

Tesis de Maestría

PEDECIBA

Área: Biología

Sub-Área: Microbiología

DetECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN HOMBRES QUE TIENEN SEXO CON HOMBRES EN URUGUAY

Lic. Cecilia D'Albora

Directora de tesis: Dra. Dora Ruchansky

Co-Director: Prof. Dr. Juan Arbiza

Lugar de realización: Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene -
Facultad de Medicina, UdelaR.

Tribunal: Dr. Rodney Colina, Dra. Laura Bentancor y Dra. María Dolores Fellner

Defensa: diciembre de 2019



Contenido

1. Resumen	9
2. Introducción	10-29
2.1. Generalidades	11
2.2. Taxonomía	12-13
2.3. Estructura	14-16
2.3.1. Morfología	14
2.3.2. Organización Genómica	14-15
2.4. Ciclo Vital de VPH	16-19
2.4.1. Fases del ciclo de replicación	17-18
2.4.1.1. Fase de entrada viral	17
2.4.1.2. Fase temprana	18
2.4.1.3. Fase tardía	18
2.5. VPH de alto y bajo riesgo oncogénico	19-20
2.6. Patogenia	20-24
2.6.1. Neoplasia intraepitelial anal y cáncer anal invasor	20-21
2.6.2. Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer anal	21
2.6.3. Condilomas acuminados o verrugas anogenitales	22
2.6.4. Otras neoplasias asociadas a la infección por VPH	23-24
2.7. Infección por VPH en el canal anal de HSH VIH negativos y positivos	24-25
2.8. Epidemiología del cáncer anal en Uruguay	25
2.9. Variabilidad de VPH 16	26-27
2.10. Prevención	27-29
2.10.1. Vacunas	27-28
2.10.2. Prevención secundaria	29
3. Hipótesis	31
4. Objetivos	33
4.1. Objetivo general	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. Materiales y métodos	34-45
5.1. Estrategia de trabajo	35

5.2. Población en estudio	36
5.2.1. Criterio de inclusión	36
5.2.2. Aspectos éticos	36
5.2.3. Análisis estadístico	36
5.3. Muestras clínicas	37
5.4. Extracción total de ADN	37
5.5. Detección de genoma de VPH mediante amplificación por PCR de un fragmento de la región L1 viral con cebadores genéricos MY09 y MY11	38
5.6. Electroforesis en gel de agarosa	39
5.7. Caracterización molecular mediante análisis del largo de los fragmentos de restricción (RFLP)	39-40
5.8. Genotipificación por PCR utilizando cebadores BSGP5+/6+biot seguida de Hibridación Reversa en Línea (RLB)	40-43
5.8.1. PCR con cebadores BSGP5+/6+biot	40-41
5.8.2. Hibridación reversa en línea (reverse line blot, RLB)	42-43
5.9. Análisis de la variabilidad de VPH 16	44-45
5.9.1. Muestras analizadas	44
5.9.2. Amplificación, purificación y secuenciación de un fragmento de la región LCR del genoma viral	44-45
5.9.3. Análisis filogenético	45
6. Resultados	46-63
6.1. Caracterización de la población analizada	47
6.2. Calidad de las muestras	47-48
6.3. Detección por amplificación de fragmento de región L1 viral con cebadores genéricos MY09 y MY11	48-49
6.4. Genotipificación de VPH por RFLP	50
6.5. Detección y genotipificación de VPH PCR BSGP5+/6+biot seguida de RLB	51-61
6.5.1. Detección	51-52
6.5.2. Genotipificación	53
6.5.3. Caracterización de los genotipos detectados en el canal anal de HSH	54-55

6.5.4. Detección y genotipificación de VPH en HSH VIH positivos y negativos	56-57
6.5.4.1. Frecuencia del número de genotipos detectados en HSH VIH positivos	58
6.5.4.2. Frecuencia del número de genotipos detectados en HSH VIH negativos	59
6.6. Personas HSH VIH positivos y negativos en seguimiento	60-61
6.7. Variabilidad de VPH 16	62-63
7. Discusión	64-67
8. Conclusiones	68-69
9. Perspectivas	70-71
10. Referencias bibliográficas	72-83
11. Anexos	84-87

Abreviaturas y acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIN: *Anal intraepitelial neoplasia*

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CA: Cáncer anal

CCU: Cáncer de cuello de útero

CDC: *Centers for disease control and prevention*

E: *Early*

Et al.: Abreviatura de la expresión en latín *et alii*, que significa y otros

HSH: Hombres que tienen sexo con hombres

HSIL: Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado

HSPG: Heparin sulfato proteoglicanos

IC: Intervalo de confianza

ICTV: Comité Internacional en Taxonomía de Virus

ITS: Infecciones de transmisión sexual

L: *Late*

LCR: *Long control region*

Linaje A: Linaje asiática

Linaje AA: Linaje asiático-americana

Linaje Af: Linajes africano

Linaje E: Linajes europeo

LSIL: Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: *Open reading frame*

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso molecular

PV: Papilomavirus

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

RLB: *Reverse line blot*

TBE: Tris, borato, EDTA

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLP: *Virus like particles*

VPH: Virus del Papiloma Humano

VPH-AR: Virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico

VPH-BR: Virus del papiloma humano de bajo riesgo oncogénico

VPH-PAR: Virus del papiloma humano de probable alto riesgo oncogénico

1. RESUMEN



El Virus Papiloma Humano (VPH) es la infección de transmisión sexual con mayor prevalencia a nivel mundial e involucra a más de 40 genotipos. Se clasifican en dos grupos de acuerdo con su capacidad oncogénica: de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR), en el que los genotipos 6 y 11 se presentan más frecuentemente, implicados en verrugas genitales, y de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) donde los genotipos 16 y 18 son los predominantes. Los VPH-AR se asocian a lesiones intraepiteliales de alto grado, precursoras de carcinoma escamoso, más frecuentemente, en cuello uterino y ano. Los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), especialmente los infectados por VIH, tienen un riesgo mayor de lesiones intraepiteliales de alto grado, infección anal por VPH, presencia de múltiples genotipos y cáncer anal.

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de infección por VPH, los genotipos circulantes en el canal anal de HSH VIH positivos y VIH negativos de Uruguay y analizar la variabilidad de VPH 16.

Fueron incluidos 126 HSH con una mediana de edad de 33 años, no vacunados contra HPV; 74 de ellos VIH positivos y 35 VIH negativos. La detección y genotipificación viral se realizó en muestras de cepillado obtenidas del canal anal mediante técnicas moleculares como RFLP y PCR genérica con posterior hibridación reversa que permite identificar hasta 36 tipos de VPH en infecciones simples y mixtas.

La frecuencia de infección por al menos un genotipo de VPH fue del 96% y dos o más coinfecciones fueron encontrados en el 74% de los HSH analizados. En VIH positivos se encontraron hasta 9 genotipos diferentes de VPH, mientras que en VIH negativos el máximo fue de 7 genotipos. Al menos un VPH-AR fue encontrado en el 73% de los participantes. El genotipo 16 fue detectado en la mayoría de los casos.

Este es el primer trabajo de circulación de genotipos de VPH en el canal anal de HSH de Uruguay. Se confirma la alta prevalencia de las coinfecciones con múltiples genotipos de VPH en esta población, el predominio de los VPH-AR (en especial VPH16) y la alta frecuencia de infecciones con múltiples VPH-AR, lo que expondría a esta población a un riesgo aumentado de desarrollo de preneoplasia y cáncer anal.

2. INTRODUCCIÓN



2.1. Generalidades

En 1950 se identificó por primera vez al Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de piel a través de microscopía electrónica y fue en la década de 1970 cuando se identificaron los dos primeros genotipos (VPH 1 y 2) (Gissmann et al, 1977; Orth et al. 1978).

En los años 70 se presenta la hipótesis sobre el VPH como potencial causa del cáncer de cuello de útero (CCU) (Muñoz et al. 2003). Debido al gran avance en las técnicas moleculares de la década del 80, en los años subsiguientes se pudo caracterizar una gran cantidad de diferentes tipos de VPH que aún hoy no ha terminado. La hipótesis sobre la asociación entre el CCU y el VPH pudo ser confirmada gracias a la investigación de VPH 16, aislado de muestras de tejido cérvico uterino, llevada a cabo por Harald zur Hausen y su equipo (Durst et al. 1983; Boshart, et al. 1984), quien en 2008 recibe el Premio Nobel de Medicina por sus aportes.

La no existencia de cultivos celulares apropiados para la replicación viral no ha permitido el progreso en el estudio de funciones virales y en la generación de una taxonomía basada en las propiedades biológicas. Es por este motivo que la clasificación taxonómica de VPH se realiza a través de las características de su genoma y no en base a sus propiedades biológicas.

Más adelante, trabajos sobre mecanismos de la respuesta inmunitaria del huésped contra VPH contribuyeron directamente en el desarrollo de las vacunas contra este virus creadas en base a viriones vacíos (VLP de sus siglas en inglés *virus like particles*) producidas en forma recombinante licenciadas en 2006 por la Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA de sus siglas en inglés) (Syrjänen 2008).

2.2. Taxonomía

Originalmente los Papilomavirus (PV) fueron agrupados en la familia *Papovaviridae* según sus características estructurales similares, cápsides no envueltas y genoma ADN circular doble hebra. En 2004 fueron reclasificados por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV, de sus siglas en inglés *International Committee of Taxonomy of Viruses*) teniendo en cuenta el tamaño del genoma, su organización y diferencias en la secuencia aminoacídica; es así que actualmente pertenecen a la familia *Papillomaviridae* del género Papilomavirus (de Villiers et al. 2004).

La familia *Papillomaviridae* incluye géneros, especies, tipos, subtipos y variantes. A la fecha se han identificado cerca de 200 tipos de VPH, 40 de estos infectan la región anogenital en humanos (Egawa et al, 2015; de Villiers et al. 2004).

Los VPH se dividen en cinco géneros basados en las distancias genómicas, *Alfapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mu papillomavirus* y *Nu papillomavirus* (Figura 1) (Van Doorslaer et al. 2018).

Dadas las características de los PV, la única información consistente es la secuencia nucleotídica del genoma viral. Es por lo antes expuesto que, finalmente se reconoce el análisis de la homología en la secuencia de la región conservada L1 del genoma viral para establecer las relaciones filogenéticas entre los PV (de Villiers 2013). Los diferentes tipos de PV dentro de cada género poseen más de un 60% de identidad nucleotídica dentro de la región L1. Las especies se definen por una homología que alcanza el 70%, mientras que los tipos virales poseen 10% o más de diferencias nucleotídicas. En caso de existir una diferencia en la secuencia de entre el 2 y el 10%, se consideran subtipos distintos y si esta diferencia es menor al 2% se trata de variantes (de Villiers et al. 2004).

