

Mendoza L, Picconi MA, Mirazo S, Mongelos P, Gimenez G, Basiletti J, Arbiza J. 2013. Distribution of HPV-16 variants among isolates from Paraguayan women with different grades of cervical lesion. *Int J Gynaecol Obstet* 122(1):44-47.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348(6):518-527.

Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R, Batra S, Das BC. 2008. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol* 46(3):1060-1066.

Parkin DM, Bray F. 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/11-25.

Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, Mbayed V, Villa LL, Gronda J, Campos R, Teyssie A. 2003. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *J Med Virol* 69(4):546-552.

Ramas V, Mirazo S, Bonilla S, Mendoza L, Lago O, Basiletti J, Gonzalez J, Picconi MA, Arbiza J. 2013.

Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from Uruguayan women. *J Med Virol* 85(5):845-851.

Sanz M. 2009. Raza, adscripción étnica y genética en Uruguay. *RUNA* 30(2):163-174.

Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer* 120(8):1763-1768.

Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145(1):181-185.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Jr., Young N. 2002. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287(16):2114-2119.

Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. 1996. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70:6987-6993.

Vidal JP, Felix SP, Chaves CB, Patury P, Franco VF, de Moraes EA, de Carvalho NA, Carvalho AC, Almeida Neto OF, Vieira LM, Correa FM, Martins LF, Negrao A, de Almeida LM, Moreira MA. 2016. Genetic diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian patients with invasive cervical cancer. *J Med Virol* 88(7):1279-1287.

Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 35(1):11-19.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71(3):2463-2472.

Zehbe I, Voglino G, Delius H, Wilander E, Tommasino M. 1998a. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet* 352(9138):1441-1442.

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. 1998b. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 58(4):829-833.

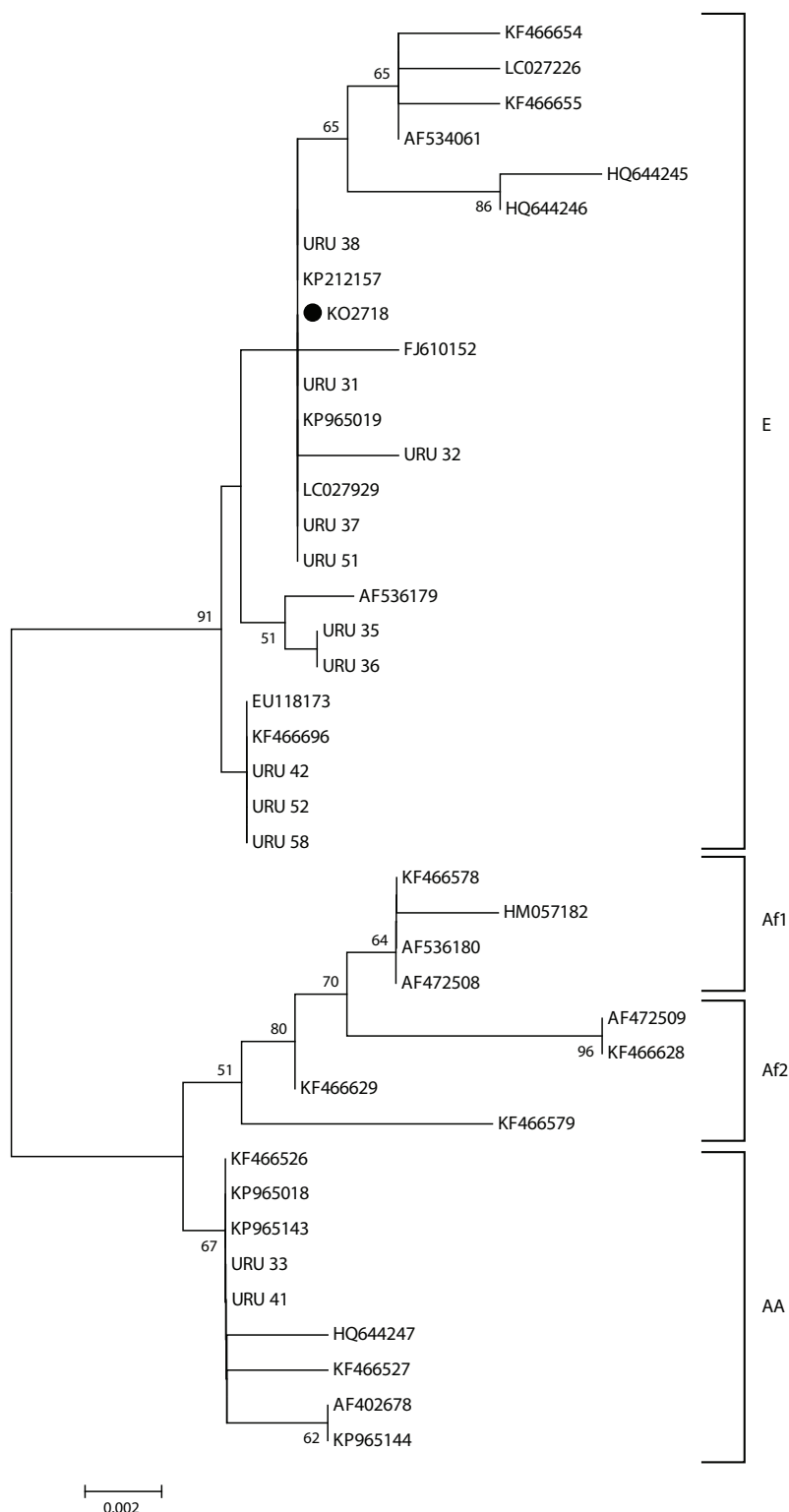
Table 1. Nucleotide sequence analyses of E6, E7 and LCR.

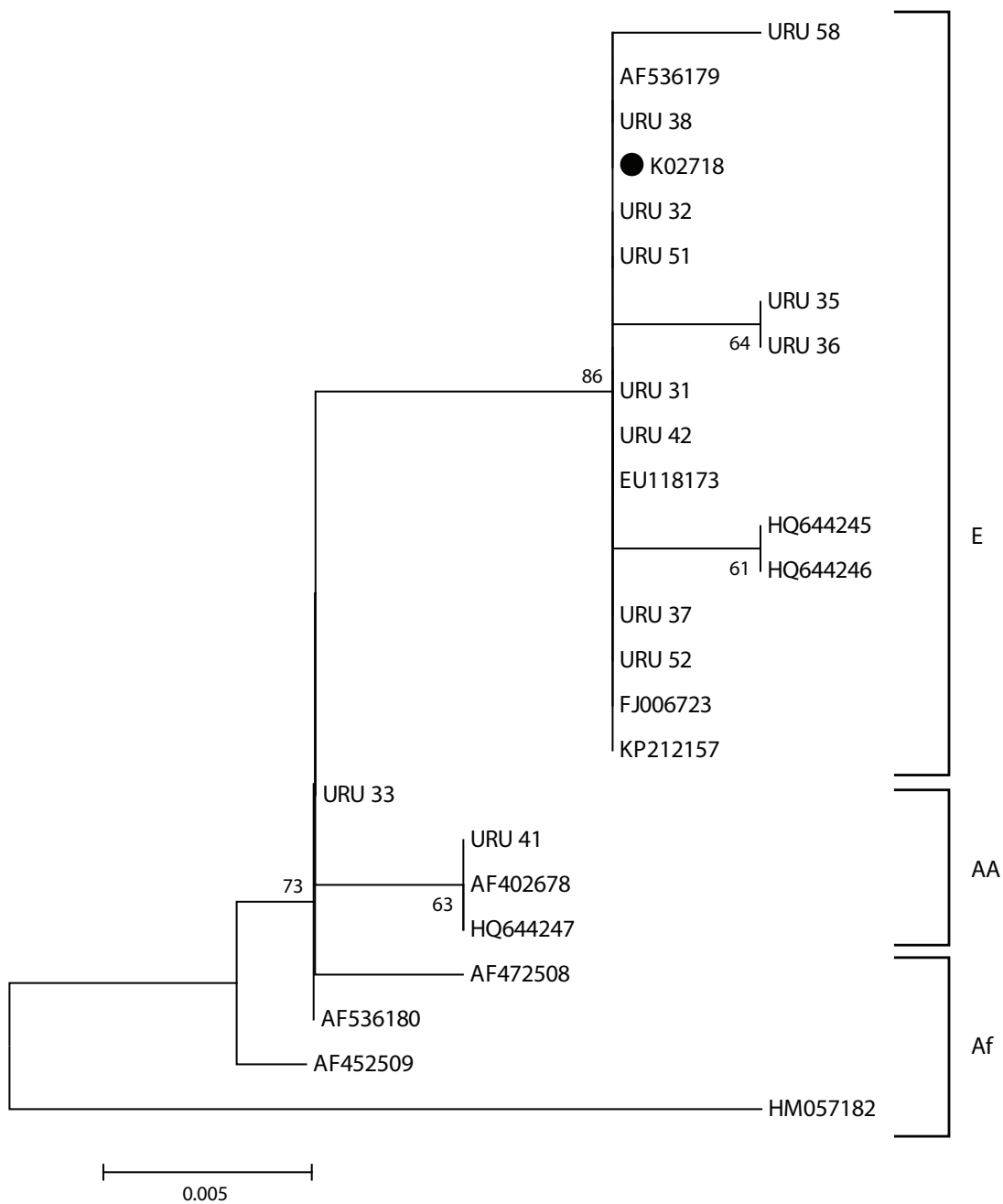
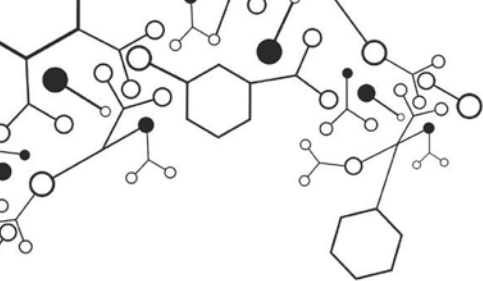
Footnotes Table 1

59

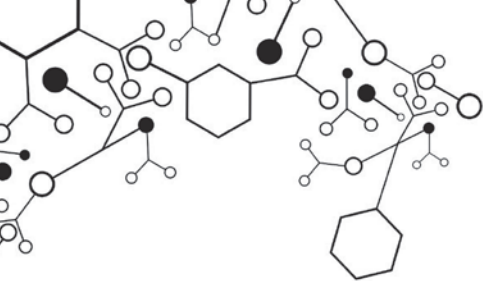
CC1CCCC1C(=O)O

Figure 2: Phylogenetic analysis of HPV16 nucleotide sequences of the 12 Uruguayan isolates. Tree reconstruction was performed by Neighbour-Joining method, with Kimura-2P as the substitution model. For E6 (A) and E7 (B), 29 and 12 reference sequences retrieved from GenBank were included, respectively (accession numbers are indicated). Strains detected in this work are marked with URU prefix. HPV 16 reference clone KO2718 is shown (black circle). Only bootstrap values >50% are shown. E, European lineage; AA, Asian-American lineage; Af1 and Af2, African lineages; A, Asian branch.





Isolate	LCR	E6	E7
URU1	KX901331		
URU2	KX901332		
URU3	KX901333		
URU4	KX901334		
URU5	KX901335		
URU6	KX901336		
URU7	KX901337		
URU8	KX901338		
URU9	KX901339		
URU12	KX901340		
URU13	KX901341		
URU14	KX901342		
URU15	KX901343		
URU16	KX901344		
URU17	KX901345		
URU18	KX901346		
URU19	KX901347		
URU31	KX901348	KX901378	KX901390
URU32	KX901349	KX901379	KX901391
URU33	KX901350	KX901380	KX901392
URU34	KX901351		
URU35	KX901352	KX901381	KX901393
URU36	KX901353	KX901382	KX901394
URU37	KX901354	KX901383	KX901395
URU38	KX901355	KX901384	KX901396
URU39	KX901356		
URU40	KX901357		



URU41	KX901358	KX901385	KX901397
URU42	KX901359	KX901386	KX901398
URU43	KX901360		
URU45	KX901361		
URU46	KX901362		
URU47	KX901363		
URU48	KX901364		
URU51	KX901365	KX901387	KX901399
URU52	KX901366	KX901388	KX901400
URU53	KX901367		
URU54	KX901368		
URU55	KX901369		
URU56	KX901370		
URU57	KX901371		
URU58	KX901372	KX901389	KX901401
URU59	KX901373		
URU60	KX901374		
URU61	KX901375		
URU62	KX901376		
URU63	KX901377		

POBLACIÓN VIVIENDO CON VIH

Población

Los pacientes con resultados positivos por la técnica de PCR-RFLP para la infección por VPH 16 (10 en la primera toma y 7 en la segunda toma) participantes del estudio de frecuencia y genotipos circulantes de VPH, que se atienden en el Servicio de Enfermedades Infecto-contagiosas del Hospital Pasteur (SEIC-HP) (Capítulo 1).

MATERIALES Y MÉTODOS

EXTRACCIÓN DE ADN

Extracción de ADN (Capítulo 1).

PCR DE LCR, e6 y e7

La técnica de PCR, la visualización de los productos obtenidos de la misma y la extracción de éstos desde geles de agarosa se realizaron como se describió previamente (Ramas et al., 2016).

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES

Las variantes se identificaron utilizando la secuencia prototipo (VPH 16), número de acceso al GenBank K02718, que pertenece al linaje Europeo, como secuencia de referencia para la comparación y los análisis filogenéticos (Seedorf et al., 1985). Se nombraron con la siguiente nomenclatura: letra M, seguida por el año de su colección, el número de muestra y el número de toma: M12011, M12091 y 2, M12211, M12221, M12241 y 2, M12281, M12301, M12491, y M12651.

Las secuencias tomadas del GenBank para llevar a cabo los análisis filogenéticos representan las cinco ramas filogenéticas propuestas por Ho y colaboradores en 1993, además, para el análisis de LCR, también se incluyeron las secuencias variantes de VPH 16 propuestas por Ho y secuencias regionales de Argentina, Brasil y Paraguay. Estas secuencias se denominan con sus números de acceso al GenBank (Gurgel et al., 2015; Ho et al., 1993; Mendoza et al., 2013; Picconi et al., 2003).

Los múltiples alineamientos de las secuencias de los genes e6 y e7 y de LCR de VPH 16, fueron realizados con el programa Muscle, MEGA paquete 6.0. Los árboles filogenéticos se construyeron con el modelo Kimura-2 parámetros, por el método Neighbour-Joining, con 1000 repeticiones o bootstrap usando MEGA paquete 6.0.

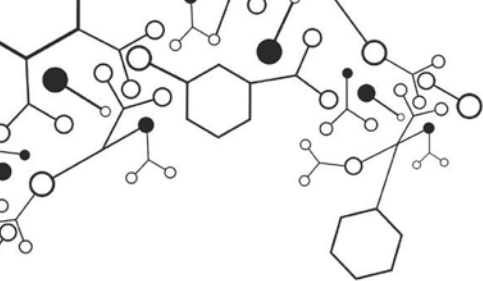
RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Las 8 muestras de primera toma positivas para VPH 16 provenían de pacientes entre 26 y 69 años y resultaron todas NILM. Las 3 muestras analizadas de segunda toma, dos de ellas fueron positivas para VPH en la primera toma, fueron diagnosticadas como NILM y las pacientes varían de 29 a 40 años.

ANÁLISIS DE SECUENCIA DEL FRAGMENTO DE LCR

Un total de 11 secuencias fueron analizadas comparándolas con una secuencia prototipo de referencia, K02718, desde el nucleótido 7480 al 7784 (posiciones según K02718). Cuatro de esas secuencias provenientes de la misma paciente, primeras y segundas tomas, M1209 y M1224. Las variaciones en ésta región fueron 4 (44.44%), 2 transiciones y 2 transversiones, se muestran en la Tabla 4.



Las secuencias de VPH 16 fueron analizadas según el alineamiento de los 364 pares de bases de un fragmento de LCR por el método de Neighbour-Joining, el árbol filogenético se puede observar en la Figura 17.

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE e6

Cinco secuencias fueron comparadas con la secuencia de referencia, desde el nucleótido 106 al 552 (posiciones según K02718), dos de ellas provienen de la misma paciente, toma uno y dos, M12091 y M12092. Las variaciones en ésta región fueron 4 (100%), 3 transiciones y 1 transversión, el detalle de las mutaciones se puede observar en la Tabla 4.

Las secuencias fueron determinadas por alineamiento de 476 pares de bases, usando el método Neighbour-Joining para el análisis filogenético, el árbol producto de éste análisis se observa en la Figura 18.

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE e7

Cinco secuencias fueron comparadas con la secuencia de referencia, desde el nucleótido 562 al 858 (posiciones según K02718), dos de ellas provienen de la misma paciente, toma uno y dos, M12241 y M12242. No se registraron variaciones en ésta región.

Las secuencias fueron determinadas por alineamiento de 296 pares de bases, usando el método Neighbour-Joining para el análisis filogenético, el árbol producto de éste análisis se observa en la Figura 19.

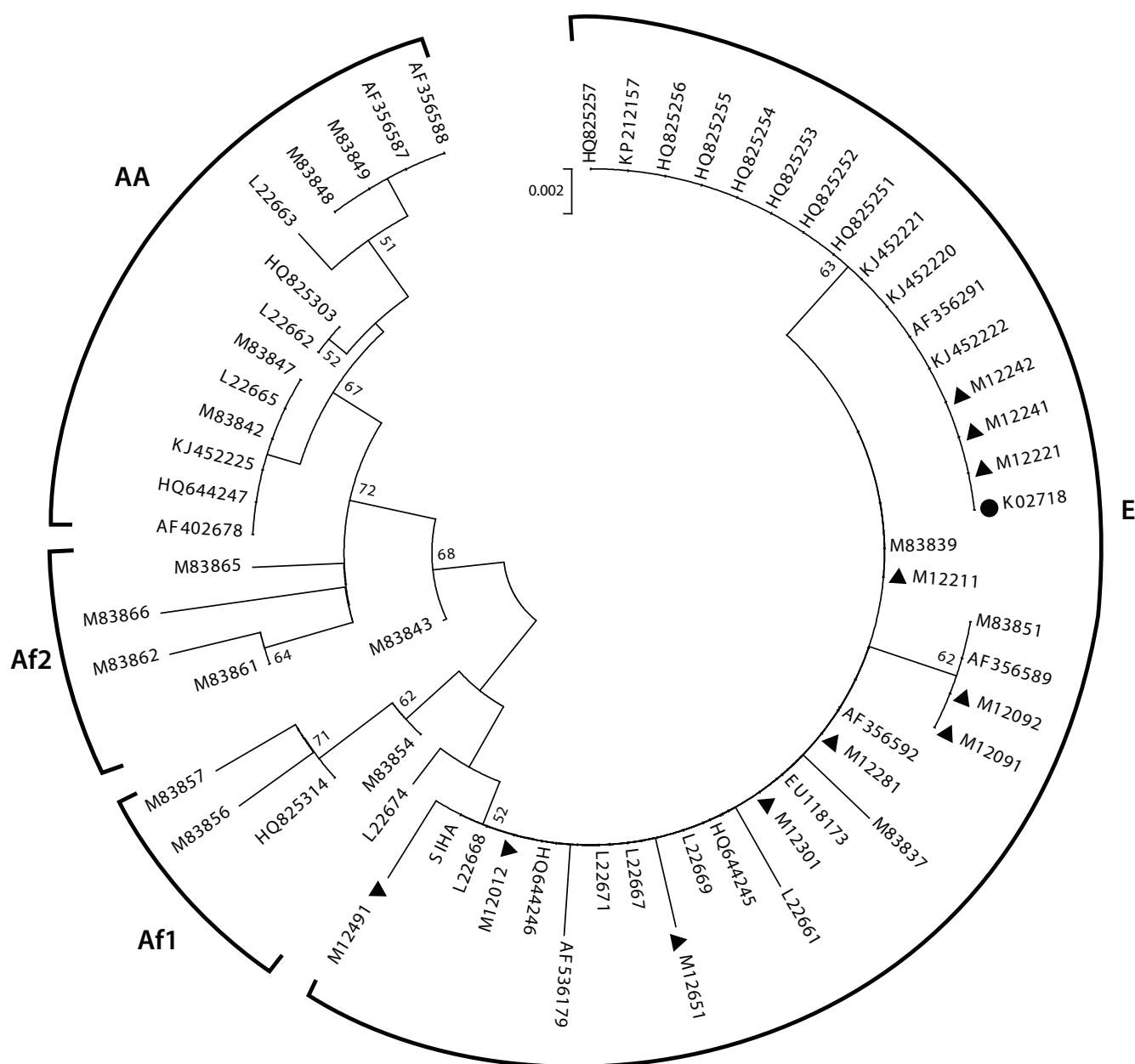
TABLA 4:

Secuencia de nucleótidos con mutaciones puntuales entre los aislamientos de VPH 16. Las posiciones de los nucleótidos de las variaciones en los fragmentos de e6 y LCR fueron escritos en la parte superior y la identificación de las muestras se detallan a la izquierda. Las posiciones sin variación en comparación con el clon de referencia fueron marcadas con puntos.