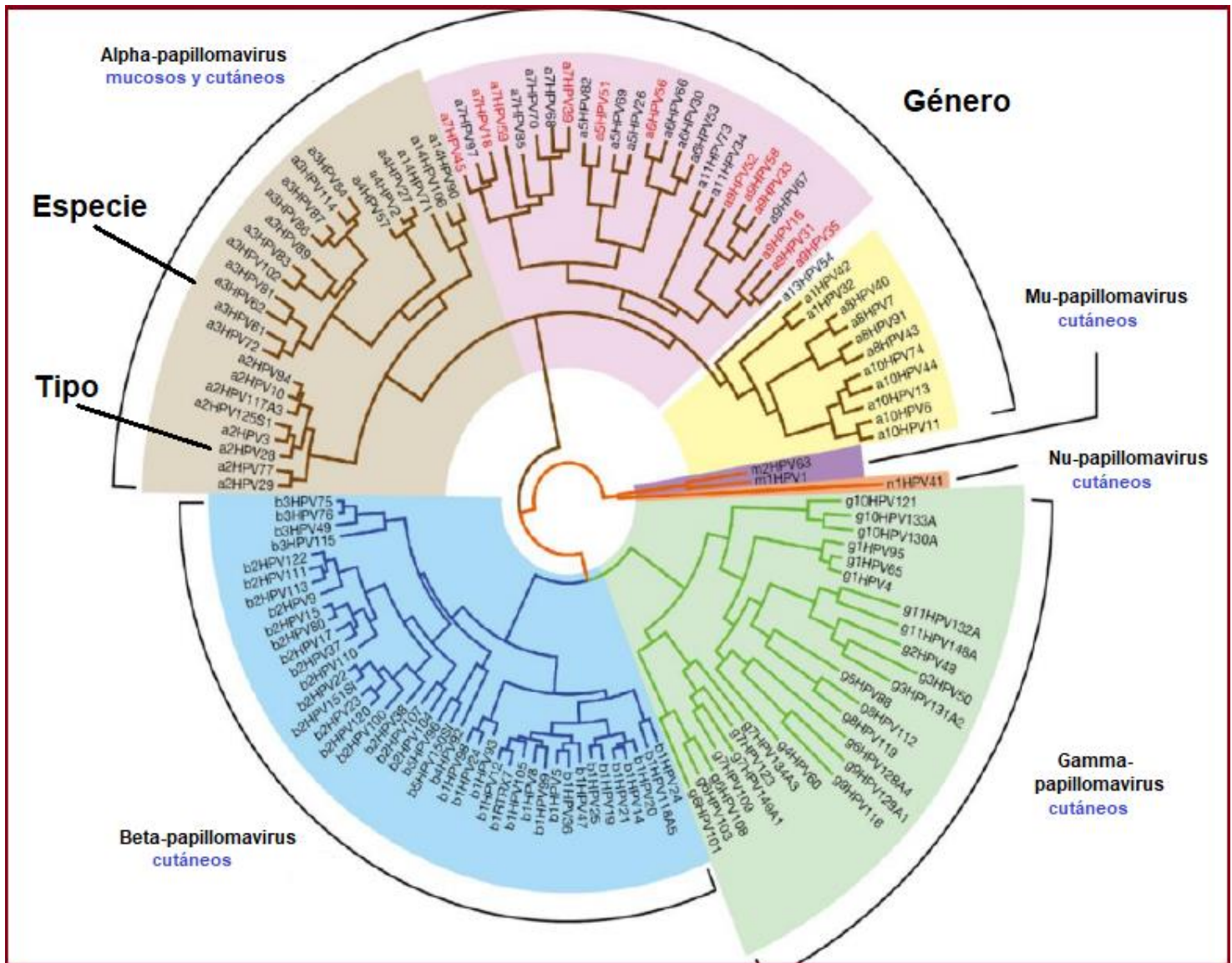


Figura 1: Árbol filogenético con relaciones evolutivas entre los VPH. Azul: Betapapillomavirus. Verde: Gammapapillomavirus. Alphapapillomavirus: amarillo VPH de bajo riesgo mucosos; rosado VPH alto riesgo mucosos; gris VPH bajo riesgo cutáneos. Adaptado de Egawa et al, 2015.

2.3. Estructura

2.3.1. Morfología

Los papilomavirus (PV) son relativamente pequeños, de 60 nm de diámetro aproximadamente, con cápside icosaédrica (T=7) compuesta por 72 pentámeros de L1. Contienen, una única molécula de ADN doble hebra circular de 8000 pb de longitud (Doorbar 2007; Mallory et al. 2017, Ming et al. 2006) (Figura 2).

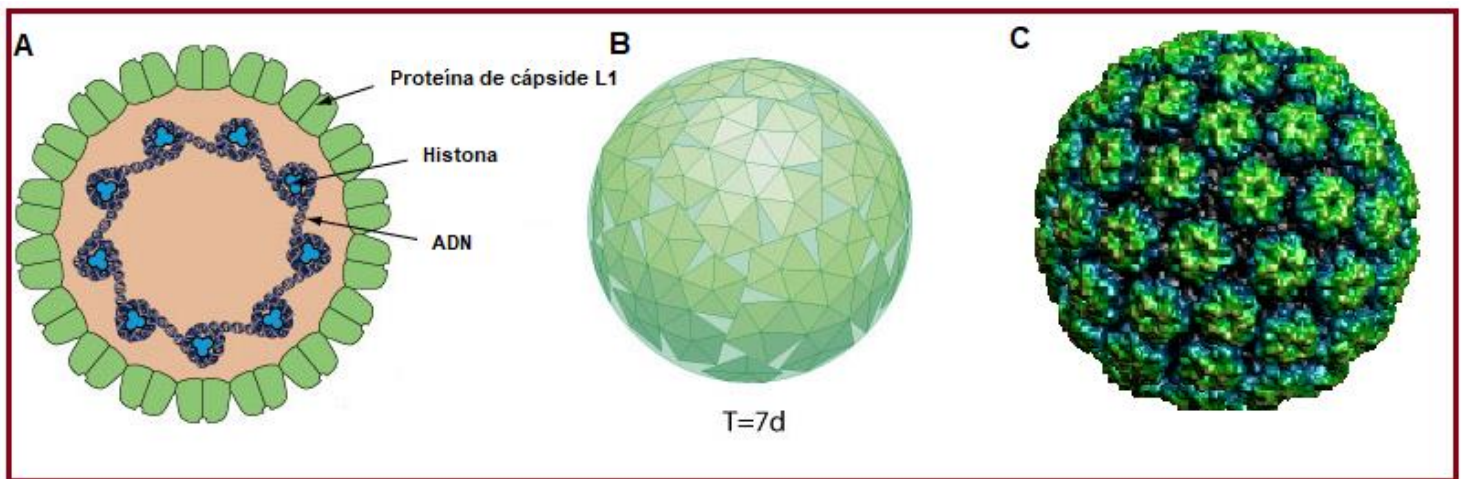


Figura 2: Morfología de los papilomavirus. A y B Diagrama de la cápside de VPH donde se observa la proteína principal L1 y el genoma viral empaquetado con histonas. Obtenida de Viral Zone <http://viralzone.expasy.org/>. C Imagen tridimensional de un virión de VPH construido por imágenes de microscopía crioelectrónica. Obtenida de VIPER db: http://viperd.b.scripps.edu/info_page.php?VDB=110t.

2.3.2. Organización Genómica

El genoma está conformado por diez marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés *open reading frames*) denominados tempranos (E, del inglés *early*) o tardíos (L, del inglés *late*) dependiendo de su ubicación (Fields et al. 2007) (figura 3).

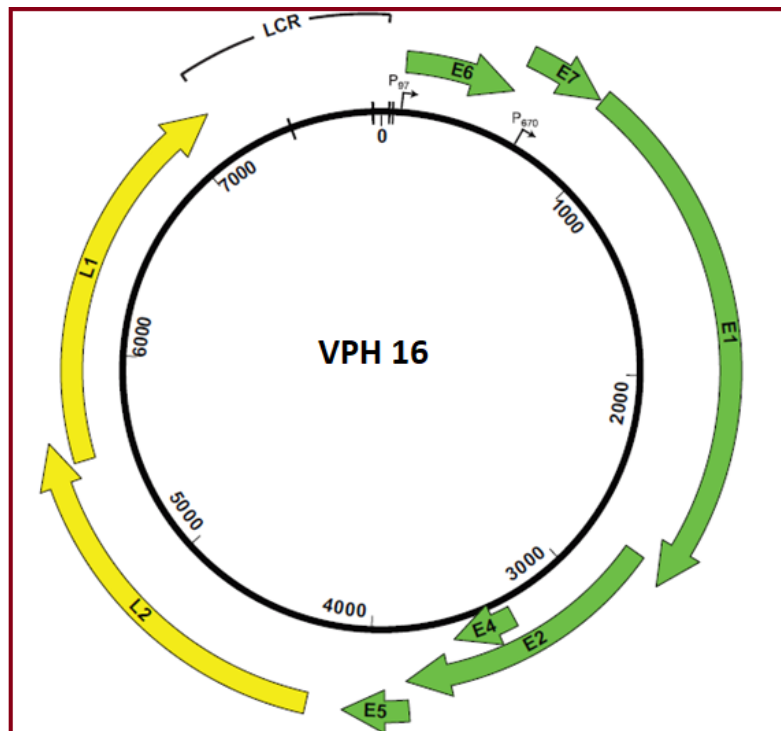


Figura 3: Mapa genómico de VPH 16, genoma doble hebra de 7904 pb. Se señalan los promotores P₉₇ y P₆₇₀ para la expresión de genes tempranos y tardíos (E y L) y la región larga de control (LCR). Adaptado de Fields 6ta edición.

La región temprana de aproximadamente 4 kb posee genes que codifican proteínas reguladoras y proteínas encargadas del inicio de la replicación del ADN (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7). La región tardía de unos 3 kb de extensión posee genes que codifican las proteínas L1 y L2 que conforman la cápside viral. Existe también, una región no codificante de aproximadamente 1 kb que se denomina región de control (LCR, del inglés *long control region*) que contiene elementos de control de la transcripción (Bernard et al. 2010; Zheng et al. 2006) (tabla 1).

Tabla 1: Proteínas del virus del papiloma humano y funciones asociadas. Adaptado de Santos-Lopez et al. 2015.

Tipo de proteína	Nombre	Funciones asociadas
No estructurales	E1	Funciones de helicasa, participa en la replicación
	E2	Esencial para replicación y transcripción viral, segregación genómica y encapsidación del virión
	E4	Regulación de la expresión de genes tardíos, control de la maduración viral y salida de viriones
	E5	Estimulación de actividad E6 y E7
	E6	Inducción de la degradación de p53, inhibición de apoptosis, evasión de la respuesta inmune y contribución en la persistencia de la infección viral
	E7	Inducción de la degradación de pRB, aumento de la actividad de cinasas dependientes de ciclinas; afectación de la expresión de genes de fase S por interacción directa con factores de transcripción E2F y con histona desacetilasa; contribución a la evasión de la respuesta inmunitaria
	Estructurales	L1
L2		Conformación de la cápside. Unión del virión a la célula, entrada a la célula y transporte al núcleo. Liberación del genoma y el ensamblaje de viriones

2.4. Ciclo vital de VPH

Dado que la replicación del genoma del VPH ocurre en las capas diferenciadas del epitelio éste debe inducir la síntesis de ADN en células comprometidas en la diferenciación terminal (Graham et al. 2017).

Los VPH son especie específicos y tienen tropismo por las células epiteliales escamosas. La infección productiva se puede dividir en etapas tempranas y tardías asociadas a las etapas de diferenciación celular. El ciclo vital del VPH está íntimamente ligado al programa de diferenciación celular. Para generar una infección persistente el virus debe infectar células basales ya que éstas son las únicas capaces de sufrir división celular. El ciclo celular que se detalla a continuación se basa fundamentalmente en las características de VPH 16 por ser el más estudiado (figura 4).

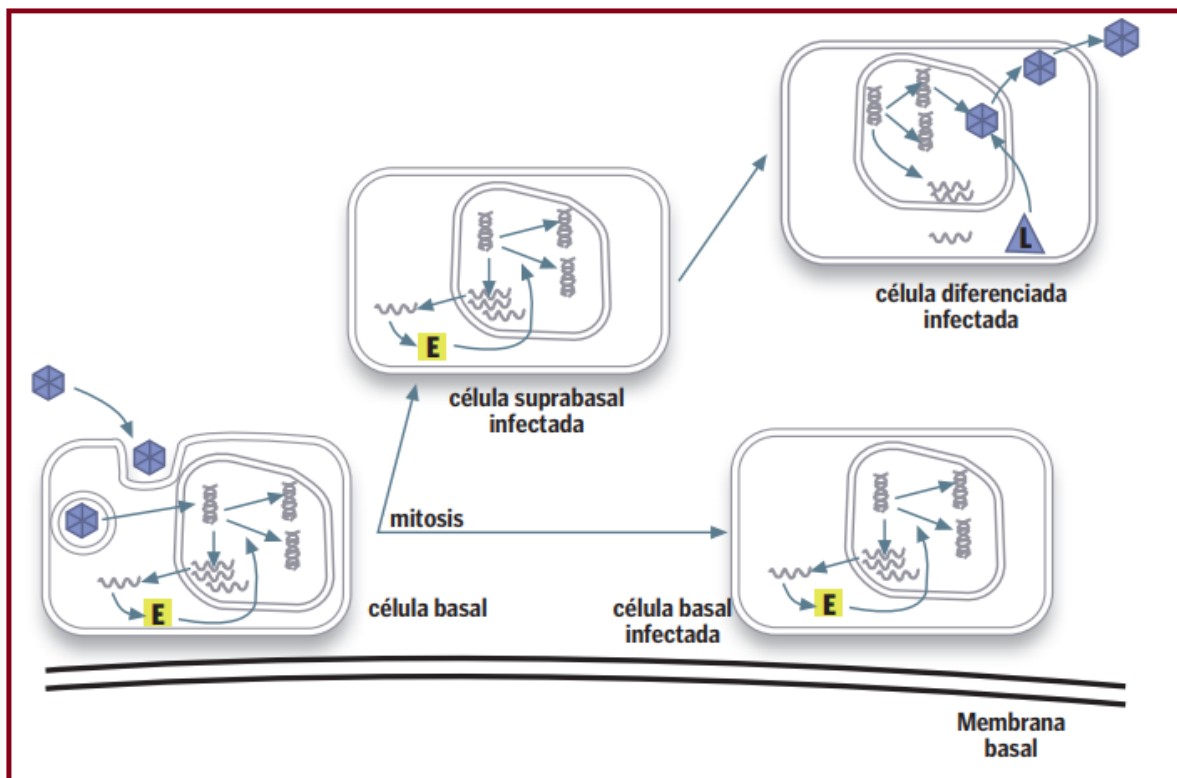


Figura 4: Ciclo viral de un papilomavirus. Fuente: Arroyo, 2010. E: genes de transcripción temprana. L: genes de transcripción tardía.

2.4.1. Fases del ciclo de replicación

2.4.1.1. Fase de entrada viral:

Los VPH ingresan al epitelio a través de micro abrasiones (figura 5). En el caso de los genotipos de alto riesgo (VPH-AR) es necesaria la infección de células basales epiteliales para producir una infección activa. Los receptores de la proteína L1 se unen a receptores celulares HSPG (heparin sulfato proteoglicanos). La unión de ambos receptores produce cambios conformacionales exponiendo a componentes de la proteína viral L2 que implica la unión del extremo N-terminal a un segundo receptor celular. El ingreso de VPH mediante endocitosis permite la entrada del genoma episomal al núcleo celular 24 horas después de la unión de VPH con los receptores celulares (Day et al. 2004).

2.4.1.2. Fase temprana:

Luego de la entrada al núcleo comienza la transcripción temprana (figura 5). En esta etapa de replicación y mantenimiento del genoma se generan entre 50 y 100 copias episomales por núcleo. Se cree que este bajo número de copias impide la activación del sistema inmune a nivel local (Maglennon et al. 2012).

Los VPH poseen promotores responsables de la expresión de proteínas en las primeras etapas del ciclo viral, como p97 en el caso de VPH16. Las oncoproteínas E6 y E7 se expresan en etapas tempranas de la replicación y su importancia radica en el mantenimiento del genoma episomal (E6) estimulando el pasaje de la fase G1 a S del ciclo celular (E7). Además, estas oncoproteínas, fundamentalmente E7, estimulan la actividad de los genes de control del crecimiento celular e inhibe factores de transcripción celular. Las proteínas E6 y E7 actúan cooperativamente en evadir la detección del sistema inmune (Graham et al. 2017; Munger et al. 2002).

2.4.1.3. Fase tardía:

La fase tardía implica la replicación del genoma viral, su empaquetamiento y la formación de viriones (figura 5). En esta etapa aumenta la expresión de E1 y E2. Así mismo se activa un promotor tardío (P670 en VPH 16) lo que resulta en el aumento de la expresión de E4 y E5 (Graham et al. 2017. King et al. 2010).

Luego de la amplificación del genoma viral, el ciclo continúa con la expresión de las proteínas estructurales L1 y L2 lo que resulta en el ensamblaje de las partículas infecciosas en las capas superiores del tejido infectado, permitiendo así su liberación al medio extracelular (Graham et al. 2017).

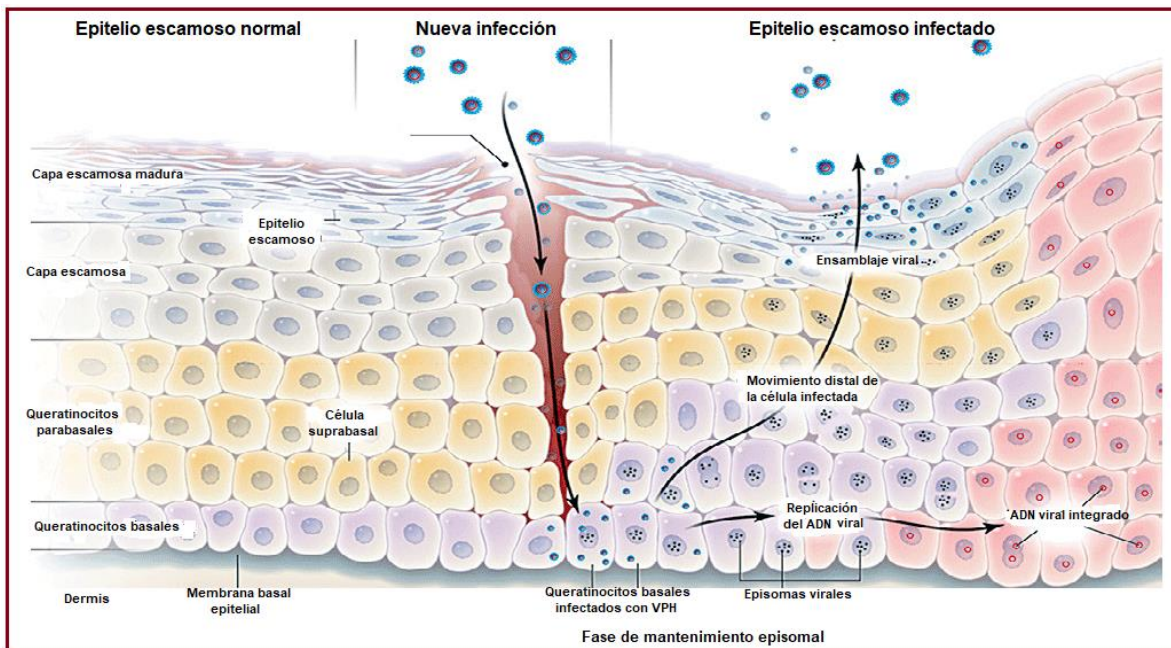


Figura 5: Ciclo vital de VPH en el epitelio escamoso. VPH infecta los queratinocitos basales a través de microabrasiones en la piel o la mucosa; con replicación de ADN viral, el número de copias del virus se amplifica y continúa una fase de mantenimiento episomal. Las células basales infectadas luego ingresan al compartimento suprabasal. Los genes y la amplificación productiva del genoma a altos números de copias se activan en los compartimentos de diferenciación terminal. El ensamblaje viral ocurre en la capa superior del epitelio escamoso, luego se liberan viriones y pueden infectar el tejido adyacente. Adaptado de Kahn et al. 2009.

2.5. VPH alto y bajo riesgo

Los *Alfapapillomavirus* contienen únicamente tipos virales que son patógenos para el ser humano y se subdividen en cutáneos y mucosos (Burk et. al 2013). Aquellos tipos mucosotrópicos están involucrados en el desarrollo de enfermedades tanto benignas (condilomas, papillomatosis respiratoria) como malignas como por ejemplo cáncer cervical u otras localizaciones como pene, ano, cabeza y cuello.

Según el potencial oncogénico se clasifican en VPH de bajo riesgo (VPH BR) o VPH de alto riesgo (VPH AR), existen, además, algunos genotipos de VPH que en la actualidad se clasifican como VPH de posible alto riesgo (VPH PAR)

debido a que no hay evidencia suficiente de su vinculación con las neoplasias intraepiteliales de alto grado (Tabla 2).

Los VPH- AR se asocian a lesiones intraepiteliales de alto grado, precursoras de carcinoma escamoso, más frecuentemente, en cuello uterino y ano. Mientras que los VPH- BR están implicados en verrugas genitales y en otras localizaciones como las papilomatosis laríngeas (Yanofsky et al 2012) (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de los genotipos de VPH de acuerdo con su capacidad oncogénica

Potencial oncogénico	Genotipos	Patologías asociadas a la infección
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Cáncer anogenital, cabeza y cuello
Bajo riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108	Verrugas y condilomas en varias localizaciones
Posible alto riesgo	26, 53, 66, 68, 73, 82	Evidencia limitada acerca de su potencial oncogénico

2.6. Patogenia

2.6.1. Neoplasia intraepitelial anal y cáncer anal invasor

La neoplasia intraepitelial anal (AIN, del inglés *anal intraepithelial neoplasia*) es una lesión premaligna del epitelio escamoso transicional que puede progresar hacia carcinoma escamoso anal luego de haber pasado por sus tres grados en orden de gravedad (AIN I, AIN II y AIN III) (Parés et al. 2006). Siguiendo la clasificación Bethesda (Darragh et al. 2012), las AIN de menor grado (AIN I y AIN II) corresponden citológicamente a lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL, por sus siglas en inglés *low-grade squamous intraepithelial lesion*) mientras que las AIN de mayor grado se corresponden a lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés *high-grade squamous intraepithelial lesion*) (Hoff et al. 2017).