	LCR				e6			
	7507	7521	7552	7616	123	176	350	532
KO2718	A	G	G	T	A	G	T	A
M12012	.	A	.	.	.	A	G	G
M12091	.	A	A	.	G	.	.	G
M12092	.	A	A	.	G	.	.	G
M12211	.	A	.	.				
M12221	.	.	.	.				
M12241	.	.	.	.	G	.	.	.
M12242	.	.	.	.				
M12281	.	A	.	.				
M12301	.	A	.	.	G	.	G	.
M12491	C	A	.	.				
M12651	.	A	.	G				

FIGURA 17:

Árbol filogenético construido a partir de secuencias de nucleótidos de LCR de 11 aislados, las secuencias de estudio se marcan con un triángulo negro, las secuencias regionales y mundiales están indicadas con sus números de acceso de GenBank. El VPH 16 usado como clon prototipo de referencia, número de GenBank K02718, marcado con un círculo negro. El árbol filogenético se construyó por el método de Kimura-2-parámetros, usando el modelo de Neighbour-Joining, MEGA 6.0.



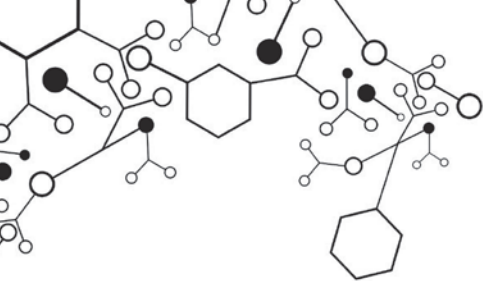


FIGURA 18:

Árbol filogenético construido a partir de secuencias nucleótídicas de e6 de 5 aislados, las secuencias de estudio se marcan con un triángulo negro, otras secuencias de referencia están con sus números de acceso de GenBank. El VPH 16 usado como clon prototipo de referencia, número de GenBank K02718, marcado con un círculo negro. El árbol filogenético se construyó por el método de Kimura-2-parámetros, usando el modelo de Neighbour-Joining, MEGA 6.0.

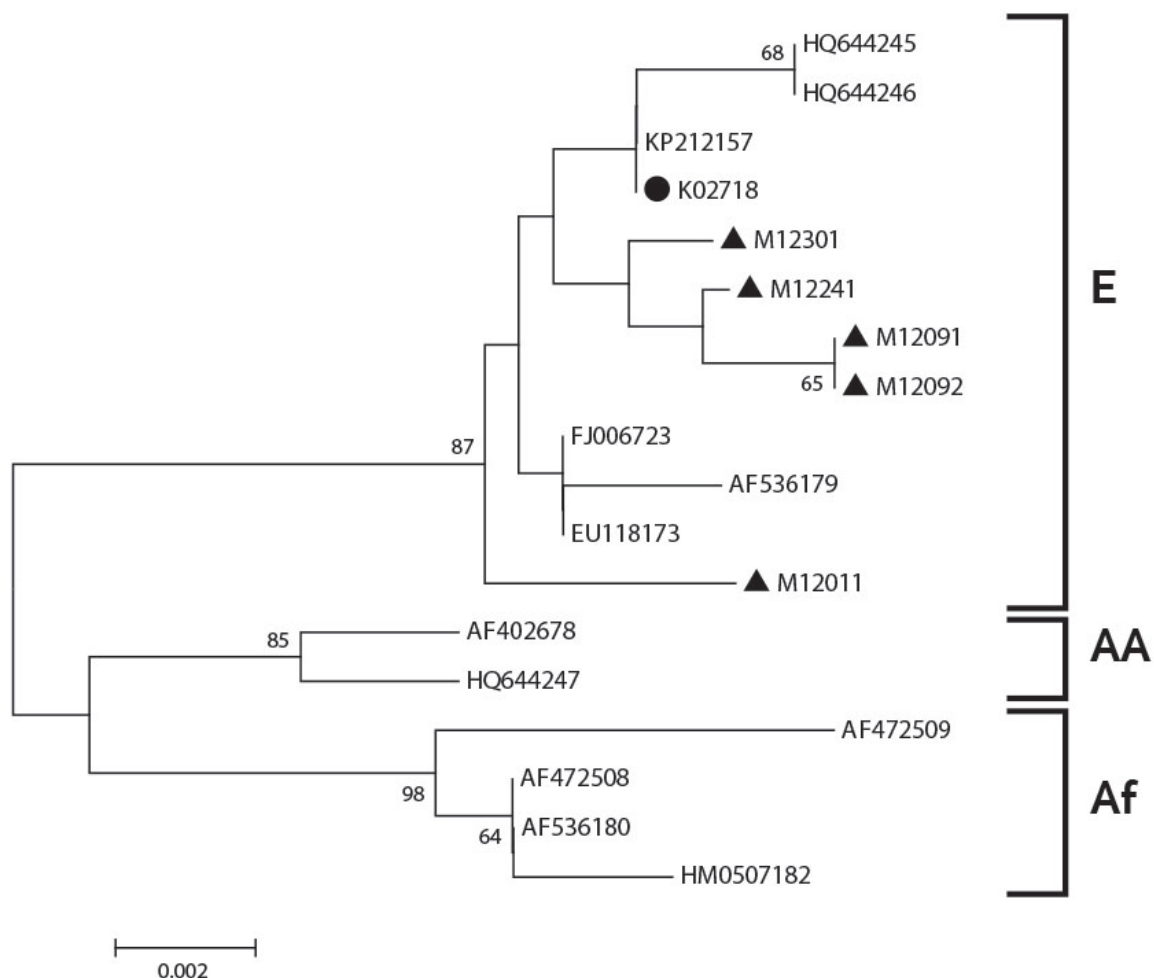
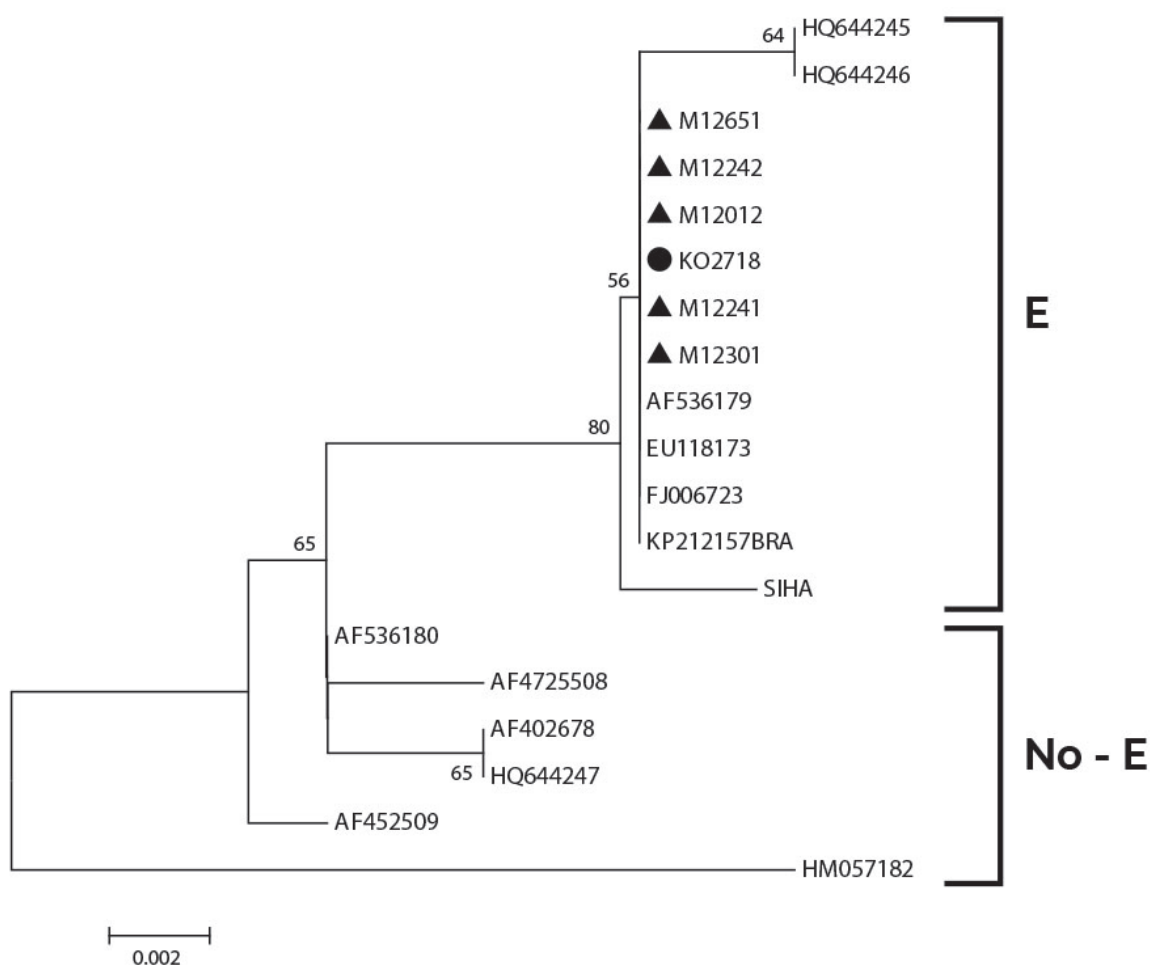
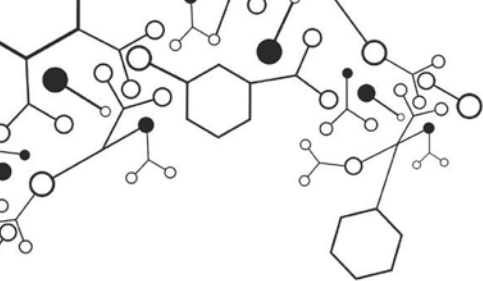


FIGURA 19:

Árbol filogenético construido a partir de secuencias nucleótídicas de e7 de 5 aislados, las secuencias de estudio se marcan con un triángulo negro, otras secuencias de referencia están con sus números de acceso de GenBank. El VPH 16 usado como clon prototipo de referencia, número de GenBank K02718, marcado con un círculo negro. El árbol filogenético se construyó por el método de Kimura-2-parámetros, usando el modelo de Neighbour-Joining, MEGA 6.0.





Discusión

VPH 16 es responsable de más del 50% de los casos de carcinoma de cuello de útero en todo el mundo (Munoz et al., 2003). No existen datos disponibles, por el momento, sobre las variantes moleculares del VPH 16 en las mujeres uruguayas viviendo con VIH. En un estudio anterior, las frecuencias de la infección por VPH y los diferentes genotipos circulantes en mujeres uruguayas con diagnóstico de lesiones intraepiteliales reveló que el VPH genotipo 16 fue el genotipo más frecuente, seguido por el VPH 68 y 58 (Ramas et al., 2013), además, un estudio no publicado en pacientes coinfectadas VIH-VPH mostró también al 16 como genotipo más prevalente, tanto en infecciones simples como múltiples (ver Capítulo 1). Éste trabajo reporta por primera vez, conocimiento acerca de las variantes circulantes de VPH genotipo 16 en pacientes viviendo con VIH y caracteriza los cambios de nucleótidos en los aislados para los genes e6 y e7, y en la región larga de control, LCR.

El análisis filogenético de e6, e7 y LCR fue realizado para conocer y comparar la distribución local de las variantes moleculares de VPH 16 con respecto a una secuencia de referencia. Un total de 4 mutaciones puntuales, 2 transversiones y 2 transiciones se observaron en 11 secuencias analizadas de LCR. De éstas 11 secuencias, 7 pertenecían a 7 pacientes y las otras cuatro secuencias pertenecían a las primeras y segundas tomas de muestra de dos pacientes. En las secuencias, M12091 y 2, primera y segunda toma del paciente 9 presentaron exactamente la misma secuencia, conservando las mismas mutaciones. Dos de las mutaciones, G7521A y G7552A han sido reportadas previamente, la mutación A7507C fue reportada pero con el cambio AG, lo que conforma ésta mutación como una nueva variante. La T7616G, es la otra nueva variante detectada. En e6 se observaron 4 cambios en 5 secuencias analizadas. Una transversión, T350G, ampliamente reportada en la literatura, mutación sinónima que cambia una leucina por una valina en la posición 83. Tres transiciones, A123G, G176A y A532G, éstas 2 últimas reportadas (Picconi, 2003; Chen, 2005). G176A es una mutación no sinónima con un cambio aminoacídico, aspartato por asparagina en la posición 25; A532G es sinónima. A123G conforma una nueva variante, sinónima, cambia en la posición 7, un ácido glutámico por una glicina. Se analizaron 5 secuencias para el gen e7 pero no presentaron mutaciones. LCR fue el fragmento más variable, presentando mayor número de mutaciones, seguido por e6 y e7 fue el gen más conservado.

Los aislamientos uruguayos de VPH 16 provenientes de pacientes viviendo con VIH, se analizaron comparando con un clon prototipo, secuencias de la región y secuencias tomadas del GenBank que incluían todas las ramas europeos y no europeos, para llevar a cabo el análisis filogenético. Los análisis de los tres segmentos estudiados, LCR, e6 y e7 mostraron dos ramas claras, dividiendo el linaje europeo del no europeo que incluye; los dos linajes Africanos, tipo 1 y 2, el Asiático y el Asiático-Americano. El árbol filogenético LCR fue construido con los 11 aislamientos uruguayos, se observan dos ramas principales, todos los aislamientos de éste estudio pertenecen al linaje Europeo, mostrando una frecuencia del 100%, lo que era de esperarse debido a que en Uruguay, la población de ascendencia europea es un 90,8% (Cabella, 2013; Sans, 2009).

Por otra parte, los árboles filogenéticos realizados para e6 y e7 mostraron el mismo patrón que el análisis de LCR, dos ramas principales una que abarca las secuencias Europeas y otro con varias sub-ramas que incluyen las As, AA, Af1 y Af2. Los 5 aislamientos estudiados en estos segmentos fueron incluidos en la rama de secuencias Europeas cercanas a otras variantes Europeas obtenidas del GenBank, pertenecientes a la región y al mundo.

El conocimiento epidemiológico de los genotipos circulantes del VPH, sus frecuencias, las variantes de los genotipos más prevalentes, son herramientas importantes para el médico tratante para poder decidir sobre el mejor tratamiento para el paciente. También aporta al conocimiento de la infección por VPH en nuestro país, de la que hay escasos reportes en personas viviendo con VIH. Lo último y más importante es que podría contribuir a la puesta a punto de los programas de prevención del cáncer con el fin de disminuir la incidencia y la mortalidad de los países en desarrollo. Sería necesario un estudio más amplio, con un mayor número de secuencias, amplificando esas secuencias en las regiones estudiadas, para obtener más datos y conclusiones que aporten a la epidemiología de ésta infección.





Capítulo 2

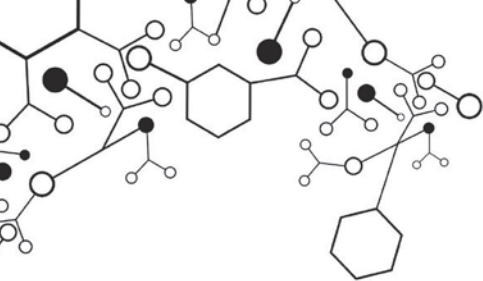
POLIMORFISMOS DEL GEN SUPRESOR DE TUMOR p53

INTRODUCCIÓN

El gen supresor de tumor p53, codifica una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, la proteína supresora de tumor P53. Dicha proteína es un factor de transcripción que puede inducir o reprimir genes de expresión involucrados en vías centrales, como el control del ciclo celular, senescencia, la muerte programada de células en respuesta a señales oncogénicas, estrés celular o infecciones, entre otras funciones fundamentales (Joerger and Fersht, 2008).

La infección por un virus papiloma humano de alto riesgo oncogénico, VPH-AR, ha sido reconocida como la causa principal de la progresión de las lesiones intraepiteliales precursoras de cáncer y del desarrollo de carcinomas (Bosch et al., 1995; Munoz et al., 2003). Sin embargo, existen diversos factores propios del virus y del hospedador que actúan como factores de riesgo contribuyendo al desarrollo de la carcinogénesis, como ejemplo la persistencia de la infección por más de dos años del mismo VPH-AR, la inserción del genoma viral en el genoma celular, las variantes de VPH-AR, en cuanto al hospedador, sus hábitos como fumar, multiparidad, etc., entre otros como otras infecciones presentes en el huésped, al igual que ciertas características genéticas propias del hospedador como los polimorfismos en el gen supresor de tumor p53 (Alam et al., 2008; Koushik, Platt, and Franco, 2004; Lizano, Berumen, and Garcia-Carranca, 2009; Roura et al., 2016; Silva, Cerqueira, and Medeiros, 2014; Szostek et al., 2009).

Varios estudios moleculares han reportado que el 90% de los tumores presentan resultados positivos en la detección de genoma viral de VPH-AR (Munoz et al., 2003) y que éstos genomas expresan activamente las oncoproteínas virales E6 y E7. E6 se une a P53 por unión directa con la ubiquitin ligasa celular E6AP, inhibiendo así la la función de P53



que estimula la apoptosis de las células infectadas. Por otra parte E7 se une y degrada al factor de transcripción E2F, lo que también implica la no entrada de las células dañadas en apoptosis (Buitrago-Perez et al., 2009). Ciertos estudios han determinado que algunos polimorfismos presentes en el codón 72 del gen supresor de tumor p53 están asociados con la carcinogénesis y la progresión al cáncer cervical, por lo que podrían usarse como un biomarcador de carcinogénesis. Las personas pueden tener una de las dos variaciones o polimorfismos en el codón 72 de p53, cada polimorfismo codifica para una proteína P53 que si bien tienen la misma función, difieren algo en estructura y actividad biológica, ellas son; P53Pro y P53Arg. Estudios mostraron que E6 inactiva a P53Arg más fácilmente que a P53Pro. Se sabe también que las mujeres homocigotas para p53, gen que codifica para P53Arg, tienen una mayor susceptibilidad a los efectos de la infección por un VPH-AR, o sea más probabilidad de desarrollar carcinomas, que las mujeres heterocigotas u homocigotas para el gen que codifica para P53Pro (Makni et al., 2000; Rosenthal et al., 1998). Sin embargo, otro estudio realizado con una cohorte de pacientes voluntarios, sin lesión, otros con lesión y otros con carcinoma cervical, demostró que no presentaron diferencias significativas (Storey et al., 1998).

El propósito de éste objetivo es testear la hipótesis de que el polimorfismo del gen supresor de tumor p53 Arg/Arg pueda utilizarse como un marcador oncogénico. Para ello se analizaron muestras de pacientes con lesiones intraepiteliales de distintos grados y se las comparó con pacientes sin lesiones, utilizando dos estrategias metodológicas, en un principio PCR-RFLP, para luego reanalizar y continuar con la técnica de PCR utilizando cebadores específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada

Para cumplir con éste objetivo se utilizaron dos grupos de pacientes, aquellas pacientes que concurren para su asistencia a las policlínicas barriales de la Intendencia de Montevideo (IM) y las pacientes viviendo con VIH que se atienden en el Servicio de Enfermedades Infecto-contagiosas del Hospital Pasteur (SEIC-HP) en Montevideo (Capítulo 1). De ambos grupos se seleccionaron muestras positivas para la detección de genoma de VPH y un subgrupo de muestras negativas. En el caso del grupo de muestras de pacientes de la IM, se incluyeron aquellas de las cuales se mantenía stock de ADN, tanto de las positivas para la detección de genoma de VPH como de las negativas de todos los grupos citológicos. Se procesaron de éste grupo 143 muestras: 63 VPH positivos (8 negativos para lesión intraepitelial o malignidad, NILM; 4 con células de significado atípico, ASCUS; 25 con lesión intraepitelial de bajo grado, LSIL; 14 con lesión intraepitelial de alto grado HSIL; 12 sin dato de citología (SD)) y 75 VPH negativos (35 NILM, 4 ASCUS, 10 LSIL, 1 HSIL, 25 SD). En el grupo de las pacientes de SEIC-HP, se incluyeron todos los positivos, 21 muestras VPH positivas (20 NILM y 1 LSIL) y una fracción de las muestras negativas, 36 muestras NILM, puesto que éste grupo carece de pacientes con lesiones.

Extracción de ADN

El ADN total presente en la muestra fue extraído dependiendo del grupo estudiado:

- **Pacientes de la IM:** Extracción por el método de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (Capítulo 1).
- **Pacientes del SEIC-HP:** Extracción con kit comercial (Capítulo 1).

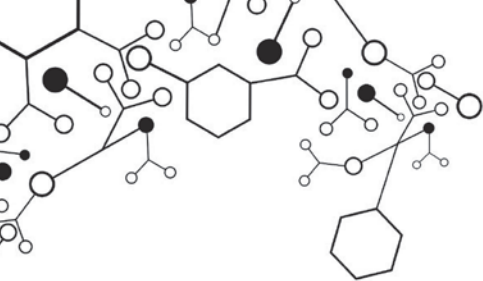
Detección del polimorfismo de p53 por técnica de PCR-RFLP (1era estrategia)

Se utilizaron 55 muestras de pacientes de la IM y 30 muestras de pacientes de SEIC-HP para el análisis de los polimorfismos del gen supresor de tumor p53 por la técnica de PCR-RFLP como fue descrita por Burrioni y colaboradores en 2013 (Burrioni et al., 2013). Se amplificó un fragmento de 309 pares de bases del exón 4 de p53, éste sitio contiene un sitio polimórfico en el codón 72 con un lugar de corte para la enzima de restricción BstU1. Brevemente, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µL, y las concentraciones finales de los reactivos fueron: Buffer 1X, 2,5mM de MgCl₂, 0,25mM de dNTPs, 1µM de cada primer p53 F/R (Tabla 5) y 0.02 U/µL de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Los tubos fueron cargados de la siguiente manera: 20µL de mix de PCR, 5µL de ADN extraído o 5µL de agua pura para biología molecular libre de DNasas y RNasas para el control negativo. La amplificación se realizó mediante el siguiente ciclado: desnaturalización inicial a 94°C, 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión: 94°C, 30 segundos; 53°C, 30 segundos; 72°C, 45 segundos, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Por cada ronda de PCR, se utilizó como control positivo ADN extraído de células SiHa o HeLa y un control negativo (agua libre de DNasas y RNasas pura para técnicas moleculares). Los productos de la técnica de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con un intercalante no tóxico GelRed (Oler up SSP), exponiéndolos a radiación UV en un transiluminador.

El fragmento amplificado fue digerido con la enzima de restricción BstU1 (Thermo Scientific) durante toda la noche a 60°C. El patrón de restricción se visualizó en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed (Oler up SSP). El fragmento correspondiente al alelo Pro/Pro, no presentaba corte con BstU1, por lo que se observó una banda a 309 pares de bases. El alelo Arg/Arg, presenta el sitio de corte para BstU1 formando dos fragmentos, uno de 175 y otro de 134 pares de bases. Los individuos heterocigotas Arg/Pro presentan los tres fragmentos, 309, 175 y 134 pares de bases (Figura 20).

Detección del polimorfismo de p53 por técnica de PCR con cebadores específicos

Se utilizaron 143 muestras de pacientes de la IM y 57 muestras de pacientes de SEIC-HP para el análisis de los polimorfismos del gen supresor de tumor p53 por la técnica de PCR con cebadores específicos como fue descrita por Soultzis y colaboradores en 2002 (Soultzis et al., 2002). Para la determinación del polimorfismo en el codón 72 del gen supresor de tumor p53 se utilizaron dos juegos de cebadores; un par amplifica el alelo Arg y otro, el alelo Pro. La reacción se realizó por separado para ambos alelos en un volumen final de 25µL, y las concentraciones finales de los reactivos fueron: Buffer 1X, 1,2mM de MgCl₂, 0,16mM de dNTPs, 0,4µM de cada cebador Arg F/R y Pro F/R (Tabla 5) y 0.02U/µL de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Los tubos fueron cargados de la siguiente manera: 20µL de mix de PCR, 5µL de ADN extraído o 5µL de agua pura para molecular



libre de DNasas y RNasas para el control negativo. La amplificación se realizó mediante el siguiente ciclado: desnaturalización inicial a 94°C, 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión: 94°C, 30 segundos; 60°C, 30 segundos para el alelo Arg y 54°C para el alelo Pro; 72°C, 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Por cada ronda de PCR, se utilizó como control positivo ADN extraído de células SiHa o HeLa y un control negativo (agua libre de DNasas y RNasas pura para técnicas moleculares). Los productos de la técnica de PCR son visualizados como se mencionó en la primera estrategia.

El producto de PCR para homocigotas Arg/Arg mostrará una banda única de 141 pares de bases, para el homocigota Pro/Pro, una banda de 177 pares de bases, en el caso de heterocigotas se observaran dos bandas una a 177, correspondiente a la amplificación con los cebadores del alelo Pro y otra a 144 pares de bases con los cebadores del alelo Arg, Figura 21.

TABLA 5:
Secuencias de cebadores utilizados para ambas técnicas, PCR-RFLP y PCR específica.

Nombre cebador	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del producto en pares de bases	Artículo
p53 F	TTC ACC CAT CTA CAG TCC	309	Burroni y cols., 2013
p53 R	CTC AGG GCA ACT GAC CGT	309	Burroni y cols., 2013
Arg F	TCC CCC TTG CCG TCC CAA	141	Soulitzis y cols., 2002
Arg R	CTG GTG CAG GGG CCA CGC	141	Soulitzis y cols., 2002
Pro F	GCC AGA GGC TGC TCC CCC	177	Soulitzis y cols., 2002
Pro R	CGT GCA AGT CAC AGA CTT	177	Soulitzis y cols., 2002

Análisis de los productos de PCR-RFLP y de PCR con cebadores específicos

La electroforesis en geles de agarosa y la visualización de los productos de las técnicas de PCR y de RFLP fueron detalladas en el Capítulo 1, apartado Electroforesis en geles de agarosa.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el test Chi cuadrado con el paquete Statgraphics Centurion XVI, versión 16.1.11, Statgraphics. Los valores significativamente estadísticos fueron considerados como P-valor < 0.05.

RESULTADOS

Diagnóstico Citológico

De acuerdo con el sistema de clasificación Bethesda (Solomon et al., 2002), las muestras fueron agrupadas: 69 resultaron NILM (43 de IM y 56 de SEIC-HP), 8 ASCUS, 36 LSIL (35 de la IM y 1 del SEIC-HP), 15 resultaron HSIL y 37 no presentaban datos en la ficha epidemiológica, SD. Las edades de las pacientes varían de 17 a 71 años incluyendo ambos grupos IM y SEIC-HP y todas las clases citológicas.

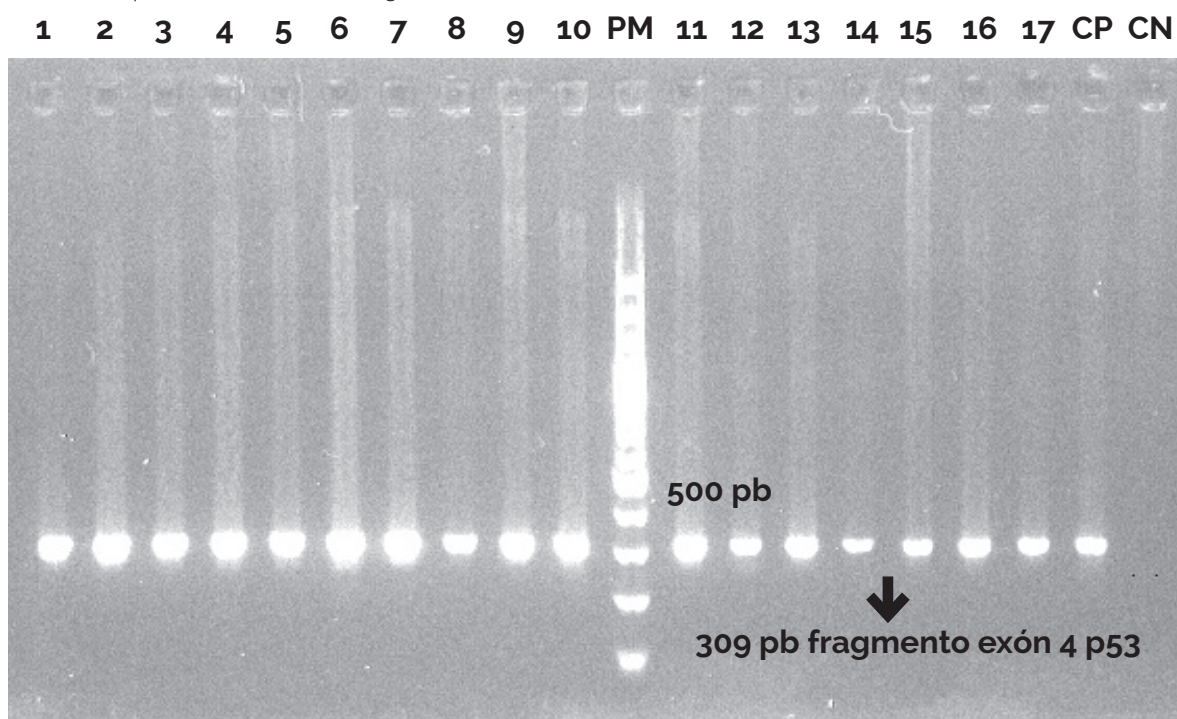
Detección del polimorfismo de p53 por técnica de PCR-RFLP (1era estrategia)

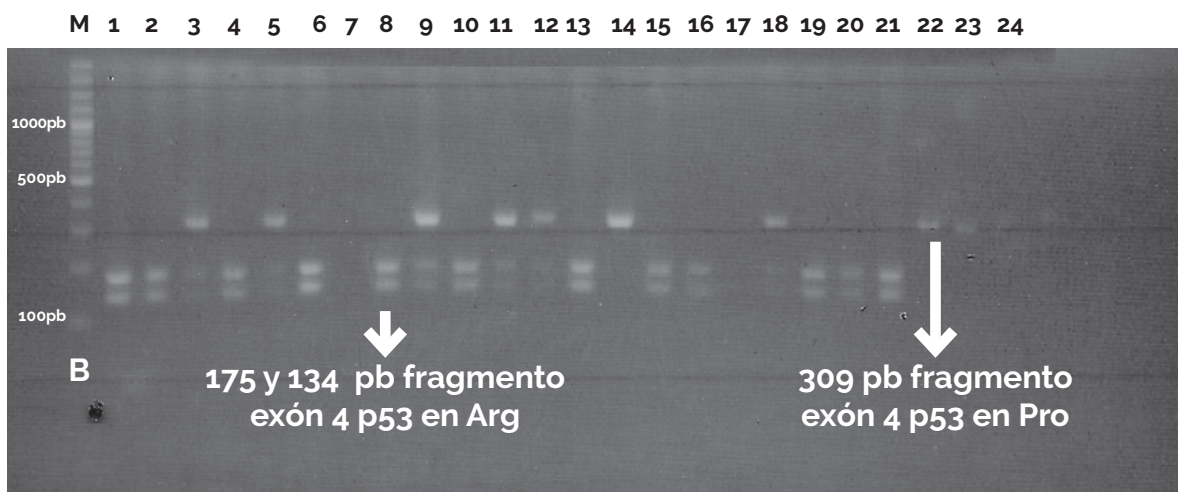
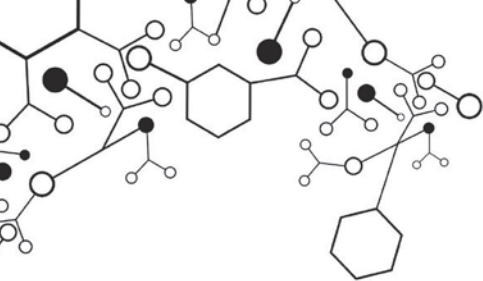
La técnica de PCR-RFLP fue puesta a punto. Se obtuvieron resultados de polimorfismos para 85 muestras, pero por inconvenientes en la obtención de la enzima de restricción, se decidió cambiar de estrategia y utilizar la detección por PCR con cebadores específicos.

Usando la metodología de la segunda estrategia, las 85 muestras fueron re-testeadas por PCR con cebadores específicos, obteniéndose los mismos resultados por ambas técnicas. Se comentan todos los resultados en el próximo punto. Se observan los geles de la técnica de PCR y de la técnica de RFLP con ésta metodología, Figura 20.

FIGURA 20:

A) Fotografía del gel de una reacción de PCR con los cebadores p53 F/R que amplifican un fragmento de 309 pares de bases. B) Gel de la técnica de RFLP [Burroni et al., 2013]. PM: marcador de peso molecular de 100 pb, CP: control positivo, CN: control negativo.





Detección del polimorfismo de p53 por técnica de PCR con cebadores específicos

Doscientas muestras fueron analizadas por ésta metodología, 143 pertenecientes a pacientes de la IM (5 de éstas muestras estaban degradadas y se descartaron) y 57 a pacientes del SEIC-HP. Los pacientes de ambos grupos tienen un rango de edad de 17 a 71 años. Los resultados de los análisis moleculares y clínicos se muestran en la Tabla 6.

El polimorfismo Arg/Arg del codón 72 de p53 fue encontrado en 90 pacientes (46.2%), el polimorfismo heterocigota Arg/Pro en 79 pacientes (40.5%) y el polimorfismo Pro/Pro en 26 pacientes (13.3%). Figura 21. Para detallar, dentro de los pacientes sin lesión, NILM; el polimorfismo Arg/Arg del codón 72 de p53 fue encontrado en 47 pacientes (52.2%), el polimorfismo heterocigota Arg/Pro en 42 pacientes (53.2%) y el polimorfismo Pro/Pro en 10 pacientes (38.5%). En el grupo de casos, pacientes con algún grado de lesión, ASCUS, LSIL o HSIL, el polimorfismo Arg/Arg del codón 72 de p53 fue encontrado en 21 pacientes (23.3%), el polimorfismo heterocigota Arg/Pro en 29 pacientes (36.7%) y el polimorfismo Pro/Pro en 9 pacientes (34.6%). Los resultados de la detección de genoma de VPH y los polimorfismos hallados comparando casos y controles, se observan en la Tabla 7.

FIGURA 21:

Fotografía del análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa. Las reacciones de PCR con cebadores específicos para Arg y Pro se realizan en tubos separados, pero se cargan en el mismo gel, para optimizar la visualización del polimorfismo presente en la muestra. PM: marcador de peso molecular de 100 pb, 1-10 productos de PCR correspondientes a 10 muestras. A: producto de amplificación con cebadores específicos para Arginina, P: producto de amplificación con cebadores específicos para Prolina, CP: control positivo, CN: control negativo

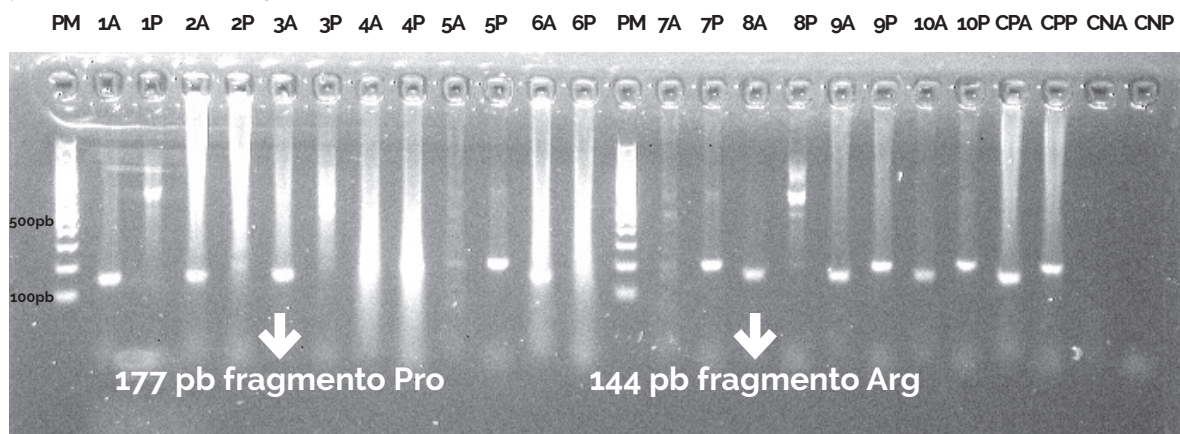


TABLA 6:

Datos de los resultados de los polimorfismos obtenidos, los grados citológicos y los datos de detección de genoma de VPH.

Polimorfismo	NILM	ASCUS	LSIL	HSIL	SD	Total
AA VPH +	13	1	12	5	6	37
AA VPH -	34		3		16	53
AP VPH +	10	3	12	7	4	36
AP VPH -	32	3	3	1	4	43
PP VPH +	5		2	2	2	11
PP VPH -	5	1	4		5	15

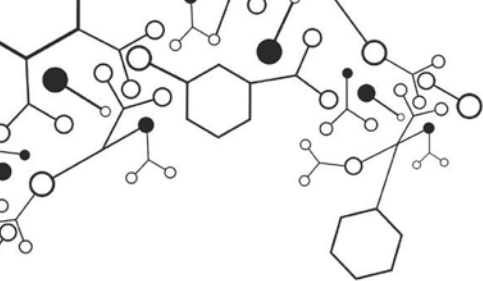
NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad, ASCUS: células atípicas de significado indeterminado, LSIL: lesión intraepitelial de bajo grado, SD: muestras sin dato citológico, AA: homocigota para Arginina, AP: heterocigota Arginina/Prolina, PP: homocigota para Prolina, VPH+: virus papiloma humano positivo, VPH-: virus papiloma humano negativo.

TABLA 7:

Distribución de los polimorfismos de p53 relacionados con la infección por VPH en población con citología positiva, casos (ASCUS, LSIL, HSIL) en contra parte con los pacientes sin lesión, controles (NILM). VPH VPH+: virus papiloma humano positivo, VPH-: virus papiloma humano negativo.

	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro
CASOS CITOLÓGICOS			
VPH +	18	22	4
VPH -	3	7	5
Total	21 (23.3%)	29 (36.7%)	9 (34.6%)

CONTROLES SIN LESIÓN			
VPH +	13	10	5
VPH -	34	32	5
Total	47 (52.2%)	42 (53.2%)	10 (38.5%)

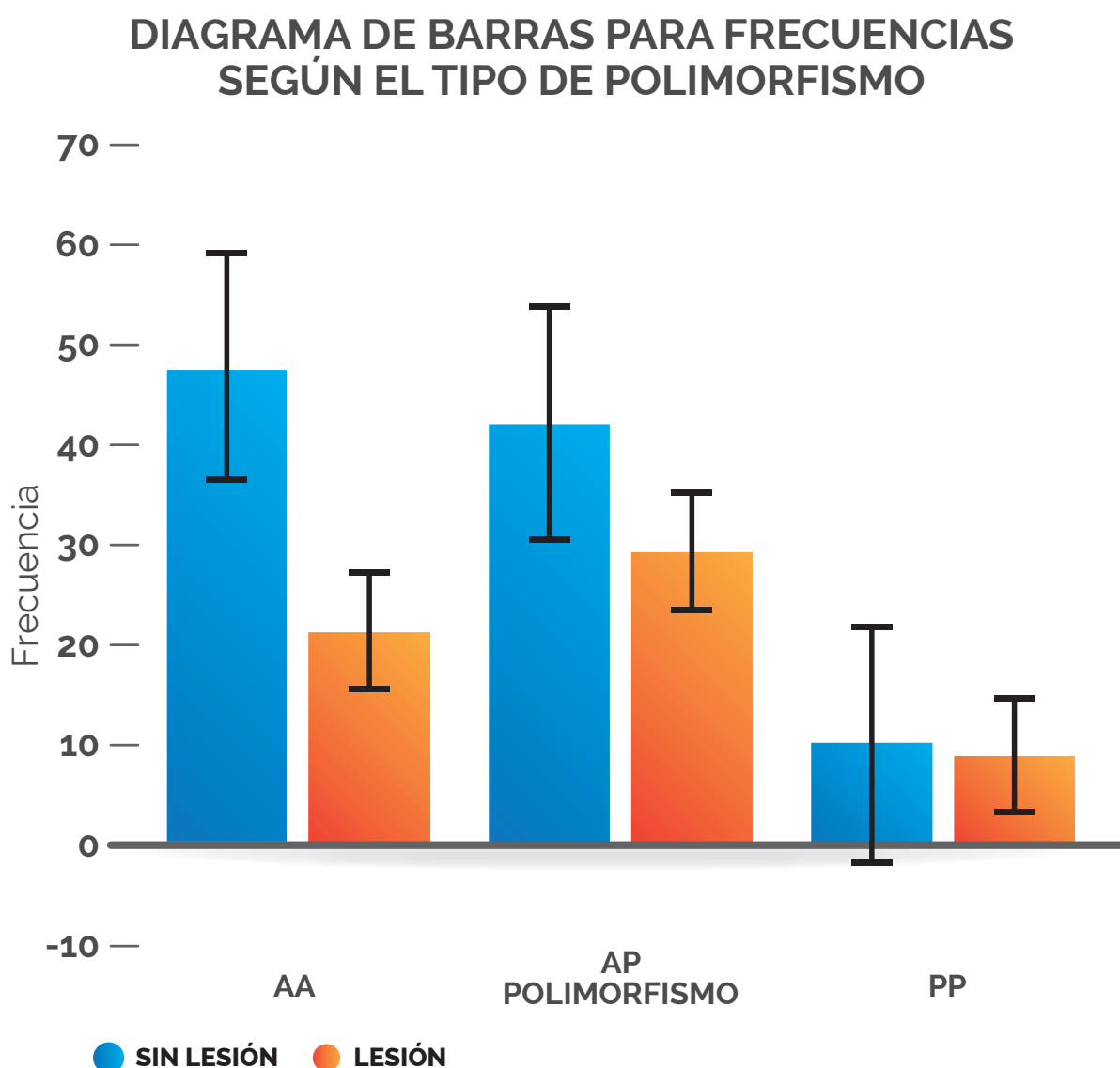


Análisis estadístico

El análisis estadístico no evidenció una asociación significativa entre poseer el alelo Arg/Arg y el presentar lesión citológica ($P= 0,2782$, Odds ratio (OR) = 1,4655; intervalo de confianza, CI= 0,839834). La frecuencia de distribución de los distintos alelos es bastante similar entre el grupo con lesión y entre el grupo sin lesión, Figura 22.