En el cáncer de ano (CA), el VPH infecta la zona de transición entre el epitelio columnar rectal y el epitelio estratificado de la piel (Misa et al. 2018). Existen tres grupos de CA, el cáncer del conducto anal es el más frecuente y se trata de una neoplasia maligna localizada en las proximidades del borde anal y que en la mayoría de los casos (más del 80%) son de origen celular escamoso, el porcentaje restante pertenecen a adenocarcinomas y en menor proporción a melanoma, carcinoma de células pequeñas y tumores metastásicos de otros sitios (Longacre et al. 2008). Esta neoplasia de origen escamoso que se asocia a la infección por el VPH principalmente a los tipos 16 y 18, es la causante del aumento en la incidencia de cáncer anal, es poco frecuente en la población en general, se estima que alcanza al 1%, y se diagnostica mayoritariamente en hombres y mujeres de edad media y avanzada (Lehtinen et al. 2007). Sin embargo, la incidencia de esta patología ha aumentado drásticamente en los últimos 30 años en personas con coinfección de VIH (virus de la inmunodeficiencia humano) y VPH, fundamentalmente en los HSH (HSH, hombres que tienen sexo con hombres, epidemiológicamente se acuña este término a varones que tienen relaciones sexuales anales con varones, independientemente de la identidad sexual y de género) (Yang et al. 2012). En algunos estudios han demostrado tasas de infección con VPH superiores al 90% en HSH, VIH positivos (dos Ramos et al. 2011; Machalek et al. 2012).

2.6.2. Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer anal:

Existen otros factores de riesgo que inciden en el desarrollo del cáncer anal como relaciones sexuales anales receptivas, historial de infecciones de transmisión sexual (ITS), número de parejas sexuales, estado de infección por el VIH, valor de CD4, inmunosupresión causada por trasplante de órganos sólidos y tabaquismo (Palefsky et al. 1994, Palefsky et al. 2008, Nelson et al. 2017).

Estos cofactores también son relevantes en el desarrollo de cáncer en otras localizaciones cuyo agente etiológico son los VPH de alto riesgo oncogénico.

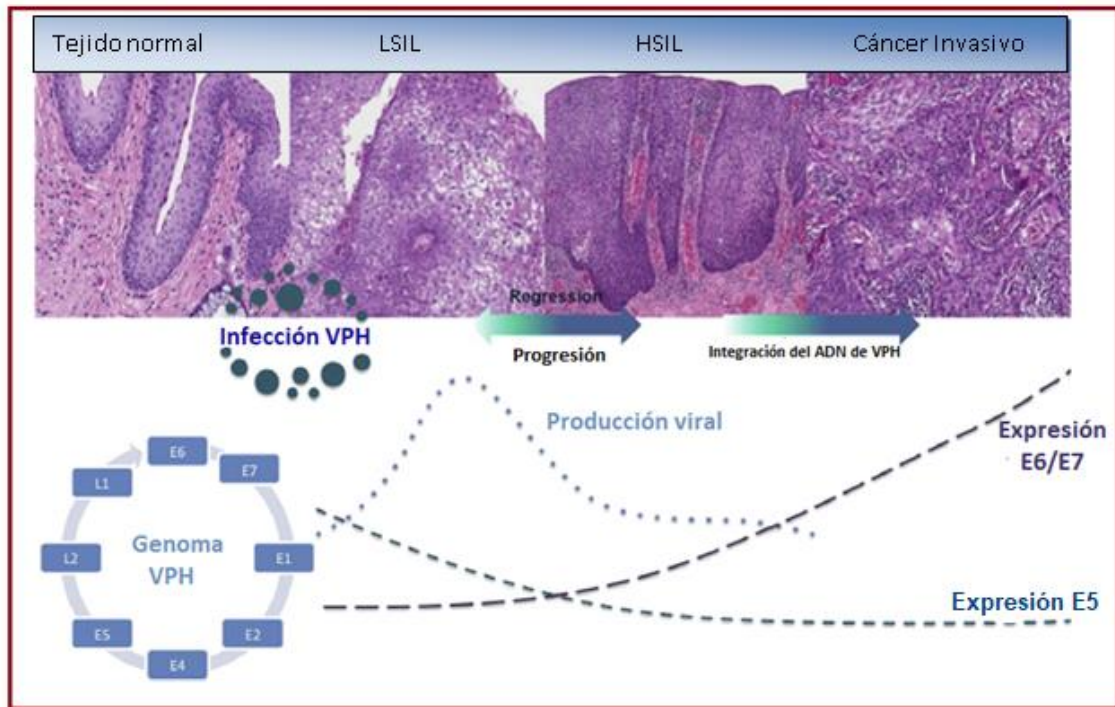


Figura 6: Historia natural de la infección de VPH y progresión desde el tejido normal al cáncer anal. Se observan los cambios progresivos en el epitelio escamoso a través de la pérdida del mecanismo celular apoptótico normal por las oncoproteínas E6 y E7. Adaptado de Hoff et al. 2017.

2.6.3. Condilomas acuminados o verrugas anogenitales.

Las verrugas anogenitales son modificaciones del epitelio no neoplásicos frecuentes en la población general. A nivel mundial la incidencia de verrugas anogenitales ha aumentado en la población sexualmente activa. Los genotipos de VPH-BR implicados en el 90% de los casos son el 6 y 11, siendo el 6 el predominante (Pares et al. 2006). Se pueden ubicar en múltiples localizaciones (ano, pene, vulva, vagina, útero) y en general se auto resuelven rápidamente en individuos inmunocompetentes, mientras que algunos requieren de tratamientos que varían de acuerdo con la localización de éstas (Leszczyszyn J. et al. 2014).

2.6.4. Otras neoplasias asociadas a la infección por VPH mucosos

La infección por VPH se asocia también a otras neoplasias anogenitales como lo son el cáncer de cuello de útero, cáncer de vagina y vulva, cáncer de pene.

El cáncer de cuello de útero (CCU) es el segundo más frecuente en mujeres a nivel mundial, asociado en 100% de los casos a la infección persistente por VPH principalmente de los subtipos 16 y 18 que corresponden al 70% de los casos. Al igual que en el cáncer de ano, existen cofactores que influyen en el desarrollo del CCU, como lo es la coinfección con VIH, inmunosupresión por otras causas, uso de anticonceptivos orales, edad de la primera gesta, historia de tabaquismo e historia de infecciones de transmisión sexual.

Los cánceres de vagina y vulva se asocian aproximadamente en el 40% de los casos a la infección persistente de VPH oncogénicos, y son más frecuentes en mujeres VIH positivas (Mandell et al. 2015) (Bradbury et al. 2016)

El cáncer de pene se relaciona a la infección por VPH-AR en más del 20% de los casos, donde los genotipos 16 y 18 fueron detectados en más del 60% de estas neoplasias (Kidd et al. 2017).

Existen, además, neoplasias ubicadas en otras localizaciones anatómicas íntimamente relacionadas a la infección por este virus, es el caso del cáncer de cabeza y cuello y la papilomatosis respiratoria recurrente.

El cáncer de cabeza y cuello puede ser derivado de múltiples causas y existen varios tipos. Específicamente el cáncer escamoso de orofaringe se trata de un tipo de neoplasia de alto grado, que representa aproximadamente el 40% de estos cánceres, directamente relacionado con la infección por VPH-AR principalmente por el genotipo 16 (Montero P. 2018). En los últimos 20 años ha aumentado significativamente la incidencia de tumores asociados a la infección por VPH en diferentes localizaciones como orofarínge, especialmente en hombres jóvenes de países desarrollados (Graham 2017).

La papilomatosis respiratoria recurrente se asocia en todos los casos a la infección de laringe por parte de VPH-BR fundamentalmente los genotipos 6 y 11. Se trata de una patología detectada en niños a edades tempranas y en

adultos. Esta enfermedad puede ser recurrente y en algunos casos puede sufrir una transformación maligna (Sahba et al. 2013).

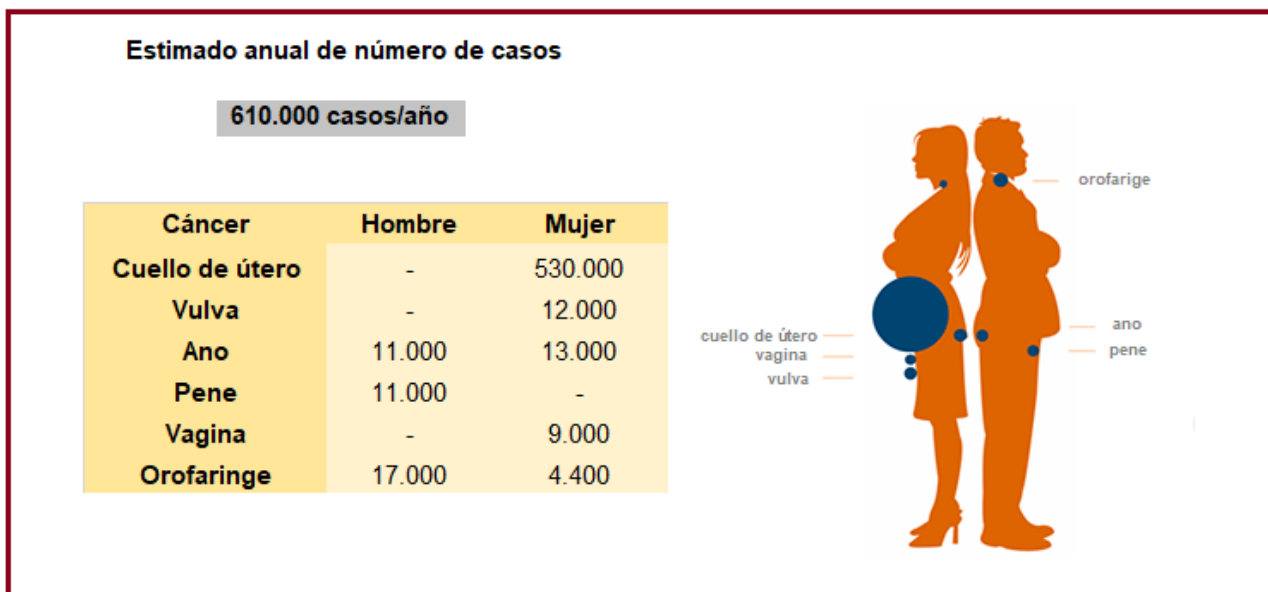


Figura 7: Número de casos anuales de cáncer asociados a VPH en 2012. Fuente: HPV information centre: <https://hpvcentre.net/hpvatglance.php>

2.7. Infección por VPH en el canal anal de HSH VIH negativos y positivos.

La infección por VPH es la principal causa de CA en HSH, asociándose en esta población hasta en un 98% de los casos (Daling et al.2004) fundamentalmente por los genotipos 16 y 18.

En las últimas décadas se ha registrado a nivel mundial un aumento en la incidencia de CA especialmente en esta población (Lehtinen et al. 2007). Además, los HSH tienen un mayor riesgo de padecer lesiones anales intraepiteliales escamosas de alto grado HSIL (Machalek et al. 2012) especialmente aquellos infectados con VIH, con tasas hasta 60 veces superior que los VIH negativos (Palesfky et al. 1998; Yang et al. 2012, Torres et al. 2015).