FIGURA 22:

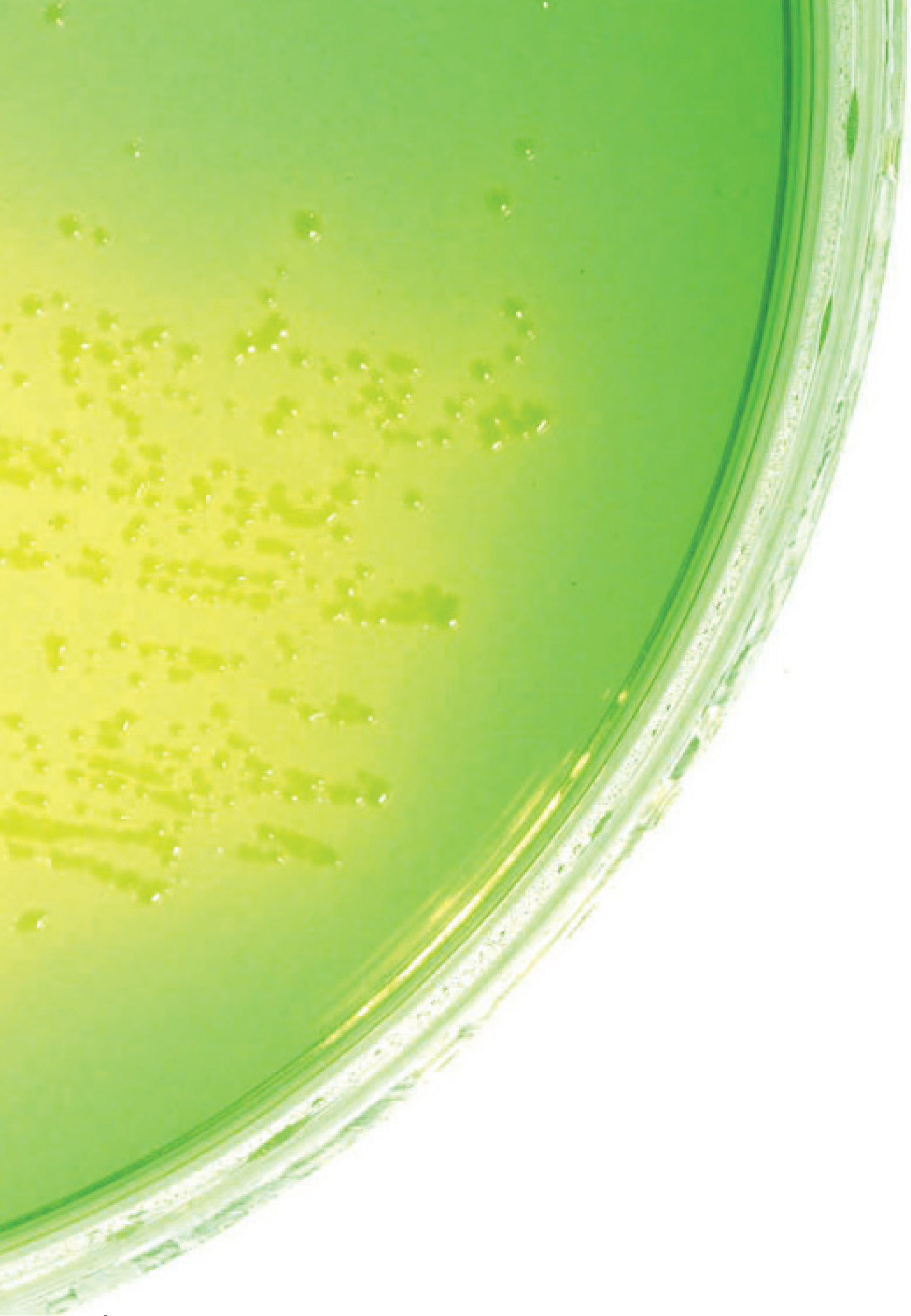
Gráfico de barras que muestra la frecuencia de los polimorfismos según el tipo de polimorfismo para el grupo de pacientes con lesión y el grupo control sin lesión.



DISCUSIÓN

Varios estudios acerca del polimorfismo del gen supresor de tumor p53 y la asociación con carcinomas han sido realizados después del estudio de Storey y colaboradores en 1998, que fue el primer estudio que concluyó que los alelos Arg/Arg podían representar un factor de riesgo para el desarrollo de carcinomas de cérvix (Makni et al., 2000; Rosenthal et al., 1998) y que también se estudiaron en otros carcinomas como cáncer de esófago o cáncer de vejiga donde se observó una diferencia significativa en la detección del alelo Arg/Arg con relación al carcinoma (Makni et al., 2000; Rosenthal et al., 1998). Sin embargo, otros estudios en cáncer de cérvix mostraron carecer de asociación entre el desarrollo de carcinoma y el tipo de alelo (Makni et al., 2000; Rosenthal et al., 1998). Por tanto, la investigación de ésta asociación del polimorfismo de p53 como factor de riesgo oncogénico ha mostrado resultados controversiales. En el presente trabajo, se examinó la frecuencia de polimorfismos del codón 72 de p53 en pacientes que se atendían en dos instituciones de nuestra capital con diferentes grados de citologías, según el resultado del análisis de Papanicolau con respecto a pacientes controles sin lesión, sin poder hallar una diferencia significativa para la asociación de la presencia de lesión y el alelo hallado. Nuestros hallazgos muestran datos similares entre el grupo control y entre el grupo con lesión, también se observó que la frecuencia del alelo Arg/Arg fue mayor al 50% en pacientes sin lesión, mayor a la del alelo Pro, lo que estaría en concordancia con el estudio de Beckman y colaboradores que reporta un aumento de frecuencias del alelo Arg en las regiones más alejadas de la línea del ecuador (Beckman et al., 1994).

Una posible consecuencia de nuestros resultados podría deberse también a la población estudiada, ya que los pacientes estudiados tenían lesiones precancerosas y presentaban mayoritariamente lesiones intraepiteliales de bajo grado, las frecuencias y la estadística podrían variar en el caso de incluir un número mayor de lesiones intraepiteliales de alto grado, como ocurre en el trabajo de Burroni y colaboradores (2013), donde los resultados presentados allí muestran un aumento del alelo Arg en las HSIL comparado con los controles.



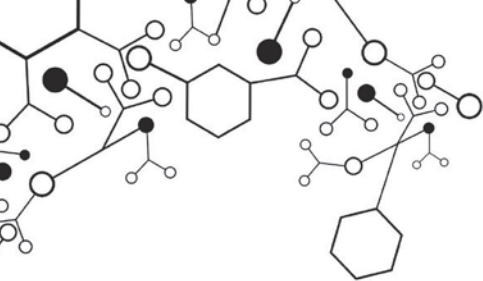


Capítulo 3

En este capítulo revisaremos dos posibles marcadores oncogénicos, la carga viral elevada de VPH presente en la muestra, en el caso de muestras positivas para genotipo 16 y la expresión del ARN mensajero de las oncoproteínas E6 y E7 de este genotipo.

CARGA VIRAL

Recientemente, varios estudios mostraron que cargas elevadas en infecciones producidas por un VPH-AR, aumentaría la probabilidad de progresión de una lesión intraepitelial de bajo grado a una de alto grado y a un probable cáncer invasor, debido a que una elevada carga viral implica una replicación viral muy activa que puede soportar la persistencia viral (Biedermann et al., 2004; Broccolo et al., 2009; Hesselink et al., 2009; Saunier et al., 2008). Otros estudios de pacientes en seguimiento, que presentaban lesiones y que eran positivos para varios VPH-AR, mostraron que solo para VPH 16 se hallaron valores aumentados de carga viral asociados con lesiones intraepiteliales (Hesselink et al., 2009). También es de notar que en lesiones intraepiteliales de bajo riesgo, LSIL, generalmente, las cargas virales de VPH son menores que en las lesiones de alto riesgo, HSIL (Sherman et al., 2002). Sin embargo, otros trabajos concluyeron, que no posee utilidad clínica, que la relación entre la carga viral y la progresión de las lesiones es variable dependiendo de las valoraciones de dicha carga y de la técnica empleada (Cheung et al., 2009; Cheung et al., 2008; Kristensen et al., 1996).



EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES DE E6 Y E7

Otro de los probables biomarcadores de la progresión a la malignidad, es la expresión desregulada de las oncoproteínas E6 y E7, por lo que la detección y cuantificación de los ARN mensajeros de e6 y e7 podrían estar asociadas a un aumento en el riesgo de progresión a malignidad. Varios estudios han mostrado que la expresión de las oncoproteínas se correlaciona con el aumento en la severidad de la lesión, es así que se reportaron valores menores al 20% en pacientes sin lesión o malignidad, NILM, cerca de 60% en pacientes con LSIL, mientras que la cuantificación de ARN mensajero de estas oncoproteínas en pacientes con HSIL fueron cercanas al 90% (Cattani et al., 2009a; Cattani et al., 2009b; Pierry et al., 2012).

El objetivo planteado en éste capítulo pretende responder ambas interrogantes para la población en estudio. Por un lado, si la carga viral elevada está asociada con la severidad de la lesión y por otro, si el aumento en la expresión de los oncogenes está asociada a la progresión a carcinomas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Población estudiada

Para cumplir con el objetivo de determinación de la carga viral, se utilizaron dos grupos de pacientes, aquellas pacientes que concurren para su asistencia en las policlínicas barriales de la Intendencia de Montevideo (IM) y las pacientes viviendo con VIH que se atienden en el Servicio de Enfermedades Infecto-contagiosas del Hospital Pasteur (SEIC-HP) en Montevideo (Capítulo 1). De ambos grupos se seleccionaron muestras positivas para la detección de genoma de VPH 16 (Capítulo 1). Fueron procesadas 30 muestras de pacientes de la IM: 3 negativas para lesión intraepitelial o malignidad, NILM; 3 con células de significado atípico, ASCUS; 13 diagnosticadas con lesión intraepitelial de bajo grado, LSIL; 6 con lesión intraepitelial de alto grado HSIL y 12 sin dato citológico, SD (Solomon et al., 2002). En el grupo de las pacientes del SEIC-HP, se incluyeron todos los positivos, 11 muestras VPH 16 positivas, todas NILM, de éstas 11, cuatro muestras son de primera y segunda toma del mismo paciente con un intervalo de 6 meses.

Para la determinación de la expresión de ARN mensajero de e6 y e7 solo se utilizó el grupo de muestras de pacientes del SEIC-HP, de las muestras de la IM, no tenemos muestra de respaldo.

Línea celular SiHa

Se desarrolló el cultivo de la línea celular con genoma de VPH 16 integrado, SiHa (ATCC® HTB-35™), para su uso como controles positivos para las técnicas moleculares: para obtener el inserto viral para clonar y para poner a punto la técnica de PCR en tiempo real; y como segunda estrategia para la obtención de una curva estándar. Las mismas fueron repicadas en MEM (GE Healthcare) al que se le agregó una mezcla de antibiótico-antimicrobico, Penicilin-Streptomycin-Amphotericin mixture (PAN Biotech) y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Biologos Inc.) El medio se cambió tres veces durante la semana de crecimiento celular, se realizó un pasaje a 3 botellas de 175 cm², una vez crecidas las células, cuando forman una monocapa confluyente, se tripsinizan, centrifugan y el pellet obtenido se resuspende en 250 µL de PBS estéril para extraer luego el ADN.

Vector de clonación

Vector pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific): es un vector de clonación lineal, acepta insertos desde 6 pares de bases a 10 kb, especialmente diseñado para la clonación de productos de PCR, el extremo 5' del sitio de clonado contiene grupos fosforilo por lo que no se necesita la fosforilación de los primers. Además contiene el promotor lac, orígenes de replicación de *E. coli*, por lo que puede ser transformado directamente con el producto de ligación por cualquier cepa de *E. coli*. La re-circularización sin la inserción expresa una enzima de restricción letal luego de la transformación, por lo que los vectores sin inserto no se propagan. Como resultado, solo los recombinantes formaran colonias, lo que evita técnicas de selección extras.

Células competentes

DH5 α [™] (Thermo Fisher Scientific): son una cepa de células *E. coli* competentes con una eficiencia de transformación mayor al 1×10^6 ufc/ μ g de plásmido, tienen recA1 que asegura la estabilidad del inserto lo que incrementa la producción de recombinantes y endA1 que mejora la calidad del plásmido preparado con minipreps. El genotipo de las cepas es F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U16g recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -.

Métodos

Extracción de ácidos nucleicos

Extracción de ADN de las muestras cervicales

El ADN total presente en la muestra fue extraído dependiendo del grupo estudiado:

- **Pacientes de la IM:** Extracción por el método de Fenol-Cloroformo-Isoamílico, ver Capítulo 1.
- **Pacientes del SEIC-HP:** Extracción utilizando un kit comercial, ver Capítulo 1.

Extracción de ARN

El ARN total presente en la muestra fue extraído según indicaciones del fabricante, kit para extracción de ARN, RNeasy Mini Kit, QIAGEN.

Para cumplir con los objetivos planteados de cuantificación de carga viral y expresión ARN mensajero de las muestras de concentración desconocida, se realizaron diferentes pruebas de condiciones. Se tomo como condición óptima, aquella que con la misma muestra de partida se obtuvo un valor de Ct menor. Se utilizaron dos volúmenes diferentes de buffer RLT; 350 μ L y 600 μ L (estos volúmenes dependen de la cantidad de muestra de partida, probamos distintas concentraciones de células puras y diluidas en ambos volúmenes del buffer). También se testeó el agregado de β -mercaptoetanol para eliminar las posibles RNasas y de DNasa I para la optimización de los extractos de ARN. Tabla 8.

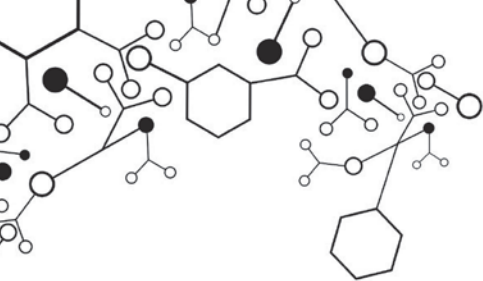


TABLA 8:

Esquema de condiciones utilizadas para la estandarización de la extracción de ARN.

Condición	1	2	3	4	5	6	7	8
Volumen de RTL (μL)	350	600	350	600	350	600	350	600
β-mercaptoetanol			✓	✓			✓	✓
DNasa I	✓	✓	✓	✓				

Extracción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico presente en las muestras de bacterias crecidas en medio líquido fue extraído según indicaciones del fabricante con el kit de extracción de plásmidos, GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). Se realizó un cambio; el ADN fue eluido en 50 μL de agua ultra pura libre de RNasas y DNasas.

Obtención de fragmentos de e6, e7 y β-Actina

Amplificación de los fragmentos de e6, e7 y β-actina por PCR convencional

Se utilizó ADN extraído de la línea celular SiHa para la amplificación, con cebadores específicos (Tabla 9), de un fragmento de e6, e7 y β-actina para su utilización como inserto en la técnica de clonado.

La reacción se realizó en tubos por separado para e6, e7 y β-actina en un volumen final de 20μL. Las concentraciones finales de los reactivos fueron: Buffer 1.25X, 1.875mM de MgCl₂, 0.25mM de dNTPs, 0.2μM de cada cebador e6 y e7 F y R, 0.075μM y 0.03μM β-actina F y R y 0.025U/μL de Taq Patinum ADN polimersa (Invitrogen). Los tubos fueron cargados de la siguiente manera: 18μL de mix de PCR, 2μL de ADN extraído o 2μL de agua pura para molecular libre de DNasas y RNasas para el control negativo. La amplificación se realizó mediante el siguiente ciclado: desnaturalización inicial a 95°C, 10 minutos; 35 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión: 95°C, 15 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de la técnica de PCR son visualizados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con un intercalante no tóxico GelRed (Oler up SSP), exponiéndolos a radiación UV.

TABLA 9:

Cebadores y sondas utilizadas en las reacciones de PCR convencional y tiempo final.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Posición en el genoma*	Longitud del fragmento amplificado	Artículo
e6 F	CACCAAAAGAGAACTGCAATGTTT	86-109	79 pb	(Wong et al., 2010)
e6 R	TTTGCAGCTCTGTGCATAACTGT	142-164	79 pb	(Wong et al., 2010)
e6 P	FAM-ACCCACAGGAGCGAC-MGB-NFQ	114-28		(Wong et al., 2010)
e7 F	CCGGACAGAGCCCATTACAAT	700-720	82 pb	(Lamarcq et al., 2002)
e7 R	ACGTGTGTGCTTTGTACGCAC	762-781	82 pb	(Lamarcq et al., 2002)
e7 P	FAM-TGTTGCAAGTGTG ACTCTACGCTTCGGT-TAMRA	732-760		(Lamarcq et al., 2002)
Comercial	β-Actina F, β-Actina R y β-Actina P	Cat 401846		Taqman, Life Technologies

*La posición del genoma se determinó en referencia a K0827.

Métodos post-amplificación

Los métodos de electroforesis y visualización de geles se detallan en el Capítulo 1, apartado Electroforesis en geles de agarosa.

El método utilizado para el cortado de bandas y la extracción de ADN de los geles de agarosa fue realizado como se describió anteriormente (Ramas et al., 2016).

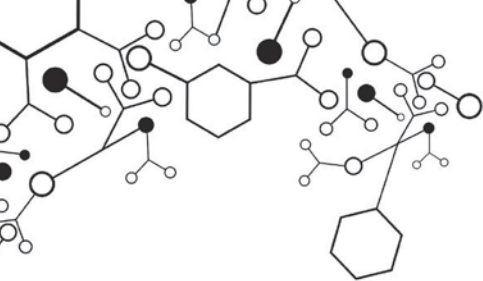
Los productos fueron medidos en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), para su posterior uso en la técnica de clonación.

Medidas:

[e6]: 9.6ng/μL, relación 260/280: 2.03

[e7]: 15.3ng/μL, relación 260/280: 2.2

[β-actinal]: 15.3ng/μL, relación 260/280: 2.03



Clonación

Producción de extremos romos

Los productos obtenidos de la purificación de ADN desde geles para e6, e7 y β -actina contienen una región de poli-A en el extremo 3', generada por Taq polimerasas que carecen de buena fidelidad, por lo que antes de la reacción de ligación, fueron tratados con una enzima que remueve la poli-A dejando el producto de PCR con extremos romos.

Para cada fragmento de gen, se realizaron reacciones separadas, utilizando el kit comercial CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), según indicaciones del comerciante. Se usó 1 μ L de ADN purificado para los fragmentos de e6 y 0.8 μ L de ADN purificado para β -actina; y e7, éstos volúmenes son de acuerdo con las mediciones obtenidas de las concentraciones de productos purificados, anteriormente mencionadas.

Ligación

Para la reacción de ligación, se utilizó el vector pJET 1.2, del kit comercial CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), y se siguieron las recomendaciones ofrecidas por el fabricante, para cada fragmento, e6, e7 y β -actina.

Transformación

A continuación, con 2.5 μ L de cada uno de los productos de ligación, se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α [™] (Thermo Fisher Scientific), según indicaciones del fabricante.

Se prepararon placas con 30 mL de LB agar autoclavado (5 gramos de triptona, 2.5 gramos de levadura, 5 gramos de NaCl, 7.5 gramos de agar en 500 mL de agua destilada) y 30 μ L de Ampicilina 100 μ g/mL. Se plaquearon 100 μ L de producto clonado y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Crecimiento de las bacterias transformadas

Se observaron las colonias crecidas, se eligieron aquellas de tamaño y forma adecuada, sin satélites y no cercanas a los bordes. Se seleccionaron y picaron en mechero y las colonias picadas crecieron en 3 mL de LB líquido con Ampicilina 100 μ g/mL. Se incubaron a 37°C en agitación a 250 rpm durante toda la noche. A continuación, se observaron los tubos, se vieron turbios por lo que había crecimiento y se continuó la extracción del ADN plasmídico, ver apartado de Extracción de ácido nucleicos.

Medición de concentración por Nanodrop

Los productos fueron medidos en Nanodrop, para su posterior uso en la técnica de clonación.

Medidas:

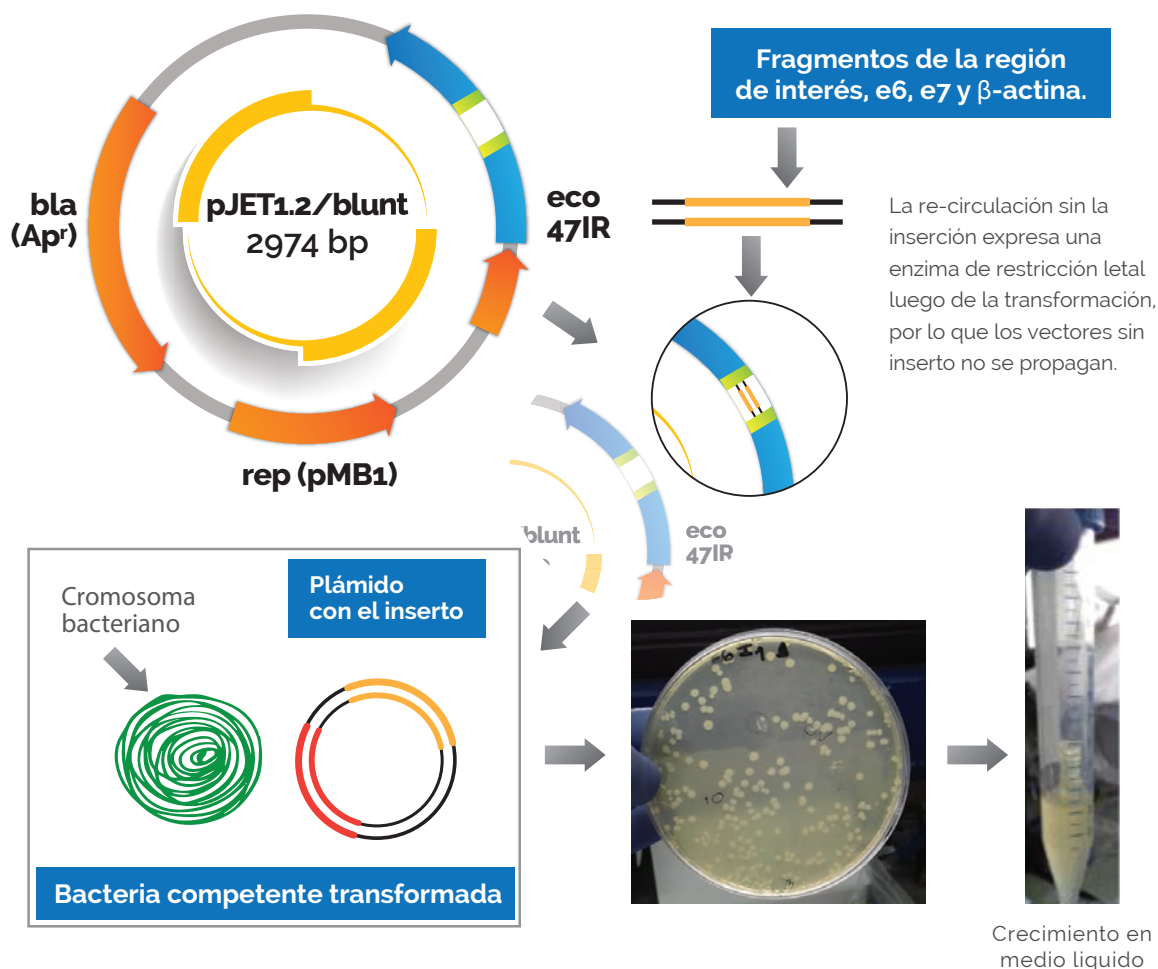
[e6]: 147.8 ng/ μ L, relación 260/280: 1.88

[e7]: 270.2 ng/ μ L, relación 260/280: 1.87

[β -actinal]: 109.5 ng/ μ L, relación 260/280: 1.87

FIGURA 23:

Esquema de la obtención de los plásmidos recombinantes de e6, e7 y β -actina.

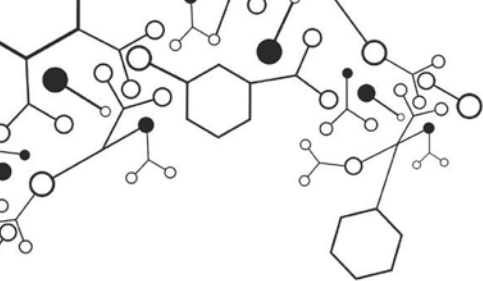


Amplificación por PCR en tiempo real

Estandarización del ensayo de PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real se optimizó y estandarizó para la detección de genoma de VPH, para ello se utilizó la línea celular Siha, un conjunto de cebadores e6 y e7 F y R, que amplifican un fragmento de los oncogenes e6 y e7 y sondas de hidrólisis para la detección de los mismos, e6 y e7 S (Tabla 9).

Para la estandarización del ensayo se probaron 3 diferentes concentraciones de cebadores, según requerimientos de la enzima utilizada desde 50 a 900 nM (150 nM, 300 nM y 750 nM) y sondas desde 50 a 250 nM (100 nM, 200 nM y 250 nM). Para la amplificación de un fragmento de β -actina se utilizó un kit comercial β -actin Control Reagents (Taqman, Life Technologies), que está estandarizado para usar a 300 nM los cebadores y 200 nM la sonda, ésta se utilizó como control interno de las muestras, validando la extracción y calidad del material usado, y para el análisis de datos como gen de expresión constitutiva, para normalizar. Las condiciones de ciclado no se estandarizaron, se utilizaron las condiciones de ciclado que requería la enzima utilizada, Universal Master Mix, (Life Technologies). Todos los ensayos de la técnica de PCR en tiempo real fueron realizados en



el equipo StepOnePlus (Applied Biosystems) de la Unidad de Virología, del Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública. Este equipo emplea el software StepOne™ versión 2.2.2, para el análisis de los datos obtenidos.

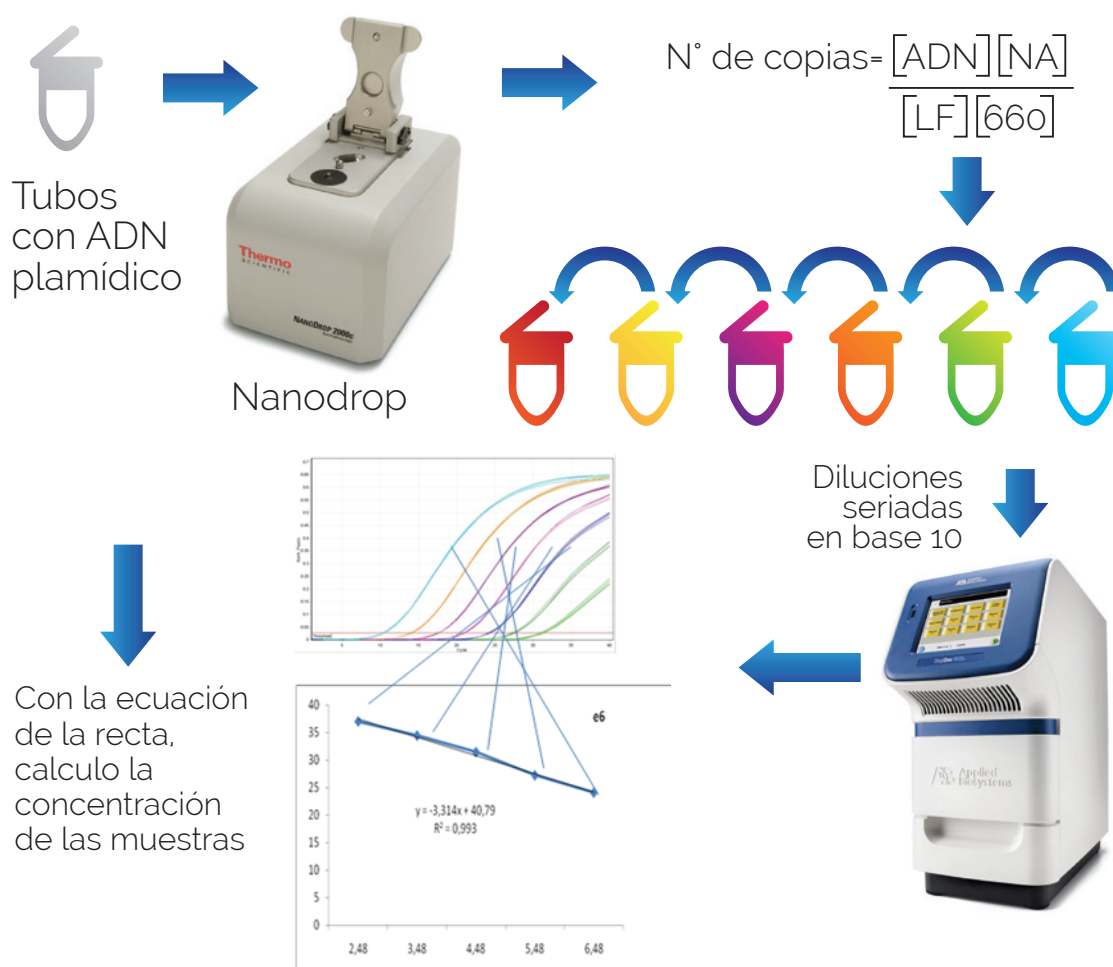
Curva estándar

La metodología de cuantificación absoluta se basa en la generación de una curva estándar, la misma se realiza a partir de diluciones seriadas de ADN o ARN de concentración conocida. Ésta curva representa una relación lineal entre la concentración del ADN o ARN viral y el valor de fluorescencia de cada dilución, éste valor de fluorescencia es expresado como Ct, y corresponde al primer ciclo donde se registra fluorescencia significativa. Para realizar las curvas estándar se produjeron clones plasmídicos con los fragmentos de e6, e7 y β-actina. Figura 24.

En el caso del fragmento e6 no se logró optimizar la técnica, se obtuvieron plásmidos pero la mayoría sin inserto, con concentraciones medidas por Nanodrop bajas y ampli-ficaciones con altos valores de Ct, cuando se realizó la técnica de PCR en tiempo real. Se recurrió a la estrategia utilizada por Payan, 2007, en éste estudio se realiza una curva estándar partiendo de ADN de células Siha de concentración conocida (Payan et al., 2007).

FIGURA 24:

Esquema de la metodología empleada para la generación de las curvas estándar para e6, e7 y β-actina.



Cálculos de concentraciones

Las concentraciones de los plásmidos obtenidos y del ADN de las células Siha, se calculan según la siguiente fórmula:

$$\text{Nº de copias} = \frac{[\text{ADN}][\text{NA}]}{[\text{LF}][660]}$$

ADN: concentración de ADN del producto plasmídico medida con el Nanodrop, expresada en g/μL, NA: número de Avogadro ($6.0^{23} \times 10^{23}$ moléculas), LF: largo del fragmento clonado en pares de bases y 660 es el peso molecular de un desoxinucleótido en g/mol.nt

$$[\text{e6}]: \frac{[147.8 \times 10^{-9}] \times [6.023 \times 10^{23}]}{[79] \times [660]} = 1.698 \times 10^{12} \text{ moléculas}/\mu\text{L}$$

$$[\text{e7}]: \frac{[270.2 \times 10^{-9}] \times [6.023 \times 10^{23}]}{[82] \times [660]} = 3.01 \times 10^{12} \text{ moléculas}/\mu\text{L}$$

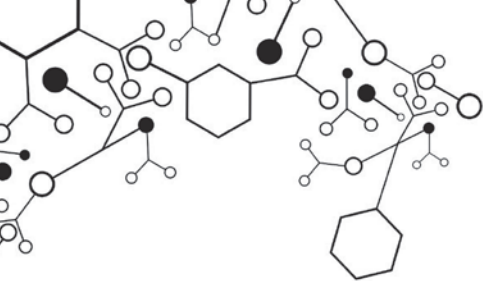
$$[\beta\text{-actinal}]: \frac{[109.5 \times 10^{-9}] \times [6.023 \times 10^{23}]}{[294] \times [660]} = 3.398 \times 10^{12} \text{ moléculas}/\mu\text{L}$$

$$[\text{SiHa}]: \frac{[27.3 \times 10^{-9}] \times [6.023 \times 10^{23}]}{[79] \times [660]} = 3.15 \times 10^{11} \text{ moléculas}/\mu\text{L}$$

Determinación de la Carga Viral

Fueron procesadas por la metodología estandarizada de PCR en tiempo real, 30 muestras provenientes de pacientes de la IM y 10 muestras de pacientes de SEIC-HP, las mismas fueron cuantificadas por ésta técnica por medio del uso de una curva estándar realizada para cada fragmento. Se les efectuó la amplificación del control interno, aquellas muestras negativas para éste fueron descartadas.

La reacción de cuantificación se llevó a cabo en placas por separado para e6, e7 y β-actina. Las concentraciones finales de los cebadores y sondas fueron: 0,75μM de cada cebador e6 y e7 F y R y 0,25μM de cada sonda e6 y e7; para β-actina 0,3μM de cada cebador F y R y 0,2μM de sonda (Tabla 9). Los tubos fueron cargados de la siguiente manera: 18μL de mix de PCR, 2μL de ADN extraído o 2μL de agua pura para biología molecular libre de DNasas y RNasas para el control negativo. La amplificación se realizó mediante el siguiente ciclado: incubación inicial de 2 minutos a 50°C, para el óptimo funcionamiento de la enzima, seguida de desnaturalización inicial a 95°C, 10 minutos; 40 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión: 95°C, 15 segundos; 60°C, 60 segundos. La corrida se lleva a cabo en un equipo de tiempo real, StepOnePlus (Applied Biosystems), los resultados son leídos y analizados en el software de éste equipo.



El análisis de los datos resultantes, linealidad, eficiencias y cálculos de concentración, se realizaron en base a cálculos matemáticos descriptos previamente en la literatura en Excell versión 2007 (Pfaffl, 2001; Rasmussen, 2001).

Cuantificación de ARN mensajero

RETROTRANSCRIPCIÓN

Las reacciones de retrotranscripción para las 10 muestras de SEIC-HP, se realizaron con el kit Super Scrip III (Invitrogen), según indicaciones del fabricante con inhibidor de RNasas 40μM (Invitrogen). Se utilizaron hexámeros randómicos (Invitrogen) y 5μL de ARN extraído en el caso de las muestras y control positivo y agua (pura para análisis moleculares) para el control negativo.

PCR EN TIEMPO REAL

Igual que en el apartado anterior.

RESULTADOS

OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL

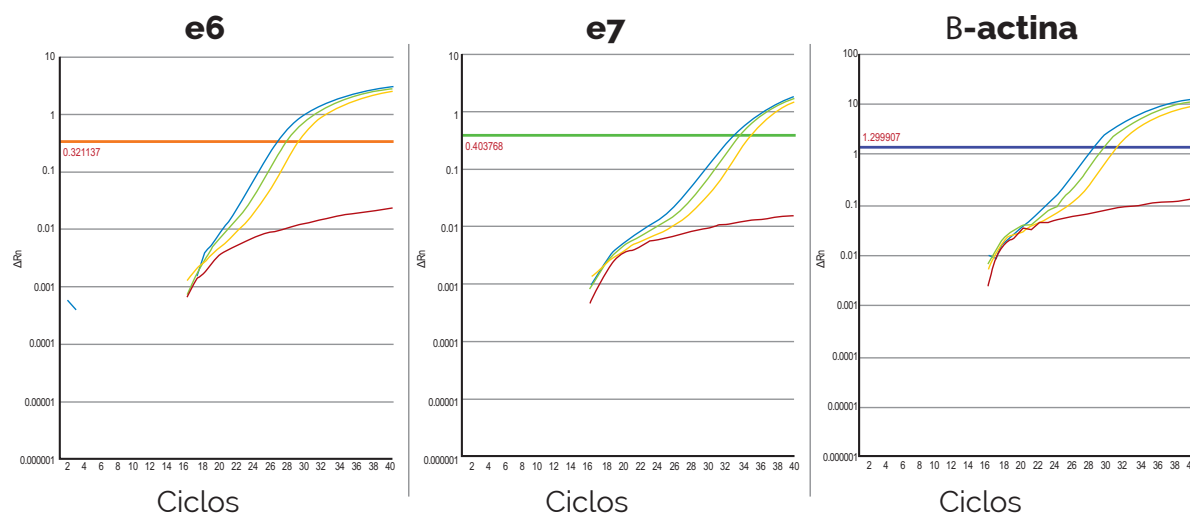
Se estandarizó la técnica de PCR en tiempo real que detecta y cuantifica la carga viral y la expresión de los oncogenes e6 y e7 del VPH 16. Son dos ensayos distintos uno para cuantificación de carga viral y otro para expresión de ARN mensajeros de e6 y e7, pero ambos se realizan en 3 reacciones diferentes una para el gen e6, otra para el gen e7 y otra para el gen de la β-actina (control interno de la calidad de la muestra).

Para realizar la estandarización de ambos ensayos (carga viral y expresión de ARN mensajeros) se utilizó ADN o ARN extraído de la línea celular Siha y controles negativos.

Primero, se determinaron las concentraciones de cebadores y sondas óptimas para los ensayos, estas fueron las obtenidas con el menor valor de ciclo umbral partiendo de la misma concentración de ADN, misma muestra de Siha, las mismas fueron 75nM para los cebadores y 25nM para las sondas para la detección de e6 y e7.

FIGURA 25:

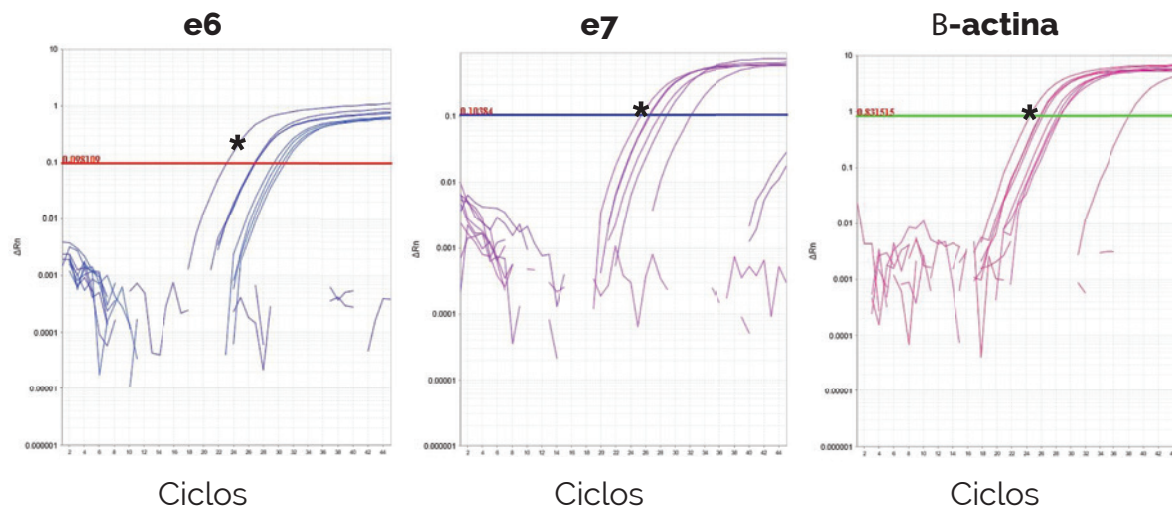
Muestra las curvas obtenidas en la técnica de PCR en tiempo real con diferentes mezclas de reacción que tenían distintas concentraciones de sondas y cebadores para obtener las óptimas. La curva celeste proviene de la mezcla 1, curva verde mezcla 2 y curva amarilla mezcla 3. Mezcla 1: 750nM concentración de cebadores, 250nM concentración de sonda; mezcla 2: 300nM concentración de cebadores, 200nM concentración de sonda y mezcla 3: 150nM concentración de cebadores, 100nM concentración de sonda.

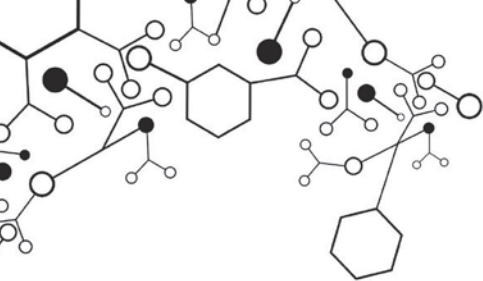


En cuanto a la extracción del ARN de Siha se utilizaron varias condiciones propuestas por el kit comercial usado (ver métodos, extracción ARN), las pruebas en tiempo real mostraron que la mejor condición resultó para la extracción de Siha con 600μL de buffer RLT, 10μL de β-mercaptoetanol, sin el agregado de DNasa I (condición 8) y eluido en 40μL de agua ultra pura libre de RNasas y DNasas (volumen promedio del rango que plantea el fabricante). De ésta forma se realizó la extracción de ARN de las muestras problema. Tabla 8

FIGURA 26:

Curvas obtenidas con las distintas condiciones de extractos de ARN de Siha. La condición 8 resultó ser la óptima, y se marca con una estrella en cada gráfico.





CURVAS ESTÁNDAR e6, e7 Y β -ACTINA

Por medio de la técnica de PCR convencional, posterior visualización de los fragmentos en gel y extracción del ADN del gel (Métodos), obtuvimos los insertos de e6, e7 y β -actina. Estos fueron clonados, cada uno en un vector plasmídico pJET 1.2/blunt y los plásmidos recombinantes obtenidos fueron transformados en bacterias *E. coli* competentes y crecidos en medio líquido para aumentar su concentración, Figura 23. Fueron obtenidos así plásmidos recombinantes de e7 y β -actina, para e6 se utilizó ADN extraído de células Siha, como se explicó anteriormente.

Las curvas estándar para e7 y β -actina mostraron un rango dinámico lineal de 30 a 300.000.000 copias de ADN por reacción, para e6, la curva mostró un rango dinámico de 30 a 3.000.000 copias de ADN de células Siha por reacción, en éstos rangos los protocolos se comportan en forma cuantitativa. Figura 27.

Los valores de Eficiencia en porcentaje para e6, e7 y β -actina fueron: 100.3%, 97% y 97%, respectivamente, los valores del coeficiente de determinación, R^2 , para las curvas estándar fue: 0.993, 0.994 y 0.97, para e6, e7 y β -actina. Tabla 10.

FIGURA 27:

Curvas estándar de e6, e7 y β -actina, para realizar la curva se promediaron los valores de C_t , para su correspondiente valor de concentración, aquí expresado como logaritmo de la concentración de copias de ADN por reacción.