Asimismo, los HSH VIH positivos presentan mayor incidencia de infecciones por VPH 16 e infecciones múltiples por otros VPH AR que tienen mayor

prevalencia entre los 20 y 40 años con menores tasas de aclaramiento (Hidalgo-Tennorio et al. 2017; Machalek, et al. 2012; Rovelli et al. 2017). Se ha demostrado también la infección anal con genotipos de los géneros Beta y Gamma papilomavirus (Torres et al. 2015).

2.8. Epidemiología de cáncer anal en Uruguay

De acuerdo con los datos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, en Uruguay la incidencia de cáncer anal para el periodo 2011-2015 en mujeres fue de 1,24 cada 100.000 habitantes mientras que en hombres es de 1,03 cada 100.000 habitantes con un total de 110 nuevos casos, registrándose un aumento con respecto al periodo anterior 2004-2008.

En Uruguay existen datos limitados sobre la prevalencia de lesiones asociada a la infección por VPH en el canal anal de HSH y de las lesiones intraepiteliales asociadas. En nuestro país, no hay datos sobre la prevalencia de infección por VPH en HSH. Un estudio reporta en esta población (donde 10 de 60 participantes eran HSH), una prevalencia del 77% de citología anal anormal (Aguiar et al. 2015). Además, trabajos anteriores realizados en nuestro país en muestras de cérvix uterino reportaron una frecuencia de infección por VPH del 41,9% (Ramas et al. 2013) y de 24,0% (Berois et al. 2014).

Asimismo, no existen datos acerca de los genotipos circulantes de VPH en HSH de Uruguay.

2.9. Variabilidad VPH 16

El genotipo de VPH-AR 16 es el más prevalente a nivel mundial, responsable de los cánceres asociados a la infección por VPH. A pesar de que estos virus son altamente estables gracias a que su genoma es doble hebra de ADN, que en su replicación utilizan polimerasas con capacidad de corrección y que además se replican a baja velocidad (debido a la dependencia de la diferenciación celular del huésped, la variabilidad se puede originar a través de la selección de mutaciones puntuales). Se han evidenciado en los PV variantes intratípicas que difieren en su secuencia nucleotídica del gen L1 en menos de un 2% y hasta un 5% en las regiones menos conservadas como la del gen LCR (de Villiers et al. 2004). El genotipo 16 por ser el causante más relevante del CCU, ha sido históricamente el más estudiado (Bernard et al. 2006).

Un número creciente de investigaciones epidemiológicas, etiológicas y moleculares, sugieren que las variantes del mismo tipo de VPH son biológicamente distintas, con consecuencias patogénicas diferentes. Las variantes de VPH 16 se correlacionan con las distribuciones poblacionales que poseen mayor riesgo de desarrollar cáncer anogenital.

Partiendo del clon referencial secuenciado en 1985 (Seedorf et al. 1985; Myres et al. 1995) a la actualidad, se han identificado numerosas variantes a través del análisis de la región LCR del genoma viral utilizando aislamientos del cervix uterino. Se han diferenciado 5 linajes: europeo (E), asiática (As), asiático-americana (AA) y los linajes africanos (Af1 y Af2).

Las variantes clasificadas de acuerdo con la secuencia de LCR se asocian a diferencias en la capacidad de unión a factores celulares y virales reguladores de la transcripción y replicación que implicaría una modificación en su capacidad transformante (Mendoza et al. 2013; Sichero et al. 2012).

La variante AA se asocia a mayor oncogenicidad que podría asociarse a una actividad aumentada de las proteínas E6 y E7, y mayor capacidad para estimular la degradación de P53 (Berumen et al. 2001).

Debido a que las diferentes variantes de VPH 16 pueden tener implicancias clínicas de relevancia, existe interés a nivel mundial por el estudio de sus propiedades biológicas de las diferentes variantes del genotipo 16.

Estudios caracterizaron sublinajes nuevos dentro de los linajes AF1, AF2, AA, As y E a partir de la secuenciación de fragmentos de las regiones E6 y/o LCR. Estas nuevas variantes se clasificaron como EUR, As, AFR1a, AFR1b, AFR2a, AFR2b, NA, AA1 y AA2 (Cornet et al. 2012). Además, otros trabajos recientes reconocen los linajes A (también conocido como linaje europeo-asiático, EAs), consistente en los sublinajes A1, A2, A3, (conocido anteriormente como europeo, linaje E) y A4 (anteriormente conocido como asiático); Linaje B (conocido anteriormente como linaje africano-1 (Afr-1)), que consta de al menos dos sublinajes B1 (Afr-1a) y B2 (Afr-1b); linaje C (conocido como Afr-2, que anteriormente consistía en sublinajes Afr-2a y Afr-2b, y linaje D (asiático-americano/Norteamericano, linaje AA / NA), que consiste en al menos los sublinajes, D1 (conocido anteriormente como linaje norteamericano (NA)), D2 (conocido anteriormente como linaje Asiático-Americano-1 (AA1)) y D3 (linaje AsianAmerican-2 (AA2)) (Awua et al. 2017).

Dichos trabajos de clasificación estandarizada de estas variantes podrían resultar importantes para futuros estudios epidemiológicos y biológicos del potencial oncogénico de los distintos linajes de VPH16.

2.10. Prevención

2.10.1. Vacunas

Los avances en el estudio de la patogenia de VPH hicieron posible que se desarrollaran vacunas, específicamente contra los tipos virales más prevalentes a nivel mundial (VPH 16, 18, 6 y 11) causantes fundamentalmente de cáncer de cuello de útero y verrugas genitales. Las vacunas recombinantes actualmente disponibles en el mercado se componen de partículas similares a virus (VLPs, del inglés *Virus Like Particles*) y fueron desarrolladas por ingeniería genética mediante la expresión en vectores virales de la proteína L1 viral y que por autoensamblaje conforman las cápsides vacías.

Actualmente existen en el mercado tres vacunas disponibles, Cervarix®, Gardasil® y Gardasil 9® (tabla 3). Asimismo, se tiende a nivel mundial hacia la aplicación de las vacunas cuadrivalente y nonavalente. A octubre de este año, 98 países de todo el mundo han incorporado la vacuna contra VPH (OMS 2019).

Se ha demostrado, además, reacción cruzada de las vacunas bivalente y cuadrivalente por lo que protegerían en menor medida contra otros tipos del virus como 31, 33, 45, 52, 58 y 59 (Cortés et al. 2010; Wheeler et al. 2009).

En el año 2010 se aprobó el uso de la vacuna cuadrivalente en hombres jóvenes como profilaxis de CA y condilomas (Giuliano et al. 2011) Además, existen estudios que muestran que la vacuna contra VPH es segura y altamente inmunogénica en HSH infectados con VIH (Sadler et al. 2016; Wiikin et al. 2010).

Las vacunas Cervarix® y Gardasil® indican su uso en personas de entre 9 y 26 años, especialmente antes del inicio de la actividad sexual. En Uruguay, el Ministerio de Salud Pública (MSP) incorporó al calendario nacional de vacunas en 2013 la vacuna cuadrivalente contra VPH en calidad de ofrecida mediante firma de consentimiento informado para las adolescentes de 12 años, en esquema de tres dosis (0, 2 y 6 meses). En 2015 la vacuna pasó a ser recomendada, situación que continúa hasta la actualidad. Durante el año 2017 se modificó el esquema de vacunación pasando de tres a dos dosis (0 y 6 meses) para las adolescentes menores de 15 años. Además, en el año 2018 el MSP publica la Guía Nacional de Vacunación en Situaciones Especiales donde se contempla la vacunación gratuita contra VPH en HSH (Picón et al. 2018). Se ha demostrado la disminución de lesiones de alto grado HSIL en HSH inmunizados con la vacuna cuadrivalente. En mayo de 2019 se incorporó la vacunación gratuita contra VPH en varones de 11 y 12 años y a aquellos que se encuentran en 6° año escolar, en esquema de 2 dosis.

Tabla 3: Tipos de vacunas contra VPH disponibles a nivel mundial.

Nombre comercial	Laboratorio productor	Tecnología	Adyuvante	Subtipos
Cervarix	GlaxoSmithKline (GSK)	Recombinante VLP L1	3-O-desacil-4'- monofosforil lípido A (MPL)	16, 18
Gardasil	Merk Sharp & Dohme Corp	Recombinante VLP L1	Sulfato hidroxifosfato de aluminio	6, 11, 16 y 18
Gardasil 9	Merk Sharp & Dohme Corp	Recombinante VLP L1	Sulfato hidroxifosfato de aluminio	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58

2.10.2. Prevención secundaria

La aplicación de técnicas de prevención secundaria es fundamental para el diagnóstico precoz de lesiones anales.

La exploración física y el examen digital ano-rectal son técnicas de cribado costo efectivas que permiten la detección temprana de alteraciones en esa localización (Ong et al. 2016).

La citología facilita el tratamiento o seguimiento de personas con alteraciones en el conducto anal. Se trata de una herramienta básica de cribado, medianamente sencilla e implementable con una sensibilidad que oscila entre el 69 y el 93% (Repiso et al. 2014).

Otras técnicas más invasivas y costosas como la anoscopía de alta resolución que pueden ser utilizadas como tamizaje inicial en pacientes de riesgo o con resultados anormales de citología por PAP anal. Esta técnica altamente especializada permite identificar áreas con displasias y dirigir biopsias e incluso su tratamiento (Vajdic et al. 2005).

Existen técnicas de biología molecular aplicadas para el cribado como la detección de VPH, asimismo éstas resultan controvertidas ya que la sola infección por VPH no indica la presencia de displasia anal (Salit et al. 2010). Sin embargo, otras técnicas moleculares como la detección de ARN mensajeros (ARNm) de VPH puede resultar útil como marcador de progresión de lesiones precursoras marcador diagnóstico de HSIL en personas de riesgo (Sendagorta et al. 2015).

3. HIPÓTESIS



En los últimos años la incidencia de cáncer anal ha aumentado drásticamente a nivel mundial fundamentalmente en los hombres que tienen sexo con hombres VIH positivos. Esta población posee mayor porcentaje de infecciones por VPH de alto riesgo, principalmente genotipo 16, e infecciones múltiples.

Hipótesis: La población de HSH de Uruguay, especialmente aquellos diagnosticados con VIH, tiene alta tasa de infección por VPH en el canal anal por genotipos múltiples y de alto riesgo oncogénico.

4. OBJETIVOS



4.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la presencia del Virus del Papiloma Humano en muestras clínicas del canal anal en HSH, VIH positivos y negativos de Uruguay, así como definir los genotipos circulantes en esta población y de esta forma aportar datos a nivel nacional.

4.2. Objetivos específicos:

1- Detectar por PCR la presencia de VPH en muestras clínicas del canal anal de HSH.

2- Determinar los genotipos circulantes de VPH en esta población mediante técnicas moleculares como RFLP y RLB.

3- Analizar la variabilidad del genotipo VPH 16 presente en las muestras analizadas mediante secuenciación de un fragmento de la región LCR del genoma viral.

5. MATERIALES Y MÉTODOS



5.1. Estrategia de trabajo

Hasta el momento, en Uruguay no existen datos epidemiológicos acerca de la prevalencia de VPH en el canal anal de HSH VIH positivos ni VIH negativos, así como tampoco de los distintos genotipos de VPH circulantes ni de las lesiones precursoras y cáncer anal asociado.

De acuerdo con los objetivos planteados se diseñó un plan de trabajo que incluyó diferentes técnicas de detección y genotipificación de VPH, acordes a las características de la población estudiada (figura 8).

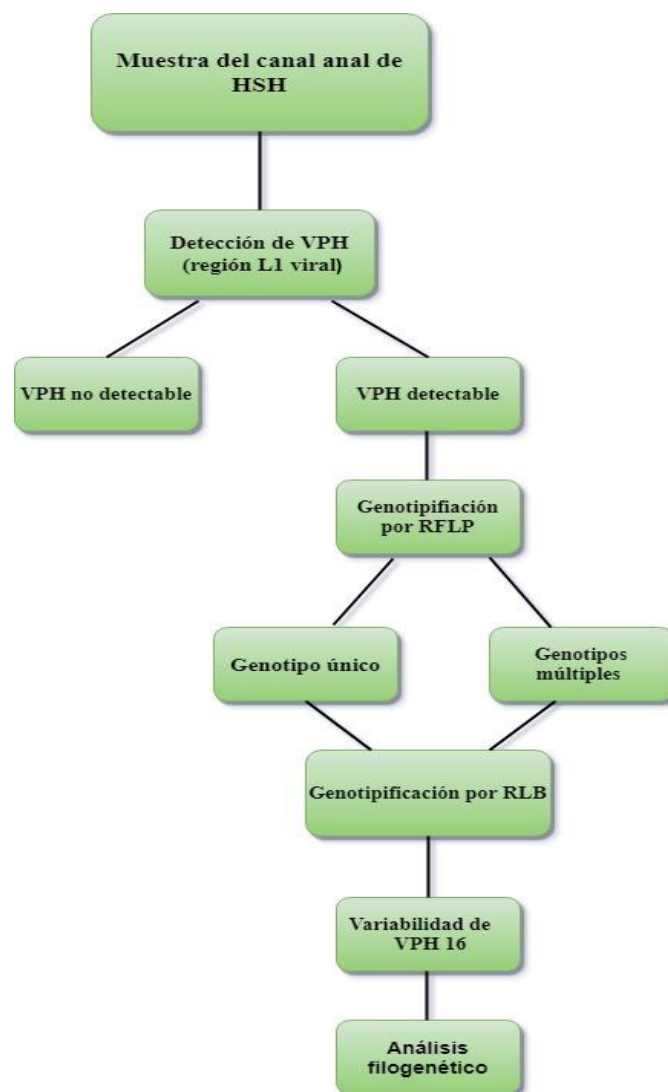


Figura 8: Esquema de la estrategia metodológica diseñada para el presente trabajo.

5.2. Población en estudio:

5.2.1. Criterio de inclusión: Pacientes de sexo masculino, mayores de 18 años, VIH positivos y negativos que refirieron practicar sexo con hombres, tanto relaciones sexuales receptivas como insertivas.

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que presentaron síntomas o signos de patología anorectal al momento de la consulta.

Los pacientes fueron reclutados por dos vías: a través de la referencia de sus médicos tratantes (subsector de salud público o privado) o autorreferidos cuando así lo solicitaron.

El procedimiento de toma de muestras fue realizado por docentes médicos de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdelaR.

Las muestras clínicas se tomaron con cepillo citológico (citobrush) con el fin de obtener células epiteliales del primer tercio del canal anal.

Se realizaron 2 tomas: con la primera se hizo un extendido de células en un portaobjeto para realizar citología con tinción de Papanicolau. En la segunda muestra el citobrush fue sumergido en un tubo cónico conteniendo 1 mL de solución fisiológica estéril (tubo primario), para la detección y genotipificación de VPH mediante técnicas de biología molecular.

5.2.2. Aspectos éticos

El protocolo fue aprobado por el comité de ética de investigación de la Facultad de Medicina, UdelaR (expediente nº 070153-000178-15). Todas las personas incluidas en el estudio firmaron un consentimiento informado previo a la realización de encuesta y toma de las muestras (anexo II).

5.2.3. Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo se utilizaron proporciones y variables continuas en medidas de resumen. Para el análisis bivariado se aplicó la prueba de χ^2 . El valor de significación alfa fue 0,05.

5.3. Muestras clínicas

Las muestras clínicas (en tubo primario) ingresaron al Departamento de Bacteriología y Virología en un plazo no mayor de 3 horas a la toma de la muestra, manteniéndose a 4°C en un tiempo no mayor a 72hs.

Las muestras ingresadas en el laboratorio fueron acondicionadas para su procesamiento: se desprendieron las células epiteliales que estaban adheridas al citobrush con pipeta pasteur estéril, siendo resuspendidas en la solución fisiológica del tubo primario; luego de descartar el cepillo se centrifugó el tubo con el suero fisiológico a 3000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet se suspendió en 500 µL de tampón fosfato salino estéril (PBS de sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*). Una vez obtenida la solución homogénea se colocaron 300 µL en un criotubo (muestra respaldo) y 200 µL en tubo eppendorf para extracción de ADN total. Las muestras se mantuvieron a -70°C hasta su utilización para la detección de VPH y posterior genotipificación.

5.4. Extracción total de ADN

La extracción de ADN total se realizó por columna de sílica con el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN®). De cada muestra se obtuvo 500 µL de extracto de ADN, que se conservaron a -70°C hasta su utilización.

5.5. Detección de genoma de VPH mediante amplificación por PCR de un fragmento de la región L1 viral con cebadores genéricos MY09 y MY11.

Para la detección molecular de VPH se puso a punto una PCR a tiempo final con cebadores consenso degenerados (MY11 y MY09) que amplifican un fragmento de 450 pb de la región L1 del genoma viral (Manos et al. 1989).

Como control de calidad del ADN extraído, se incorporó en la PCR, cebadores específicos (PCO4 y GH20) que amplifican un fragmento de 268 pb del gen de β -Globina humana (tabla 4).

En un volumen final de 25 μ L, fueron colocados 3,7 μ L de extracto de ADN total, 14.2 μ L de H₂O ultra pura libre de DNAsas y RNAsas (Thermo Scientific™), 2,5 μ L de buffer de reacción 10X (sin Mg²⁺ con (NH₄)₂SO₄), 1,25 μ L de MgCl₂ 25 μ M, 1,0 μ L del cebador MY11 50 μ M, 1,0 μ L del cebador MY09 50 μ M, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 0,25 μ L del cebador PCO4 10 μ M, 0,25 μ L del cebador GH20 10 μ M, 0,25 μ L de Taq DNA Polimerasa 5 U/ μ L (Thermo Scientific™). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo Mastercycler® personal (Eppendorf) con las siguientes condiciones generales:

Un primer paso de 5 minutos a 94°C (desnaturalización); 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C; y un último paso de extensión durante 10 minutos a 72°C.

En cada experiencia de PCR se incorporó un control negativo de la reacción con 3,7 de agua libre de RNAsas y DNAsas y un control positivo del mismo volumen con ADN extraído de células SiHa que contienen una copia de genoma de VPH 16.

Tabla 4 Cebadores utilizados para detección de VPH por amplificación de fragmento de 450pb de la región L1 viral.

Cebadores	Dirección	Secuencia [5'a 3']
MY09	Directo	CGTCCMARRGGAWACTGATC
MY11	Reverso	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
PCO4	Directo	CAACTTCATCCACGTTCCACC
GH20	Reverso	GAACAGCCAAAGGACAGGTAC

5.6. Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Las electroforesis se realizaron en las siguientes condiciones: 150 Volts por 30 minutos, con una concentración del gel de agarosa al 1,5% en Buffer TBE (tris, borato, EDTA) 0,5X. Para la visualización de los productos de PCR, fue utilizado el agente intercalante de ácidos nucleicos GoodView™ NucleicAcidStainII (Beijing SBS Genetech Co., Ltd.), el cual fue incorporado en el gel antes de su polimerización. Este agente intercalante una vez unido al ADN, al ser expuesto a luz UV en un transiluminador, emite fluorescencia, permitiendo visualizar en el gel el fragmento de ADN generado por la PCR. Fueron adicionados 2 µL de DNA Gel LoadingDye 6X (ThermoScientific™) a 10 µL de producto de PCR para aumentar su densidad y permitir su visualización antes de la aplicación de dicho producto de PCR en los pocillos del gel; además de permitir ver la migración de los diferentes fragmentos de ADN en el gel durante la electroforesis. En cada corrida electroforética fue utilizado un marcador de peso molecular de 100 pb (ThermoScientific™) para identificar el tamaño de las bandas esperadas para cada una de las reacciones de PCR. Los geles fueron visualizados en transiluminador de luz UV (FOTO/Analyst® Investigator Eclipse) y la fotografía fue registrada mediante el sistema de captura de imagen (FOTO/Analyst® PC Image)

5.7. Caracterización molecular mediante análisis del largo de los fragmentos de restricción (RFLP).

Para la genotipificación de las muestras en las que se detectó ADN de VPH se realizó una nueva amplificación del fragmento del gen L1 con los cebadores MY09 y MY11 con un volumen total de 100 µL. A diferencia de la amplificación del fragmento de L1 para la detección de VPH (ver punto 5.5) en esta PCR no se incluyeron los cebadores PCO4 y GH20. Así mismo, se conservaron las concentraciones de los reactivos y el ciclado de la reacción debido a que el producto de PCR fue distribuido en 8 alícuotas de 12,5 µL cada una. En cada tubo se adicionó la mezcla de reacción

para la digestión enzimática que incluyó las enzimas de restricción (Thermo Scientific™): BamHI 10U/μL, DdeI 10U/μL, HaeIII 10U/μL, HinfI 10U/μL, PstI 10U/μL, RsaI 10U/μL y Sau3AI 10U/μL, en el tubo 8 se colocó el producto de PCR sin enzimas de restricción. Todos los tubos fueron rotulados del 1 al 8 manteniendo el orden de las enzimas para la posterior lectura de los resultados (Tabla 5). Una vez adicionada la mezcla de restricción se homogeneizó suavemente y se microcentrifugó durante 10 segundos. Posteriormente se incubó la mezcla durante 3-4 horas a 37°C en baño de agua destilada.

La visualización de los productos de restricción se realizó con igual metodología del punto 5.6 a 150 Volts por 1 hora y con una concentración del gel de agarosa al 3,0% en Buffer TBE 0,5X. El análisis de los patrones de RFLP se llevó a cabo de acuerdo con el mapa de restricción de referencia (Bernard et al 1994) (anexo I).