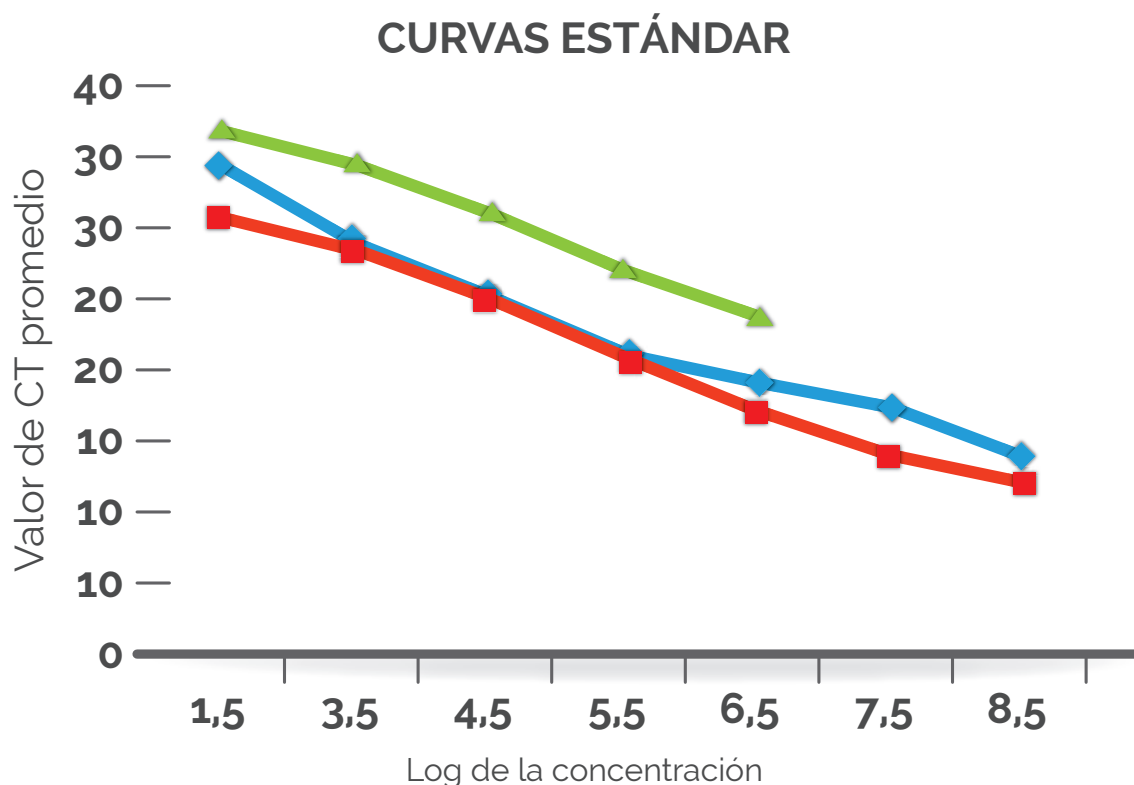


TABLA 10:

Muestra los valores de la función de la recta, los R² y las Eficiencias para cada gen.

GEN	FUNCIÓN DE LA RECTA	E(%)
E7 	$Y = -3,3951x + 38,288$ $R^2 = 0,9937$	97%
E6 	$Y = -3,3146x + 40,791$ $R^2 = 0,993$	100.3%
BA 	$Y = -3,3889x + 36,366$ $R^2 = 0,9668$	97%

DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL Y DETECCIÓN DE ARN MENSAJEROS DE e6 Y e7

Se analizaron por la metodología de cuantificación absoluta por PCR en tiempo real 30 muestras provenientes de pacientes de la IM y 8 pacientes de SEIC-HP, dos de ellos con primera y segunda toma positiva para VPH 16. Tabla 11, Tabla 12. Figura 28.

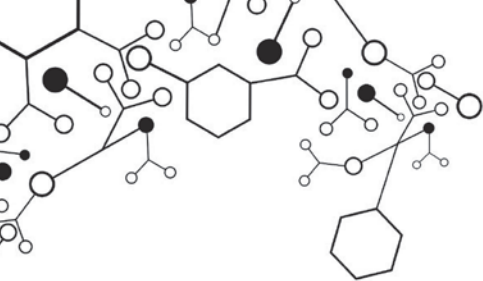


TABLA 11:

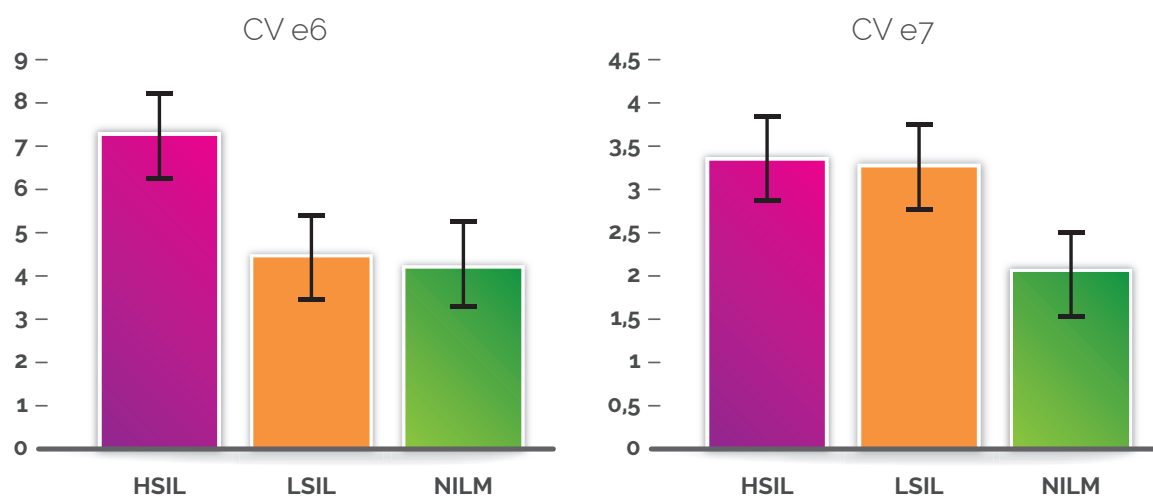
Muestras, clases citológicas, Ct promedios y concentraciones calculadas (cp/μL) para ambos genes e6 y e7 de las pacientes de la IM

Muestra	Lesión	Ct promedio e6	[e6] calculada	Ct promedio e7	[e7] calculada
9 2908	ASCUS	35.3329449	1.64667083	32.7176762	1.64066166
20 8308	ASCUS	39.4032593	0.41867517	20.8717365	5.12971895
13 3309	ASCUS	No determinado	No determinado	19.4714584	5.54215145
20 1909	HSIL	16.8182888	7.23245978	22.2565804	4.7218324
18 3109	HSIL	19.8175497	6.32759618	37.8911743	0.1168795
15 5109	HSIL	21.4323483	5.84041868	33.587574	1.38444531
13 3208	HSIL	26.8265009	4.21302694	27.1445045	3.28216209
13 3109	HSIL	37.2923355	1.05553143	21.7566376	4.86908361
1 4608	HSIL	32.3916874	2.53403506	37.2983322	0.29149293
7 2908	LSIL	37.6847992	0.93712689	27.0837746	3.30004927
5 5808	LSIL	17.9371729	6.89489746	39.0751762	-0.2318518
4 35 08	LSIL	32.2633324	2.5727592	20.1903601	5.33040894
3 4008	LSIL	21.1456709	5.92690796	21.1635046	5.04378271
3 3208	LSIL	37.6847878	0.93713035	26.2324114	3.55080649
2 2908	LSIL	33.9509773	2.06360426	34.0852699	1.23785588
2 1208	LSIL	17.5025129	7.02603242	23.6447668	4.31296132
13 2908	LSIL	17.481514	7.03236771	23.9205189	4.23174238
12 5109	LSIL	24.3170052	4.97013059	23.9614344	4.21969129
12 3208	LSIL	37.6374588	0.95140928	35.5523567	0.8057458
10 5809	LSIL	17.5029306	7.0259064	27.1234465	3.28836446
10 58 08	LSIL	No determinado	No determinado	33.6782074	1.3577505

Muestra	Lesión	Ct promedio e6	[e6] calculada	Ct promedio e7	[e7] calculada
10 2908	LSIL	17,9829693	6,88108089	24,4793348	4,06715088
7 3309	NILM	29,5176582	3,40111681	37,3462276	0,27738599
5 3508	NILM	No determinado	No determinado	30,857749	2,18847742
10 8807	NILM	23,9137859	5,09178002	27,4716835	3,18579607
7 4308	SD	25,807971	4,52031286	No determinado	No determinado
6 6910	SD	23,3294525	5,2680708	No determinado	No determinado
6 5808	SD	33,8131409	2,1051889	No determinado	No determinado
6 1209	SD	24,7755308	4,83179545	32,5960655	1,67648039
5 1209	SD	17,7951145	6,93775583	No determinado	No determinado

FIGURA 28:

Los gráficos muestran las concentraciones promedio para los distintos tipos de lesión, LSIL y HSIL, con respecto al grupo sin lesión, NILM, para el gen e6, gráfico de la izquierda, y para el gen e7, gráfico de la derecha.



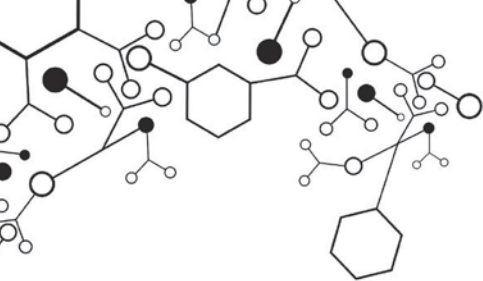


TABLA 12:

A) Resultados de Carga Viral, se discriminan las muestras, clases citológicas, Ct promedios y concentraciones calculadas para ambos genes e6 y e7 de las muestras de pacientes del SEIC-HP. B) Resultados de la Expresión de ARN mensajero de e6 y e7 para las muestras de pacientes del SEIC-HP. Se detallan, denominación de muestra, clase citológica, Ct promedio y concentraciones calculadas para ambos genes.

	Muestra	Lesión	Ct promedio e6	[e6] calculada	Ct promedio e7	[e7] calculada
A	M 9 2	NILM	17,4447384	7,04346274	20,101141	5,35679627
	M 9 1	NILM	20,037962	6,26109879	23,5793362	4,33232124
	M 70 1	NILM	38,4717522	0,6997067	No determinado	No determinado
	M 65 1	NILM	25,8548088	4,5061821	31,114645	2,11285529
	M 49 1	NILM	26,583334	4,28638932	31,5851975	1,97425777
	M 30 1	NILM	21,7536602	5,7434803	25,1689949	3,86409976
	M 24 2	NILM	21,9698639	5,67825261	24,4973946	4,06191436
	M 24 1	NILM	20,9622669	5,98224011	24,1048183	4,1775446
	M 22 1	NILM	32,6687698	2,45044052	38,4848442	-0,0579789
	M 1 2	NILM	25,1595459	4,71593981	29,1376782	2,69515533
	Muestra	Lesión	Ct promedio e6	[e6] calculada	Ct promedio e7	[e7] calculada
B	M 9 2	NILM	18,5674483	6,70474618	26,8839728	2,44929301
	M 9 1	NILM	20,584912	6,09608641	23,4410267	3,72853285
	M 70 1	NILM	35,7547353	1,51941854	39,4424477	-2,2168565
	M 65 1	NILM	25,1576742	4,71650451	28,040905	2,01943041
	M 49 1	NILM	24,6118902	4,8811651	28,5210406	1,84103418
	M 30 1	NILM	23,3069121	5,27487115	28,8642438	1,71351571
	M 24 2	NILM	22,4868253	5,52228766	29,0123711	1,65847846
	M 24 1	NILM	20,7523416	6,04557365	24,5941385	3,30008975
	M 22 1	NILM	29,9194552	3,27989646	33,0497417	0,15837789
	M 1 2	NILM	27,1322651	4,12077925	30,4712054	1,11644297

DISCUSIÓN

Hasta el momento consideramos que éste estudio es el primer reporte que describe una técnica de PCR en tiempo real optimizada en el laboratorio, en nuestro país, que puede utilizarse para la detección del genotipo 16, como PCR de cribado. Se optimizaron curvas estándares para los diferentes genes analizados, éstas son las herramientas necesarias para la cuantificación absoluta de muestras problema, por lo que además de detectar, se cuantifica la carga viral de VPH 16 presente en las muestras. Se logró determinar las cargas virales de las muestras analizadas y los datos revelaron que al comparar las pacientes con lesiones, con las pacientes sin lesión, las cargas virales de éstas últimas resultaron menores a las primeras. Por lo que la determinación de la carga viral podría utilizarse como marcador oncogénico, aunque para apoyar ésta conclusión debería de realizarse un estudio a mayor escala, con un número mayor de muestras, incluir muestras de pacientes diagnosticados con ASCUS y carcinomas, para tener todas las clases citológicas posibles, y realizar un estudio más completo.

El uso del gen de la β -actina fue de suma utilidad como control interno de la muestra, las muestras de pacientes del SEIC-HP, son muestras colectadas entre 06/2012 al 08/2013, con pocos procesos de descongelación-congelación, y con muestra de respaldo, pero las muestras de pacientes de la IM, son muestras colectadas desde el 2007 al 2010, no se tiene muestra de respaldo. Si bien los ADN son estables, sufrieron varios procesos de congelación-descongelación, que pudieron afectar la integridad de las muestras. Empleando el control interno descartamos los falsos negativos de muestras en malas condiciones. También se utilizó para poder comparar los datos obtenidos entre los distintos genes, ya que las eficiencias eran comparables entre genes (Pfaffl, 2001; Rasmussen, 2001).

En cuanto a la expresión de ARN mensajero, varios estudios determinaron que la expresión de las oncoproteínas se correlaciona con el aumento en la severidad de la lesión (Cattani et al., 2009a; Cattani et al., 2009b; Pierry et al., 2012). En esta tesis se optimiza una retrotranscripción convencional seguida de PCR en tiempo real para determinar los niveles de expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Lamentablemente en el grupo de las pacientes de la IM, que presentaban distintas clases citológicas, carecíamos de muestra de respaldo para realizar la técnica. La propuesta se realizó con las muestras de las pacientes del SEIC-HP, pero no se pudo hacer una valoración de la expresión en función de las clases citológicas porque estas pacientes tenían diagnóstico negativo para lesión.



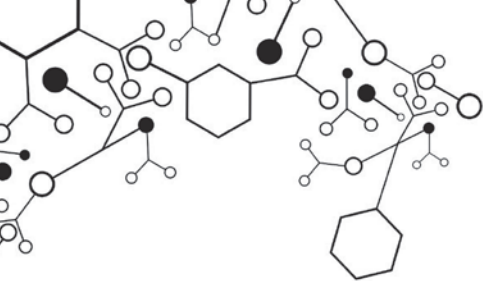


Discusión global, conclusiones y perspectivas

DISCUSIÓN GENERAL

Este es el primer estudio en nuestro país que describe los genotipos de VPH circulantes en muestras de cepillados de cuello uterino de población general y de pacientes viviendo con VIH, la frecuencia de los mismos, las variantes del genotipo VPH 16, el más frecuente en esas poblaciones, y analiza el uso de tres posibles marcadores oncogénicos: polimorfismo del gen supresor de tumor p53, carga viral de VPH genotipo 16 y expresión de los ARN mensajeros de los oncogenes e6 y e7.

La frecuencia obtenida de los genotipos de VPH en las células cervicales exfoliadas recogidas de mujeres uruguayas según el diagnóstico cito-histológico en población general y en pacientes viviendo con VIH, fueron de 41,9% (incluyendo muestras con distintos grados de lesiones intraepiteliales pre-cancerosas) y 32%, respectivamente. Es importante notar que tanto la frecuencia como el genotipo pueden variar según el tipo de lesión diagnosticada, así, a mayor severidad de lesión mayor porcentaje de detección, por tanto el grupo de pacientes viviendo con VIH podría haber mostrado una frecuencia general mayor (Clifford et al., 2005). Sin embargo, aunque parezcan similares las frecuencias de la detección de VPH, cuando comparamos los porcentajes de pacientes sin lesión, en ambas poblaciones, vemos que en población general es de 18,5% y en pacientes viviendo con VIH del 32%, lo que condice con la literatura, que establece que para personas viviendo con VIH la frecuencia de detección de VPH es de 2 a 5 veces mayor que en población general (Jamieson et al., 2002; Palefsky et al., 1999; Sun et al., 1997). Para ambos grupos, la mayoría de los genotipos de VPH-AR detectados en este trabajo, se asocian frecuentemente con el cáncer cervical invasivo en todo el mundo (Clifford et al., 2005) y su frecuencia relativa es comparable con los



resultados reportados de otros países de América Latina (Ferreccio et al., 2004; Gonçalves et al., 1999; Paesi et al., 2009). En cuanto a los VPH-BR, los detectados más frecuentemente fueron el VPH genotipo 6 y el VPH genotipo 61, tanto en infección simple como en múltiple, siendo los más prevalentes a nivel mundial en población general los VPH genotipos 6 y 11 (Broker et al., 2001). Una diferencia entre estos grupos estudiados radica en las frecuencias de los genotipos detectadas, si bien el VPH genotipo 16 es el más detectado en ambas poblaciones (28.6% en población general y 18.6% en pacientes viviendo con VIH), en población general se encuentra seguido de los VPH genotipos 58 y 68, pero en personas viviendo con VIH, lo sigue el VPH genotipo 31, lo mismo que fue reportado en estudios en Brasil (Rocha-Brischiliari et al., 2014). Ambos grupos fueron testados en un principio por la técnica de PCR con cebadores degenerados seguida de RFLP para la detección e identificación de los genotipos presentes en la muestra. En población general el porcentaje de muestras que fueron detectadas como positivas para VPH y no pudieron ser genotipificadas fue mayor al 50%, reduciéndose éste número a 31.9% con la técnica de PCR-RLB. En las pacientes sin lesión, el 9.9% de las muestras no pudieron ser genotipificadas por ambas técnicas, a diferencia de lo que ocurre en personas viviendo con VIH sin lesión, donde éste porcentaje fue del 2.2% por la técnica de PCR-RFLP. Estos resultados muestran por un lado que la técnica de PCR-RLB es más sensible y específica que la técnica de PCR-RFLP, y además se condicen con que los pacientes VIH tienen cargas virales de VPH más elevadas que los pacientes de población general (Grabowski et al., 2014).

En pacientes viviendo con VIH hay un aumento en la prevalencia de infecciones múltiples, en nuestro estudio de población general usando la técnica de PCR-RFLP, no se detectaron infecciones múltiples, mientras que con la misma técnica se obtuvo un 15.6% en pacientes viviendo con VIH. A pesar de que aún está en debate, se sugiere que las infecciones múltiples podrían ser un factor de riesgo para la progresión de las lesiones a la malignidad, particularmente en lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) (Clifford et al., 2005). En nuestro estudio y en concordancia con resultados de trabajos realizados en población infectada con VPH viviendo con VIH en Brasil, las muestras positivas para la detección de genoma de VPH analizadas presentaron un porcentaje de infecciones múltiples cercano al 50%, 48.9% en nuestro estudio y 41.2% en Brasil (Gonçalves et al., 2008).

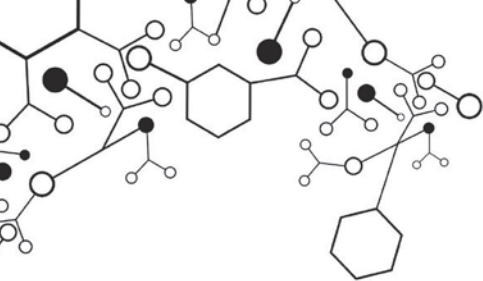
El VPH genotipo 16 es el responsable de más del 50% de los carcinomas de cuello de útero en todo el mundo (Munoz et al., 2003). Uno de los primeros estudios de análisis de variantes del VPH genotipo 16 mostró que las mismas se diferenciaban de acuerdo al área geográfica donde pertenecían las muestras y fueron agrupadas en 5 ramas según su relación filogenética: Europeas (E), Asiáticas (As), Africanas tipo 1 y 2 (Af 1 y 2) y Asiático-Americanas (AA). Se observó una diferencia de oncogenicidad en éstas variantes, siendo las E, las menos severas. Cualquier mutación en la región de control o en los oncogenes, pueden inducir cambios en las funciones biológicas de las oncoproteínas, como desregulación de su expresión, causando un mayor riesgo de progresión, lo que jerarquiza la importancia de éste tipo de estudio (Casas et al., 1999; Wheeler et al., 1997; Yamada et al., 1997). En el presente trabajo se analizaron 47 secuencias de pacientes de población general y 11 de pacientes viviendo con VIH para la región LCR del genoma viral de VPH genotipo 16 detectados en ambos grupos. En éstas secuencias se observaron transversiones y transiciones, coincidiendo muchas de las mutaciones con las re-

portadas en otros estudios de la región (Chen et al., 2005; Gurgel et al., 2015; Mendoza et al., 2013; Pande et al., 2008; Picconi et al., 2003); como por ejemplo: G7521A, C7669T, C7689A, A7729C, T7743G, C7764T, C7786T y G7799A, siendo la más usual con un 71%, la transversión G7521A, en población general. En pacientes viviendo con VIH, al igual que en el grupo anterior, la mutación G7521A es el cambio más frecuentemente hallado en 9 de las 11 secuencias analizadas, seguida por el cambio G7552A, A7507C y T7616G, cada mutación puntual detectada en 2, 1 y 1 secuencia de las 11 analizadas, respectivamente (Badano et al., 2015; Gurgel et al., 2015; Mendoza et al., 2013; Picconi et al., 2003). Las tres primeras mutaciones han sido ampliamente reportadas en la literatura, con la salvedad que la mutación A7507C ha sido reportada como AG en los artículos revisados de la región. La mutación T7616G no ha sido reportada previamente y sería una nueva variante del VPH genotipo 16 dentro de la rama Europea.