Tabla 5: Protocolo de RFLP. El orden de las enzimas se debe mantener para la correcta lectura de los resultados.								
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
Enzima de restricción	BamHI	DdeI	HaeIII	HinfI	PstI	Rsa I	Sau 3AI	Control
Producto PCR	12uL	12uL	12uL	12uL	12uL	12uL	12uL	12uL
H₂O (calidad molecular)	5.3uL	5.3uL	5.3uL	5.3uL	5.3uL	5.3uL	5.3uL	8.0uL
Buffer de enzima	2.0uL	2.0uL	2.0uL	2.0uL	2.0uL	2.0uL	2.0uL	X
Enzima	0.7uL	0.7uL	0.7uL	0.7uL	0.7uL	0.7uL	0.7uL	X

5.8. Genotipificación por PCR utilizando cebadores BSGP5+/6+biot seguida de Hibridación Reversa en Línea (RLB).

5.8.1 PCR con cebadores BSGP5+/6+biot

Para la genotipificación de las muestras de cepillado anal se realizó una PCR seguida de hibridación reversa en línea (RLB, reverse line blot de sus siglas en inglés). La PCR que utiliza los cebadores BSGP5+/6+Biot amplifica un fragmento de aproximadamente 140 pb dentro del gen L1 viral. Esta región es altamente

conservada permitiendo detectar varios tipos de VPH en una sola reacción. La biotilización del pool de cebadores permite la tipificación mediante RBL.

Esta técnica fue llevada a cabo en dos pasantías efectuadas en el Servicio de Virus Oncogénicos de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina. Las actividades fueron realizadas en el marco de las tareas del laboratorio receptor como laboratorio regional de referencia de VPH para Latinoamérica. Esta técnica, cuyo sistema fue avalado por la Global HPV LabNet de la Organización Mundial de la Salud (OMS), permite la detección y caracterización de VPH en muestras con múltiples infecciones. En el ensayo se pueden identificar hasta 37 genotipos de VPH (6,11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 y CP6108) en una misma muestra a través de oligosondas específicas.

Esta técnica se realiza, partiendo del producto de una PCR en un volumen final de 50 μL conteniendo, 20,55 μL de H_2O , 5 μL de Buffer de reacción (sin Mg^{2+} con NH_4^+), 7,0 μl de MgCl_2 25 μM , 5,0 μL , dNTPs 2mM, 1,25 μL Gp5+ 20 μM , 1,0 μL del pool de cebadores BSGp6+ 20 μM biotilado, 1,5 μL cebador BSGp6+ 10 μM biotilado, 2,0 μL del pool de cebadores BSGp 6+ 10 μM biotilado, 1,5 μL de pool de cebadores Globina MS3/MS10 10 μM biotilado (tabla 6), 0.2 μL de enzima Taq Polimerasa 5U/ μL (Thermo Scientific™) 10 μL de extracto ADN.

Los productos de PCR fueron conservados a -20°C hasta su utilización para la genotipificación por RLB.

Tabla 6: Composición del pool de cebadores utilizado en PCR para amplificación de fragmento de región L1 viral previa a RLB

Cebadores marcados con biotina en el extremo 5´		
Nombre	Dirección	Secuencia [5'a 3']
Bio-GP6+	Reverso	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C
Bio-BSGP6+-b	Reverso	GAA AAA TAA ATT GTA AAT CAT ACT AC
Bio-BSGP6+-c	Reverso	GAA AAA TAA ATT GCA ATT CAT ATT C
Bio-MS10 (β Globina)	Reverso	AGA TTA GGG AAA GTA TTA GA
Cebadores no marcados		
Nombre	Dirección	Secuencia [5'a 3']
GP5+	Directo	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
BSGP5+-2	Directo	TTT GTT ACT GTT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-3	Directo	TTT GTT ACT GTT GTI GAT ACC AC
BSGP5+-4	Directo	TTT GTT ACT TGT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-5	Directo	TTT TTA ACT GTT GTI GAT ACT AC
BSGP5+-6	Directo	TTT GTT ACT GTG GTA GAC ACT AC
BSGP5+-7	Directo	TTT GTT ACA GTI GTA GAC ACT AC
BSGP5+-8	Directo	TTT GTT ACA GTI GTA GAT ACC AC
BSGP5+-9	Directo	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACC AC
MS3 (β Globina)	Directo	AAT ATA TGT GTG CTT ATT TG

5.8.2. Hibridación reversa en línea (reverse line blot, RLB)

La tipificación de VPH por hibridación reversa se realizó en tres pasos. En el primer paso las oligosondas específicas para la detección de 36 tipos de VPH y Globina humana utilizada como control de extracción y sintetizadas con un grupo C6 amino terminal en 5´ que se unen covalentemente a una membrana Biotinylated C activada, cargada negativamente. En el paso siguiente los productos de PCR diluidos y desnaturalizados son puestos en contacto con las oligosondas específicas en la membrana de hibridación. En el tercer paso se procede al revelado de la placa radiográfica en el cuarto oscuro en presencia de luz roja. En el último paso se disocia el producto de PCR hibridado de la membrana, luego de la regeneración de

la membrana ésta puede reutilizarse hasta un máximo de 10 veces aproximadamente (figura 9).

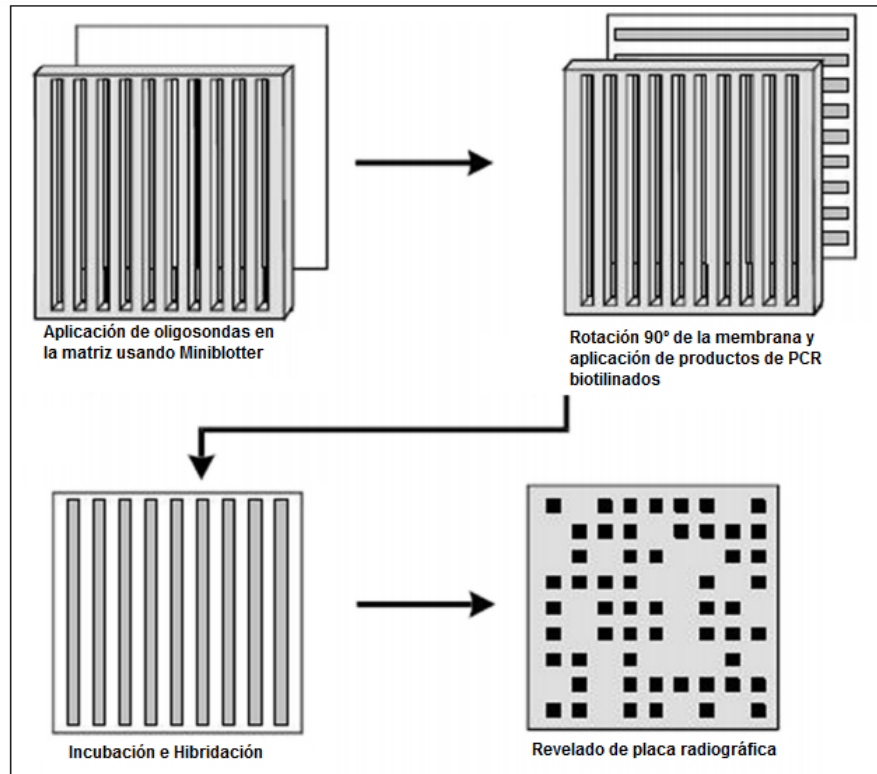


Figura 9: Esquema ilustrativo del método de hibridación inversa en línea. Adaptado de Bluth M 2013.

5.9. Análisis de la variabilidad de VPH 16

5.9.1. Muestras analizadas

De un total de 34 muestras analizadas mediante RLB en las que se detectó VPH 16, 18 fueron seleccionadas (según la calidad de las secuencias obtenidas) para el análisis de variabilidad a través de la amplificación y secuenciación de un fragmento de 364 pb de la región LCR del genoma viral.

5.9.2. Amplificación, purificación y secuenciación de un fragmento de la región LCR del genoma viral

Para el análisis de variabilidad de VPH 16 en primera instancia se realizó la amplificación de un fragmento de 364 pb de la región LCR del genoma de VPH 16 por PCR con cebadores específicos descrito por Ho, L. et al. 1991 (Tabla 7).

La PCR se realizó en un volumen final de 25 μL . Fueron colocados 16,45 μL de H_2O libre de DNAsas y RNAsas (calidad para biología molecular), 2,5 μL de buffer de reacción 10X (sin Mg^+), 0,75 μL de MgCl_2 25 μM , 0,50 μL del primer LCRR 10 μM , 0,50 μL del primer LCRF 10 μM (tabla 7), 0,50 μL de dNTPs, 0,10 μL de Platinum Taq DNA Polymerasa (InvitrogenTM, USA) y 3,7 μL de extracto de ADN total.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo Mastercycler® personal (Eppendorf) con las siguientes condiciones generales:

Un primer paso de 5 minutos a 94°C de desnaturalización; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C; y un último paso de extensión durante 10 minutos a 72°C.

En cada experiencia de PCR se incorporó un control negativo de la reacción con 3,7 de agua libre de RNAsas y DNAsas y un control positivo del mismo volumen con ADN extraído de células SiHa.

Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% como se especifica en el punto 5.6.

Luego de observar el fragmento con el tamaño esperado (364 pb), se prosiguió con la purificación del producto amplificado de ADN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PureLink™ PCR Purification Kit, Invitrogen™). Los amplicones purificados fueron secuenciados en ambas direcciones con los cebadores utilizados en la PCR. Esto fue llevado a cabo por el Servicio de Secuenciación de MacroGen Korea®.

Tabla 7: Cebadores utilizados en PCR para amplificación de fragmento de región LCR de VPH		
Nombre	Dirección	Secuencia [5'a 3']
LCRF	Directo	GGG GTACCTCGGTTGCATGCTTTTTTGGC
LCRR	Reverso	GGTCT AGACGGTTTGCACACACCCATGT

5.9.3. Análisis filogenético

Los electroferogramas obtenidos en la secuenciación fueron analizados para la obtención de las secuencias consenso de cada muestra mediante el paquete bioinformático SeqMan v.7.0.0 (Burland et al. 2000).

Las secuencias resultantes fueron analizadas con el programa BLAST (del inglés Basic Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa Clustal, con secuencias de VPH 16 de distintas regiones del mundo, buscando los prototipos y/o secuencias referenciales de cada linaje de VPH16, extraídas de GenBank en base a las referencias bibliográficas citadas anteriormente, que abordan la variabilidad de este genotipo (Benson et al. 2013).

Posteriormente se realizó el análisis filogenético utilizando el software MEGA 6.1 (Tamura et al. 2013) con el método Kimura-2 parámetros, con el modelo Neighbour-Joining de parámetros como modelo de sustitución nucleotídica, con valores de bootstrap determinados cada 1000 réplicas.

6. RESULTADOS



6.1. Caracterización de la población analizada

Fueron incluidas en el estudio 126 personas, con una mediana de edad de 33 años (IC_{25%-75%} 24-39 años) tanto del género masculino como mujeres trans que refirieron practicar sexo anal receptivo u otras prácticas sexuales anales. Los participantes pertenecen tanto al subsector público (60%) como al subsector privado (40%) de atención en salud. Además, del total de participantes 16 se recitaron al año de la primera toma de muestra. A estas personas en seguimiento se les realizó toma de segundas y terceras muestras las cuales fueron analizadas mediante técnica de PAP y detección de VPH por PCR BSGP5+/6+biot seguida de RLB.

La mediana de edad de inicio de las relaciones sexuales fue de 17 (6-40) años con una media de parejas sexuales en los últimos 6 meses de 17 y 173 durante toda la vida.

El 65.87% (83 personas) tenían infección por VIH, el 85% de estas recibían tratamiento antirretroviral.