En el oncogén e6 se detectaron los siguientes cambios: A131G, G145T, T286A, A289G, C335T y T350G y T387A en las secuencias correspondientes a muestras de población general, y A123G, G176A, T350G y A532G, en las secuencias correspondientes a muestras de pacientes viviendo con VIH. Las mutaciones detectadas en ambos grupos fueron previamente reportadas en la literatura, salvo las mutaciones T387A y A123G, en población general y personas viviendo con VIH, respectivamente, que son variantes nuevas. Además, T350G, resultó la mutación más habitual para éste gen en ambas poblaciones (Chen et al., 2005; Pande et al., 2008; Picconi et al., 2003). En el oncogén e7 se observaron 5 mutaciones puntuales, tres de ellas, descritas previamente: T732C, T789C y T795G (Chen et al., 2005; Pande et al., 2008), en población general, y ninguna mutación en las muestras de pacientes viviendo con VIH, esto podría deberse únicamente a que el número de muestras de este grupo es mucho menor.

Los árboles filogenéticos realizados con secuencias de las tres regiones estudiadas, mostraron una amplia mayoría de variantes Europeas, 90% en población general y 100% en población VIH, pero esta diferencia puede deberse a la menor cantidad de muestras analizadas para la segunda población. En población general también se detectaron 2 secuencias que agrupan con variantes Africanas y 3 de las secuencias analizadas agruparon con variantes Asiático-Americanas obtenidas del GenBank, los porcentajes de las variantes obtenidas se correlacionan con los porcentajes de las distintas etnias en nuestro país (Cabella, 2013; Sanz, 2009). Las secuencias, Uru 9 y Uru 55 agruparon en el linaje africano, Af2, con otras secuencias pertenecientes a éste linaje, obtenidas del GenBank, mostrando un porcentaje del 4.17%, lo que está de acuerdo con la ascendencia étnica afroamericana en nuestro país del 7,8% (Cabella, 2013; Sanz, 2009), aunque no es el mismo clúster donde está ubicada la secuencia de la Amazonia (HQ825314), perteneciente a la rama de las secuencias Af1. El porcentaje obtenido de las 3 muestras de Uruguay que se agruparon en el linaje asiático-americano fue del 6.38%. Estas secuencias se agruparon junto con algunas secuencias de aislamientos argentinos, brasileños y paraguayos (con números del GenBank: AF356587-88, KJ452225, HQ825303), lamentablemente, no hay datos de población asiática-americana en Uruguay, más que el registro del último censo que reporta una ascendencia asiática del 0,2% (Cabella, 2013; Gurgel et al., 2015; Mendoza et al., 2013; Picconi et al., 2003).

Los estudios sobre polimorfismos del gen supresor de tumor p53 se han realizado en muestras de carcinomas, para determinar la existencia de una asociación entre la detección de un determinado polimorfismo y el desarrollo de carcinomas. De las poblaciones



estudiadas en ésta tesis, en población de la IM (general) y en población del SEIC-HP (viviendo con VIH), se obtuvieron muestras pre-cancerosas y muestras de pacientes sin lesión, las que se testaron determinando la frecuencia de los distintos polimorfismos, pero no se logró determinar una posible asociación con los distintos grados de lesión. Varios estudios muestran que los alelos Arg/Arg son más frecuentemente detectados en carcinomas que los Arg/Pro y los Pro/Pro, por lo que podría usarse como marcador oncogénico (Makni et al., 2000; Rosenthal et al., 1998). Nuestros hallazgos muestran datos similares entre el grupo control y el grupo con lesión, y no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos. Se observó que la frecuencia del alelo Arg/Arg fue mayor al 50%, y mayor a la del alelo Pro/Pro, lo que estaría en concordancia con el estudio de Beckman y colaboradores en 1994, el cual revela un aumento de frecuencias del alelo p53Arg/Arg en las regiones más alejadas del ecuador (Beckman et al., 1994). Una posible consecuencia de la no asociación detectada en nuestros resultados, podría deberse a que los pacientes estudiados con lesiones precancerosas, presentaban mayoritariamente lesiones intraepiteliales de bajo grado, así, las frecuencias podrían variar en el caso de incluir un número de muestreo mayor de lesiones intraepiteliales de alto grado, como ocurre en el trabajo de Burroni y colaboradores (2013), donde los resultados presentados allí demuestran un aumento del alelo p53 Arg/Arg en las HSIL comparado con los controles (Burroni et al., 2013; Makni et al., 2000; Rosenthal et al., 1998).

La persistencia de la infección por VPH está asociada a altas cargas virales, implicando una replicación viral muy activa (Biedermann et al., 2004; Broccolo et al., 2009; Hesselink et al., 2009; Saunier et al., 2008), también se ha observado que cuanto más severa es la lesión, más altas son las cargas del VPH presente en la muestra según Sherman y colaboradores (2002), sin embargo, existen otros resultados contradictorios al respecto (Cheung et al., 2009). Con el fin de aportar información en este punto, en el presente estudio se analizaron las cargas virales de los VPH genotipo 16 identificados en la población de la IM y del SEIC-HP y la expresión de los oncogenes e6 y e7 de los VPH 16 para la población del SEIC-HP. Para ello, se optimizó una PCR en tiempo real "in house", metodología, que a la fecha no ha sido reportado su uso en nuestro país en muestras provenientes de cérvix. Se optimizaron curvas estándares para los diferentes genes analizados, para realizar la cuantificación absoluta, y se determinaron de ésta manera las cargas virales de 30 muestras de la IM y 10 del SEIC-HP. Los resultados obtenidos al comparar las cargas virales de las muestras de pacientes diagnosticadas con lesión frente a las que no presentaban lesión, revelaron un aumento de las cargas virales del primer grupo con respecto al segundo. El uso del gen de la β -actina fue de suma utilidad como control interno de las muestras, siendo importante para muestras frescas, y sin duda crucial en estudios con biopsias de carcinomas parafinados, para descartar los falsos negativos de muestras en malas condiciones. En cuanto a la detección del ARN mensajero de los oncogenes e6 y e7, varios estudios determinaron que la expresión de las oncoproteínas se correlaciona con el aumento en la severidad de la lesión (Cattani et al., 2009a; Cattani et al., 2009b; Pierry et al., 2012). En este trabajo se logra poner a punto una RT-PCR en tiempo real "in house" para detectar y cuantificar los ARN mensajeros de los oncogenes del VPH genotipo 16.

CONCLUSIONES

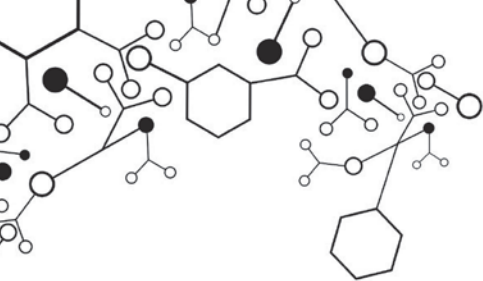
Utilizando las técnicas para la detección y genotipificación; PCR-RFLP y PCR-RLB, determinamos una frecuencia de detección de genoma de VPH del 42% en población general, siendo el VPH-AR genotipo 16, el más detectado en todas las lesiones y en las muestras control, tanto en infecciones simples como múltiples, mostrando una frecuencia general del 22%. El segundo genotipo más frecuente en todas las lesiones y en las muestras sin lesión fue el VPH genotipo 58, teniendo en cuenta únicamente las infecciones simples, y el VPH genotipo 68 cuando incluimos las infecciones múltiples. Sin embargo, cabe recordar que las muestras sin tipificar tienen un porcentaje de 31.9%, lo que podría variar las frecuencias de los genotipos detectados. Los genotipos 18 y 45 muy prevalentes en carcinomas a nivel mundial, fueron poco frecuentes en éste estudio, sin embargo, se debe considerar las muestras estudiadas eran todas pre-cancerosas.

La frecuencia de pacientes coinfectados VPH-VIH es de 41%, aproximadamente el doble de lo hallado en población general. Solo 2 muestras no pudieron ser determinadas por la metodología utilizada, lo que indica que la cantidad de ADN viral de VPH en personas viviendo con VIH es mayor que la detectada en VIH negativos. El VPH genotipo 16 fue el más frecuentemente detectado, en más del 18% en infecciones simples y en 37% si consideramos ambas infecciones simples y múltiples. El VPH genotipo 18 fue el segundo más frecuente, 7% en infecciones simples y más del 11%, al sumar infecciones simples y múltiples. Por tanto, mas de un 44% de las muestras positivas presentaron infecciones múltiples, a diferencia de la no presencia de infecciones múltiples en población general en pacientes sin lesión cuando fue utilizada la misma metodología.

Los datos obtenidos no mostraron diferencias entre los polimorfismos del gen supresor de tumor p53 hallados en el grupo control y el grupo con lesión. Se observó que la frecuencia del alelo p53 Arg/Arg fue mayor al 50%, similar al alelo heterocigota y muy superior al alelo homocigota p53 Pro/Pro. Estos valores podrían deberse a la disposición geográfica de nuestro país, por estar alejado del ecuador, y también que las muestras analizadas en este estudio fueron pre-cancerosas.

Las cargas virales de genoma de VPH genotipo 16, detectadas en pacientes viviendo con VIH, fueron superiores a aquellas detectadas en el grupo control (muestras provenientes de pacientes sin lesión). Con éste hallazgo, la determinación de la carga viral podría utilizarse como marcador oncogénico. En la metodología puesta a punto, el uso del gen de la β -actina fue esencial como control interno de la muestra, para descartar los falsos negativos que podrían derivar de la calidad de la muestra.

Se optimiza una retrotranscripción convencional seguida de PCR en tiempo real para la cuantificación absoluta de los niveles de expresión de los oncogenes e6 y e7, aunque no fue posible realizar una asociación entre altos niveles de ARN mensajeros y severidad de la lesión en las muestras analizadas.



PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos sobre frecuencias y genotipos circulantes en esta tesis, parten de muestras de pacientes de la IM y del SEIC-HP, dos lugares donde concurren a atenderse en su gran mayoría, mujeres que pertenecen a un nivel socio-económico medio-bajo y viven en la ciudad de Montevideo. Por tanto, para que la información proporcionada aquí corresponda a nivel país, tendría que incluir: un número mayor de muestras para ambas poblaciones, todos los estratos sociales, muestras de todo el país, e incluir muestras de todas las clases citológicas y carcinomas en el grupo de pacientes viviendo con VIH y en el grupo de población general. Además, en el grupo de pacientes viviendo con VIH se recomienda el seguimiento por un tiempo mayor, resultó difícil la captación de las pacientes al inicio, cuando comenzaron a interesarse por el proyecto, éste culminaba y muchas pacientes quedaron sin segundas y terceras tomas, con un tiempo mayor podrían completarse las tres tomas en cada paciente.

El estudio de variantes del VPH 16 en la población viviendo con VIH resultó ser menos informativo que el de población general, lo que puede deberse al pequeño número de muestras analizadas. En éste punto es recomendable aumentar el número de muestras a analizar para las tres regiones, con el fin de corroborar los datos obtenidos y complementar con nuevos datos.

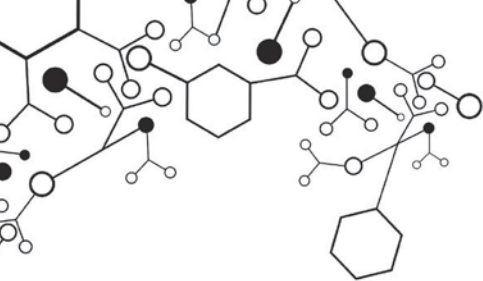
Los análisis de los polimorfismos del gen supresor de tumor p53 no mostraron diferencias significativas que pudieran determinar el uso de éste polimorfismo como marcador oncogénico. Éste análisis se debería continuar incorporando un número mayor de lesiones severas y carcinomas para corroborar la hipótesis, ya que la mayoría de las muestras analizadas provenían de pacientes sin lesión o con lesiones leves.

En éste estudio se optimiza la metodología de cuantificación absoluta para la determinación de la carga viral y la expresión de ARN mensajeros de los oncogenes del VPH 16, en el caso de la expresión de ARN mensajeros de los oncogenes, se recomienda incluir muestras con diversas clases citológicas para poder determinar su uso como marcador oncogénico.



Referencias Bibliográficas

- Alam, S., Conway, M. J., Chen, H. S., and Meyers, C. (2008). The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J Virol* 82(2), 1053-8.
- Amador-Molina, A., Hernandez-Valencia, J. F., Lamoyi, E., Contreras-Paredes, A., and Lizano, M. (2013). Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses* 5(11), 2624-42.
- Badano, I., Totaro, M. E., Culasso, A. C., Sanabria, D. J., Schurr, T. G., Balette, I. C., Roisman, A., Basiletti, J., Picconi, M. A., Campos, R. H., and Liotta, D. J. (2015). Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. *Infect Genet Evol* 29, 103-9.
- Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowser, L. M., Olson, C., and Brown, J. C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60(6), 1445-56.
- Barrios E., G. M., Alonso R., Musetti, C. (2014). IV Atlas de Incidencia del Cáncer en Uruguay. Período 2007-2011 (D. d. a. O. 2016, Ed.), http://www.comisioncancer.org.uy/uc_360_1.html.
- Beckman, G., Birgander, R., Sjalander, A., Saha, N., Holmberg, P. A., Kivela, A., and Beckman, L. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44(5), 266-70.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., and de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401(1), 70-9.
- Bernard, H. U., Chan, S. Y., Manos, M. M., Ong, C. K., Villa, L. L., Delius, H., Peyton, C. L., Bauer, H. M., and Wheeler, C. M. (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170(5), 1077-85.
- Berois, N., De Cremoux, P., Mazal, D., Sica, A., Cedeira, M., Caserta, B., Barrios, E., Osinaga, E., and Sastre-Garau, X. (2013). Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus genotypes in invasive carcinoma of the uterine cervix in Uruguay. *Int J Gynecol Cancer* 23(3), 527-32.
- Berois, N., Heard, I., Fort, Z., Alonso, R., Sica, A., Moerzinger, P., Rodriguez, G., Sancho-Garnier, H., Osinaga, E., and Favre, M. (2014). Prevalence of type-specific HPV infection in Uruguay. *J Med Virol* 86(4), 647-52.



Berumen, J., Ordonez, R. M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S. C., Estrada, R. A., Yunes, E., Garcia-Carranca, A., Gonzalez-Lira, G., and Madrigal-de la Campa, A. (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93(17), 1325-30.

Biedermann, K., Dandachi, N., Trattner, M., Vogl, G., Doppelmayr, H., More, E., Staudach, A., Dietze, O., and Hauser-Kronberger, C. (2004). Comparison of real-time PCR signal-amplified in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantification of human papillomavirus in archival cervical cancer tissue. *J Clin Microbiol* 42(8), 3758-65.

Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87(11), 796-802.

Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., and Coglian, V. (2009). A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10(4), 321-2.

Bower, M., Palmieri, C., and Dhillon, T. (2006). AIDS-related malignancies: changing epidemiology and the impact of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Infect Dis* 19(1), 14-9.

Broccolo, F., Chiari, S., Piana, A., Castiglia, P., Dell'Anna, T., Garcia-Parra, R., Maneo, A., Villa, A., Leone, E. B., Perego, P., Maida, A., Mangioni, C., and Cocuzza, C. E. (2009). Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus types associated with cervical carcinoma in a population of North Italy. *J Med Virol* 81(2), 278-87.

Broker, T. R., Jin, G., Croom-Rivers, A., Bragg, S. M., Richardson, M., Chow, L. T., Vermund, S. H., Alvarez, R. D., Pappas, P. G., Squires, K. E., and Hoesley, C. J. (2001). Viral latency--the papillomavirus model. *Dev Biol (Basel)* 106, 443-51; discussion 452-3, 465-75.

Buck, C. B., Day, P. M., and Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 445(1-2), 169-74.

Buitrago-Perez, A., Garaulet, G., Vazquez-Carballo, A., Paramio, J. M., and Garcia-Escudero, R. (2009). Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling. *Curr Genomics* 10(1), 26-34.

Burk, R. D., Bernard, H.U., Chan, P., Chen, Z., Desalle, R., Dillner, J., Forslund, O., Haga, T., Kocjan, B., McBride, A., Van Doorslaer, K., Villa, L.L. (2016). International Committee on Taxonomy of Viruses (A. d. t. O. 2016, Ed.), <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

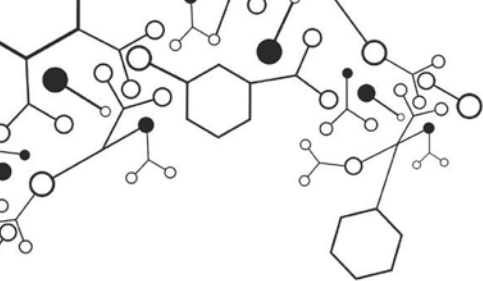
Burroni, E., Bisanzi, S., Sani, C., Puliti, D., and Carozzi, F. (2013). Codon 72 polymorphism of p53 and HPV type 16 E6 variants as risk factors for patients with squamous epithelial lesion of the uterine cervix. *J Med Virol* 85(1), 83-90.

Cabella, W., Nathan M and Tenenbaum M (2013). Atlas Sociodemográfico y de la Desigualdad del Uruguay (I. N. d. Estadística, Ed.), Vol. 2. Trilce

Casas, L., Galvan, S. C., Ordonez, R. M., Lopez, N., Guido, M., and Berumen, J. (1999). Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 83(4), 449-55.

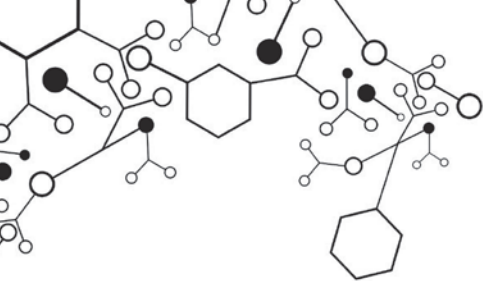
Castellsague, X., and Munoz, N. (2003). Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*(31), 20-8.

- Cattani, P., Siddu, A., D'Onghia, S., Marchetti, S., Santangelo, R., Vellone, V. G., Zannoni, G. F., and Fadda, G. (2009a). RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 47(7), 2136-41.
- Cattani, P., Zannoni, G. F., Ricci, C., D'Onghia, S., Trivellizzi, I. N., Di Franco, A., Vellone, V. G., Durante, M., Fadda, G., Scambia, G., Capelli, G., and De Vincenzo, R. (2009b). Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. *J Clin Microbiol* 47(12), 3895-901.
- Ciuffo, G. (1907). Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol* 48, 12-7.
- Clifford, G. M., Rana, R. K., Franceschi, S., Smith, J. S., Gough, G., and Pimenta, J. M. (2005). Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(5), 1157-64.
- Chan, S. Y., Ho, L., Ong, C. K., Chow, V., Drescher, B., Durst, M., ter Meulen, J., Villa, L., Luande, J., Mgaya, H. N., and et al. (1992). Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 66(4), 2057-66.
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruse, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., and Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 29(32), 4294-301.
- Chen, Z., Terai, M., Fu, L., Herrero, R., DeSalle, R., and Burk, R. D. (2005). Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* 79(11), 7014-23.
- Cheung, J. L., Cheung, T. H., Ng, C. W., Yu, M. Y., Wong, M. C., Siu, S. S., Yim, S. F., and Chan, P. K. (2009). Analysis of human papillomavirus type 18 load and integration status from low-grade cervical lesion to invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 47(2), 287-93.
- Cheung, J. L., Cheung, T. H., Tang, J. W., and Chan, P. K. (2008). Increase of integration events and infection loads of human papillomavirus type 52 with lesion severity from low-grade cervical lesion to invasive cancer. *J Clin Microbiol* 46(4), 1356-62.
- de Villiers, E. M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445(1-2), 2-10.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1), 17-27.
- Del Mistro, A., Bertorelle, R., Franzetti, M., Cattelan, A., Torrisi, A., Giordani, M. T., Sposetti, R., Bonoldi, E., Sasset, L., Bonaldi, L., Minucci, D., and Chieco-Bianchi, L. (2004). Antiretroviral therapy and the clinical evolution of human papillomavirus-associated genital lesions in HIV-positive women. *Clin Infect Dis* 38(5), 737-42.
- Deligeoroglou, E., Giannouli, A., Athanasopoulos, N., Karountzos, V., Vatopoulou, A., Dimopoulos, K., and Creatsas, G. (2013). HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2013, 540850.
- DEVISA, M. (2016). Informe de la Situación Nacional del VIH. In "Departamento de Vigilancia en Salud - Área programática ITS/SIDA. Día de Acceso: 9 Octubre 2016", https://medios.presidencia.gub.uy/tav_portal/2016/noticias/NO_U311/Informe.pdf.



- DiMaio, D., and Petti, L. M. (2013). The E5 proteins. *Virology* 445(1-2), 99-114.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S7-15.
- Doorbar, J. (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers* 23(4), 297-313.
- Draper, E., Bissett, S. L., Howell-Jones, R., Waight, P., Soldan, K., Jit, M., Andrews, N., Miller, E., and Beddows, S. (2013). A randomized, observer-blinded immunogenicity trial of Cervarix((R)) and Gardasil((R)) Human Papillomavirus vaccines in 12-15 year old girls. *PLoS One* 8(5), e61825.
- Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Goedert, J. J., Virgo, P., McNeel, T. S., Scoppa, S. M., and Biggar, R. J. (2006). Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980-2002. *AIDS* 20(12), 1645-54.
- Ferguson, M., Heath, A., Johnes, S., Pagliusi, S., Dillner, J., and Collaborative Study, P. (2006). Results of the first WHO international collaborative study on the standardization of the detection of antibodies to human papillomaviruses. *Int J Cancer* 118(6), 1508-14.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5), E359-86.
- Ferreccio, C., Prado, R. B., Luzoro, A. V., Ampuero, S. L., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Vaccarella, S. V., Jara, A. T., Puschel, K. I., Robles, S. C., Herrero, R., Franceschi, S. F., and Ojeda, J. M. (2004). Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(12), 2271-6.
- Ferris, D., Samakoses, R., Block, S. L., Lazcano-Ponce, E., Restrepo, J. A., Reisinger, K. S., Mehlsen, J., Chatterjee, A., Iversen, O. E., Sings, H. L., Shou, Q., Sausser, T. A., and Saah, A. (2014). Long-term study of a quadrivalent human papillomavirus vaccine. *Pediatrics* 134(3), e657-65.
- Fife, K. H., Wu, J. W., Squires, K. E., Watts, D. H., Andersen, J. W., and Brown, D. R. (2009). Prevalence and persistence of cervical human papillomavirus infection in HIV-positive women initiating highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51(3), 274-82.
- Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., and Lowy, D. R. (2008). HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer* 113(10 Suppl), 3036-46.
- Gingues, S., and Gill, M. J. (2006). The impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence and outcomes of AIDS-defining cancers in Southern Alberta. *HIV Med* 7(6), 369-77.
- GLOBOCAN (2012). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. In "Access date: 9th October 2016" (S. I. Ferlay J., Ervik M., Forman D., Bray F., Dikshit R., Elser S., Mathers C., Rebelo M and Parkin D.M. , Ed.). International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
- Goncalves, M. A., Massad, E., Burattini, M. N., and Villa, L. L. (1999). Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, Sao Paulo, Brazil. *Int J STD AIDS* 10(12), 803-7.
- Goncalves, M. A., Randi, G., Arslan, A., Villa, L. L., Burattini, M. N., Franceschi, S., Donadi, E. A., and Massad, E. (2008). HPV type infection in different anogenital sites among HIV-positive Brazilian women. *Infect Agent Cancer* 3, 5.

- Grabowski, M. K., Gray, R. H., Serwadda, D., Kigozi, G., Gravitt, P. E., Nalugoda, F., Reynolds, S. J., Wawer, M. J., Watya, S., Quinn, T. C., and Tobian, A. A. (2014). High-risk human papillomavirus viral load and persistence among heterosexual HIV-negative and HIV-positive men. *Sex Transm Infect* 90(4), 337-43.
- Gurgel, A. P., Chagas, B. S., do Amaral, C. M., Nascimento, K. C., Leal, L. R., Silva Neto Jda, C., Cartaxo Muniz, M. T., and de Freitas, A. C. (2015). Prevalence of human papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil. *Biomed Res Int* 2015, 130828.
- Gutierrez-Xicotencatl, L., Plett-Torres, T., Madrid-Gonzalez, C. L., and Madrid-Marina, V. (2009). Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Publica Mex* 51 Suppl 3, S479-88.
- Heard, I., Schmitz, V., Costagliola, D., Orth, G., and Kazatchkine, M. D. (1998). Early regression of cervical lesions in HIV-seropositive women receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 12(12), 1459-64.
- Heck, D. V., Yee, C. L., Howley, P. M., and Munger, K. (1992). Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10), 4442-6.
- Hesselink, A. T., Berkhof, J., Heideman, D. A., Bulkman, N. W., van Tellingen, J. E., Meijer, C. J., and Snijders, P. J. (2009). High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* 124(2), 381-6.
- Ho, L., Chan, S. Y., Burk, R. D., Das, B. C., Fujinaga, K., Icenogle, J. P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P., and et al. (1993). 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* 67(11), 6413-23.
- Hoory, T., Monie, A., Gravitt, P., and Wu, T. C. (2008). Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 107(3), 198-217.
- Howley P.M., L.D.R. (2007). "Papillomaviruses." Knipe D.M. & Howley P.M. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. ed. Fields Virology 5^a Edition, Vol 2.
- Jamieson, D. J., Duerr, A., Burk, R., Klein, R. S., Paramsothy, P., Schuman, P., Cu-Uvin, S., and Shah, K. (2002). Characterization of genital human papillomavirus infection in women who have or who are at risk of having HIV infection. *Am J Obstet Gynecol* 186(1), 21-7.
- Jiang, P., and Yue, Y. (2014). Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). *Exp Ther Med* 7(1), 3-7.
- Joerger, A. C., and Fersht, A. R. (2008). Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77, 557-82.
- Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., Jansen, K. U., and Keller, P. M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274(9), 5810-22.
- Kammer, C., Warthorst, U., Torrez-Martinez, N., Wheeler, C. M., and Pfister, H. (2000). Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 81(Pt 8), 1975-81.



Kamper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H. C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J. T., and Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* 80(2), 759-68.

Khan, M. J., Castle, P. E., Lorincz, A. T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D. R., Rush, B. B., Glass, A. G., and Schiffman, M. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 97(14), 1072-9.

Koushik, A., Platt, R. W., and Franco, E. L. (2004). p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(1), 11-22.

Koutsky, L. A., Holmes, K. K., Critchlow, C. W., Stevens, C. E., Paavonen, J., Beckmann, A. M., DeRouen, T. A., Galloway, D. A., Vernon, D., and Kiviat, N. B. (1992). A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327(18), 1272-8.

Kristensen, G. B., Karlsen, F., Jenkins, A., Kaern, J., Abeler, V. M., and Trope, C. G. (1996). Human papilloma virus has no prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 32A(8), 1349-53.

Kulasingam, S. L., Hughes, J. P., Kiviat, N. B., Mao, C., Weiss, N. S., Kuypers, J. M., and Koutsky, L. A. (2002). Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA* 288(14), 1749-57.

Lamarcq, L., Deeds, J., Ginzinger, D., Perry, J., Padmanabha, S., and Smith-McCune, K. (2002). Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening. *J Mol Diagn* 4(2), 97-102.

Lizano, M., Berumen, J., and Garcia-Carranca, A. (2009). HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res* 40(6), 428-34.

Longworth, M. S., and Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2), 362-72.

Maglennon, G. A., and Doorbar, J. (2012). The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J* 6, 190-7.

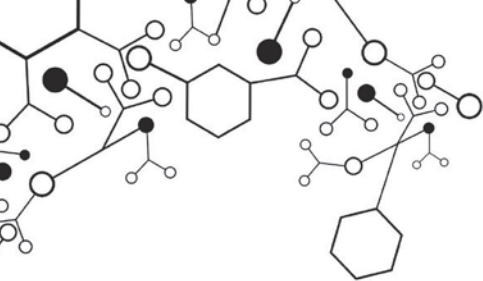
Makni, H., Franco, E. L., Kaiano, J., Villa, L. L., Labrecque, S., Dudley, R., Storey, A., and Matlashewski, G. (2000). P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 87(4), 528-33.

Mammas, I. N., Sourvinos, G., and Spandidos, D. A. (2014). The paediatric story of human papillomavirus (Review). *Oncol Lett* 8(2), 502-506.

Manhart, L. E., and Koutsky, L. A. (2002). Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis* 29(11), 725-35.

Manos, M., Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker T, Wolinski SM. (1989). The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 7, 209-214.

- Meisels, A., and Fortin, R. (1976). Condylomatous lesions of the cervix and vagina. 1. Cytologic patterns. *Acta Cytol.* 20, 505-509.
- Mendoza, L., Picconi, M. A., Mirazo, S., Mongelos, P., Gimenez, G., Basiletti, J., and Arbiza, J. (2013). Distribution of HPV-16 variants among isolates from Paraguayan women with different grades of cervical lesion. *Int J Gynaecol Obstet* 122(1), 44-7.
- Meshor, D., Stanford, E., White, J., Findlow, J., Warrington, R., Das, S., Pebody, R., Borrow, R., and Soldan, K. (2016). HPV Serology Testing Confirms High HPV Immunisation Coverage in England. *PLoS One* 11(3), e0150107.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., and Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348(6), 518-27.
- Mustafa, R. A., Santesso, N., Khatib, R., Mustafa, A. A., Wiercioch, W., Kehar, R., Gandhi, S., Chen, Y., Cheung, A., Hopkins, J., Ma, B., Lloyd, N., Wu, D., Broutet, N., and Schunemann, H. J. (2016). Systematic reviews and meta-analyses of the accuracy of HPV tests, visual inspection with acetic acid, cytology, and colposcopy. *Int J Gynaecol Obstet* 132(3), 259-65.
- Paesi, S., Serafini, E. P., Barea, F., Madi, S. R., and Echeverrigaray, S. (2009). High prevalence of human papillomavirus type 58 in patients with cervical pre-malignant lesions in southern Brazil. *J Med Virol* 81(7), 1270-5.
- Palefsky, J. (2006). Human papillomavirus-related tumors in HIV. *Curr Opin Oncol* 18(5), 463-8.
- Palefsky, J. M., Minkoff, H., Kalish, L. A., Levine, A., Sacks, H. S., Garcia, P., Young, M., Melnick, S., Miotti, P., and Burk, R. (1999). Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* 91(3), 226-36.
- Pande, S., Jain, N., Prusty, B. K., Bhambhani, S., Gupta, S., Sharma, R., Batra, S., and Das, B. C. (2008). Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol* 46(3), 1060-6.
- Papanicolaou, G. N. (1942). A New Procedure for Staining Vaginal Smears. *Science* 95(2469), 438-9.
- Parkin, D. M., and Bray, F. (2006). Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/11-25.
- Payan, C., Ducancelle, A., Aboubaker, M. H., Caer, J., Tapia, M., Chauvin, A., Peyronnet, D., Le Hen, E., Arab, Z., Legrand, M. C., Tran, A., Postec, E., Tourmen, F., Avenel, M., Malbois, C., De Brux, M. A., Descamps, P., and Lunel, F. (2007). Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol* 45(3), 897-901.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9), e45.
- Picconi, M.A. (2013). Detección de virus papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino. *Medicina (Buenos Aires)* 73: 585-596.
- Picconi, M.A., Alonio, L. V., Sichero, L., Mbayed, V., Villa, L. L., Gronda, J., Campos, R., and Teyssie, A. (2003). Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aborigines from Argentina. *J Med Virol* 69(4), 546-52.



Piery, D., Weiss, G., Lack, B., Chen, V., and Fusco, J. (2012). Intracellular human papillomavirus E6, E7 mRNA quantification predicts CIN 2+ in cervical biopsies better than Papanicolaou screening for women regardless of age. *Arch Pathol Lab Med* 136(8), 956-60.

Raff, A. B., Woodham, A. W., Raff, L. M., Skeate, J. G., Yan, L., Da Silva, D. M., Schelhaas, M., and Kast, W. M. (2013). The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol* 87(11), 6062-72.

Ramas, V., Mirazo S., Bonilla S., Ruhansky D, Arbiza J. (2016). Human papillomavirus Type 16 variant analysis of E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples of Uruguayan women. Submitted.

Ramas, V., Mirazo, S., Bonilla, S., Mendoza, L., Lago, O., Basiletti, J., Gonzalez, J., Picconi, M. A., and Arbiza, J. (2013). Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from Uruguayan women. *J Med Virol* 85(5), 845-51.

Rasmussen, R. (2001). "Quantification on the LightCycler". Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. (S. Meur, Wittwer, C. and Nakagawara, K., Ed.), Springer Press, Heidelberg.

Reid, R., and Champion, M. J. (1988). The biology and significance of human papillomavirus infections in the genital tract. *Yale J Biol Med* 61(4), 307-25.

Riethmuller, D., Jacquard, A. C., Lacau St Guily, J., Aubin, F., Carcopino, X., Pradat, P., Dahlab, A., and Pretet, J. L. (2015). Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of HPV-related diseases in France. *BMC Public Health* 15, 453.

Rocha-Brischiliari, S. C., Gimenes, F., de Abreu, A. L., Irie, M. M., Souza, R. P., Santana, R. G., Gravena, A. A., de, B. C. M. D., Consolaro, M. E., and Pelloso, S. M. (2014). Risk factors for cervical HPV infection and genotypes distribution in HIV-infected South Brazilian women. *Infect Agent Cancer* 9(1), 6.

Roden, R. B., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1997). Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis* 176(4), 1076-9.

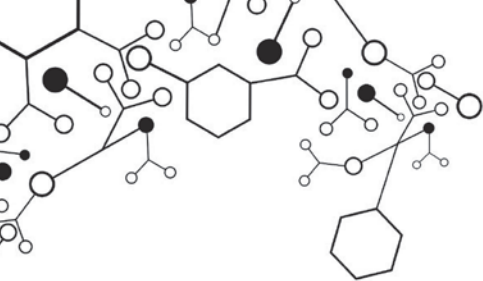
Rodriguez, G., and Alonso, R. (2008). Estrategia y Manual de Procedimientos. In "Programa de prevención de cáncer de cuello uterino en el Uruguay "Dr. Enrique Pouey". (M. d. S. Publica, Ed.), Vol. II, pp. 129. Imprenta Rojo.

Rose, R. C., Bonne, W., Reichman, R. C., and Garcea, R. L. (1993). Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles. *J Virol* 67(4), 1936-44.

Rosenthal, A. N., Ryan, A., Al-Jehani, R. M., Storey, A., Harwood, C. A., and Jacobs, I. J. (1998). p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet* 352(9131), 871-2.

Roura, E., Travier, N., Waterboer, T., de Sanjose, S., Bosch, F. X., Pawlita, M., Pala, V., Weiderpass, E., Margall, N., Dillner, J., Gram, I. T., Tjonneland, A., Munk, C., Palli, D., Khaw, K. T., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Mesrine, S., Fournier, A., Fortner, R. T., Ose, J., Steffen, A., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Orfanos, P., Masala, G., Tumino, R., Sacerdote, C., Polidoro, S., Mattiello, A., Lund, E., Peeters, P. H., Bueno-de-Mesquita, H. B., Quiros, J. R., Sanchez, M. J., Navarro, C., Barricarte, A., Larranaga, N., Ekstrom, J., Lindquist, D., Idahl, A., Travis, R. C., Merritt, M. A., Gunter, M. J., Rinaldi, S., Tommasino, M., Franceschi, S., Riboli, E., and Castellsague, X. (2016). The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PLoS One* 11(1), e0147029.

- Ryndock, E. J., and Meyers, C. (2014). A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? *Expert Rev Anti Infect Ther* 12(10), 1165-70.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732), 1350-4.
- Sans, M. (2009). Raza, adscripción étnica y genética en Uruguay. *RUNA*. 30(2), 163-174.
- Saunier, M., Monnier-Benoit, S., Mauny, F., Dalstein, V., Briolat, J., Riethmuller, D., Kantelip, B., Schwarz, E., Mougin, C., and Pretet, J. L. (2008). Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 46(11), 3678-85.
- Schelhaas, M., Shah, B., Holzer, M., Blattmann, P., Kuhling, L., Day, P. M., Schiller, J. T., and Helenius, A. (2012). Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog* 8(4), e1002657.
- Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., and Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370(9590), 890-907.
- Schwarz, T. F., and Leo, O. (2008). Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: improving upon nature. *Gynecol Oncol* 110(3 Suppl 1), S1-10.
- Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M., Suhai, S., and Rowekamp, W. G. (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145(1), 181-5.
- Sherman, M. E., Schiffman, M., Cox, J. T., and Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study, G. (2002). Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst* 94(2), 102-7.
- Shope, R. E., and Hurst, E. W. (1933). Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med* 58(5), 607-24.
- Silva, J., Cerqueira, F., and Medeiros, R. (2014). Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* 289(4), 715-23.
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T., Jr., Young, N., Forum Group, M., and Bethesda, W. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287(16), 2114-9.
- Soulitzis, N., Sourvinos, G., Dokianakis, D. N., and Spandidos, D. A. (2002). p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett* 179(2), 175-83.
- Stoppler, M. C., Ching, K., Stoppler, H., Clancy, K., Schlegel, R., and Icenogle, J. (1996). Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70(10), 6987-93.
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I. M., Matlashewski, G., and Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393(6682), 229-34.



Sun, X. W., Kuhn, L., Ellerbrock, T. V., Chiasson, M. A., Bush, T. J., and Wright, T. C., Jr. (1997). Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 337(19), 1343-9.

Szostek, S., Zawilinska, B., Kopec, J., and Kosz-Vnenchak, M. (2009). Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta Biochim Pol* 56(2), 337-42.

Trottier, H., and Burchell, A. N. (2009). Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics* 12(5-6), 291-307.

Trottier, H., and Franco, E. L. (2006). Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care* 12(17 Suppl), S462-72.

UNAIDS (2016). GlobalAids Update-UNAIDS 2016 (J. U. N. Programme on HIV/AIDS, UNAIDS, Ed.), https://medios.presidencia.gub.uy/tav_portal/2016/noticias/NO_U311/Informe.pdf, Access date: 9 October 2016.

Wang, J. W., and Roden, R. B. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445(1-2), 175-86.

Wheeler, C. M., Yamada, T., Hildesheim, A., and Jenison, S. A. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 35(1), 11-9.

Wong, S. C., Au, T. C., Chan, S. C., Chan, C. M., Lam, M. Y., Zee, B. C., Pong, W. M., and Chan, A. T. (2010). Human papillomavirus DNA detection in menstrual blood from patients with cervical intraepithelial neoplasia and condyloma acuminatum. *J Clin Microbiol* 48(3), 709-13.

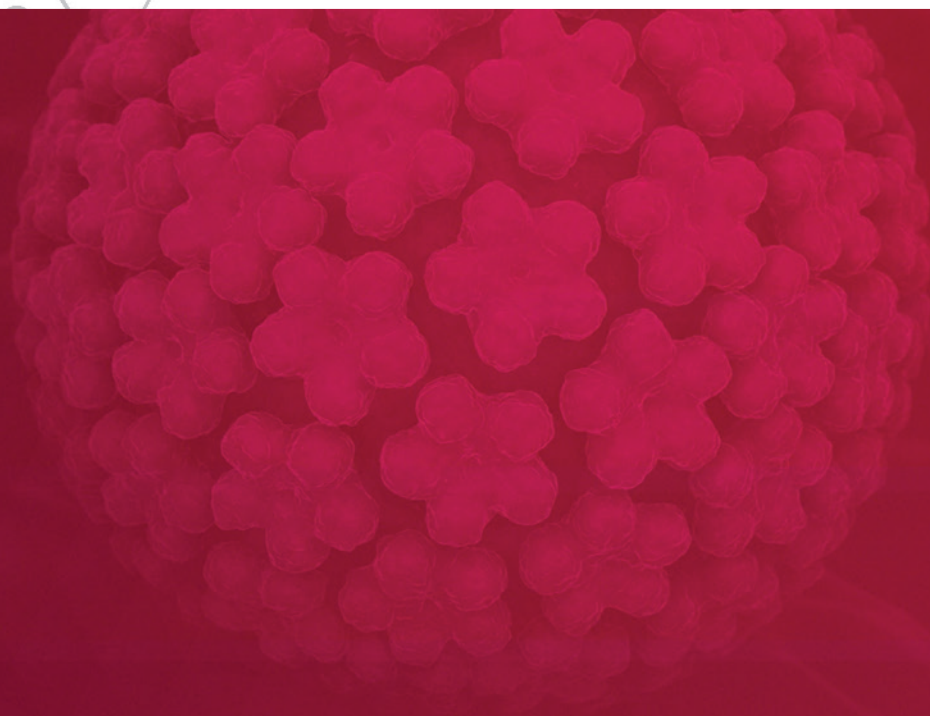
Xi, L. F., Koutsky, L. A., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Wheeler, C. M., Holmes, K. K., and Kiviat, N. B. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89(11), 796-802.

Yamada, T., Manos, M. M., Peto, J., Greer, C. E., Munoz, N., Bosch, F. X., and Wheeler, C. M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71(3), 2463-72.

zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 36(2 pt 2), 794.

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

zur Hausen, H., Gissmann, L., Steiner, W., Dippold, W., and Dreger, I. (1975). Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol*(43), 569-71.



Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
PEDECIBA