6.1.1. Citología

La citología anal mediante la técnica con tinción de Papanicolau fue realizada por el Laboratorio Conjunto de PAP de la Red Integrada de Efectores Públicos de Salud (RIEPS) a 113 muestras de las cuales 13 fueron insatisfactorias para su procesamiento. De las 100 restantes, 29 fueron normales (29%), 71 resultaron anormales (71%), 29 presentaron células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) (29%), 37 fueron de bajo grado L-SIL (37%) y 5 de alto grado (H-SIL, ASC-H) (5%).

6.2. Calidad de las muestras

La aptitud de las muestras para PCR se analizó mediante la amplificación de un fragmento de 268 pb de la β -globina celular (figura 10).

Fueron analizadas 144 muestras (de las cuales 126 eran primeras muestras) de cepillado anal, 139 (96%) fueron aptas para el estudio de detección por amplificación del genoma viral con cebadores genéricos MY09 y M11 genotipificación por PCR seguida por RLB. De las 6 muestras no aptas 4 pertenecen a primeras muestras y las otras dos a una segunda y tercera muestra de personas que participaron del seguimiento.

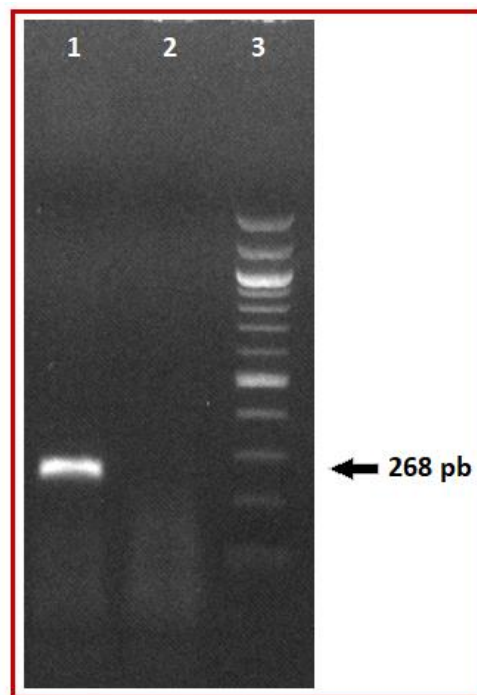


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación por PCR de un fragmento de 268 pb del gen de la β -actina humana como control interno utilizando los cebadores PCO4 y GH20. Carril 1: muestra; carril 2: control negativo; carril 3: marcador de peso molecular de 100 pb.

6.3. Detección por amplificación de fragmento de región L1 viral con cebadores genéricos MY09 y MY11

Se analizaron 144 muestras de cepillado anal, con esta técnica se logró amplificar un fragmento de 450 pb de la región L1 del genoma de VPH en 109 muestras (75%) (tabla 8). En la figura 11 se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para dos muestras analizadas. Se incorporó en el ensayo un control positivo con extracto

de ADN total de células SIHA infectadas con VPH 16 y un control negativo sin templado. Además, se incluyeron cebadores para la amplificación de β -globina celular (control interno).

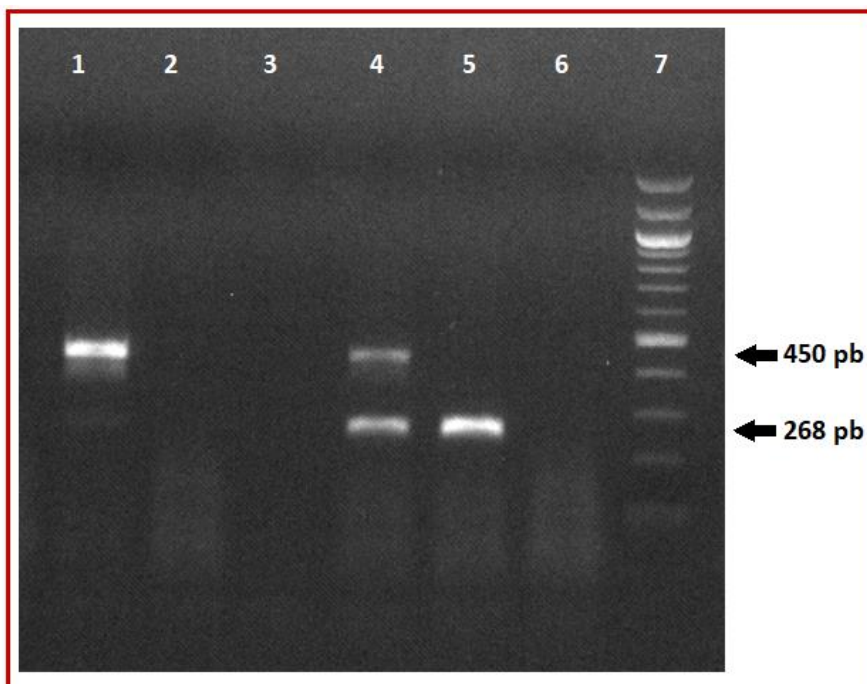


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación por PCR de un fragmento de 450 pb de la región L1 viral utilizando los cebadores genéricos MY09 y MY11 y un fragmento de 268 pb de la β -globina humana utilizando los cebadores PCO4 y GH20. Carril 1: muestra positiva para la detección de VPH; carril 2: muestra no apta para detección; carril 3: vacío; carril 4: control positivo; carril 5: control interno; carril 6: control negativo; carril 7: marcador de peso molecular de 100 pb.

Tabla 8: Resultados de detección de genoma de VPH por PCR con cebadores genéricos MY09 y MY11				
Resultado PCR	Frecuencia por toma de muestra			Frecuencia total en muestras
	Primera toma (n=126) (n%)	Segunda toma (n=15) (n%)	Tercera toma (n=3) (%)	Total (n=144) (n%)
VPH Detectable	97 (76%)	10 (69%)	2 (67%)	109 (75%)
VPH No detectable	25 (21%)	4 (25%)	0 (0%)	30 (21%)
Muestra no apta	4 (3,2%)	1 (6,0%)	1 (33%)	6 (4,0%)
Total	126 (100%)	15 (100%)	3 (100%)	144 (100%)

6.4. Genotipificación de VPH por RFLP

Para la genotipificación de VPH por RFLP (figura 12) fueron seleccionadas y analizadas 36 muestras (se incluyeron 3 muestras pertenecientes a segundas tomas de pacientes en seguimiento) que resultaron positivas previamente por PCR con los cebadores genéricos MY09 y MY11. La selección de las muestras se basó en la intensidad de banda resultante de la PCR de detección de VPH. En la tabla 9 se observan los genotipos identificados a través de esta técnica, y el número de muestras con genotipos múltiples. El análisis de los patrones de restricción se realizó de acuerdo con el mapa de restricción de referencia (Bernard et al. 1994). En el 42% se encontraron infecciones por múltiples genotipos de VPH.

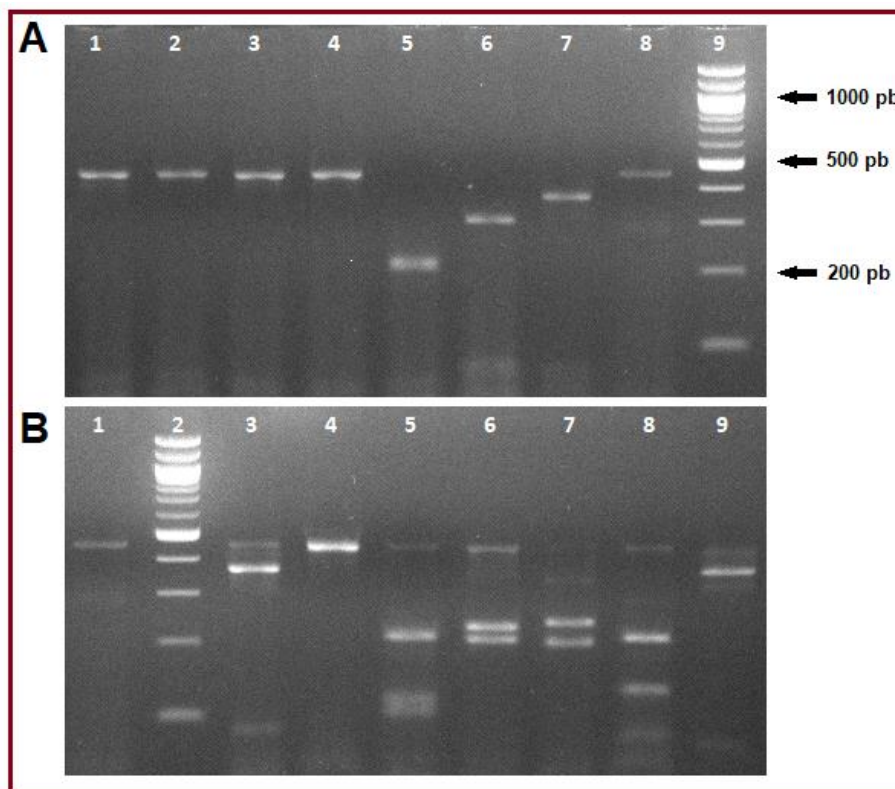


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 3.0% de los productos de RFLP con previa PCR para un fragmento de 450 pb del gen L1 viral utilizando los cebadores genéricos MY09 y MY11 en volumen final de 100 µL. **A:** Muestra con infección simple por VPH16 Carril 1: restricción con BamH1 carril 2: restricción con DdeI; carril 3: restricción con HaeIII; carril 4: restricción con HinfI; carril 5: restricción con PstI; carril 6: restricción con RsaI; carril 7: restricción Sau3AI; carril 8: control sin digerir; carril 9: marcador de peso molecular de 100 pb. **B:** Muestra con infección múltiple por VPH. Carril 1: control sin digerir; carril 2: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3 restricción con BamH1 carril 4: restricción con DdeI; carril 5: restricción con HaeIII; carril 6: restricción con HinfI; carril 7: restricción con PstI; carril 8: restricción con RsaI; carril 9: restricción Sau3AI.

Tabla 9: Genotipos de VPH detectados en 36 muestras del canal anal de HSH por RFLP			
Genotipos	Primera toma (n=33) (n%)	Segunda toma (n=3) (n%)	Total (n=36) (n%)
Infecciones simples			
6	10	1	11
11	5	2	7
16	2	-	2
42	1	-	1
Infecciones múltiples			
6 y 11	2	-	2
16 y otros	1	-	1
11 y otros	1	-	1
Múltiples sin identificar	11	-	11
Total	33	3	36

6.5. Detección y genotipificación de VPH por PCR con cebadores BSGP5+/6+biot seguida de RLB

6.5.1. Detección

Mediante esta técnica se analizaron 126 muestras (primera toma) de las cuales 4 (3,2%) no fueron aptas para el análisis. De las 122 personas participantes cuyas muestras fueron aptas, 117 (96%) resultaron positivas para algún tipo de VPH.

De las personas incluidas en el estudio, 100 tuvieron resultado de citología anal por PAP, de aquellas cuyo resultado fue negativo (n=29) en el 89% se detectó al menos un genotipo de VPH. Y en los casos de citología anormal en el 97% se detectó VPH (96% de los ASCUS, 100% de los LSIL y 80% de los HSIL) (figura 13).

Además, se procesaron por esta técnica muestras pertenecientes a segundas y terceras tomas del canal anal de las personas que participaron del seguimiento.

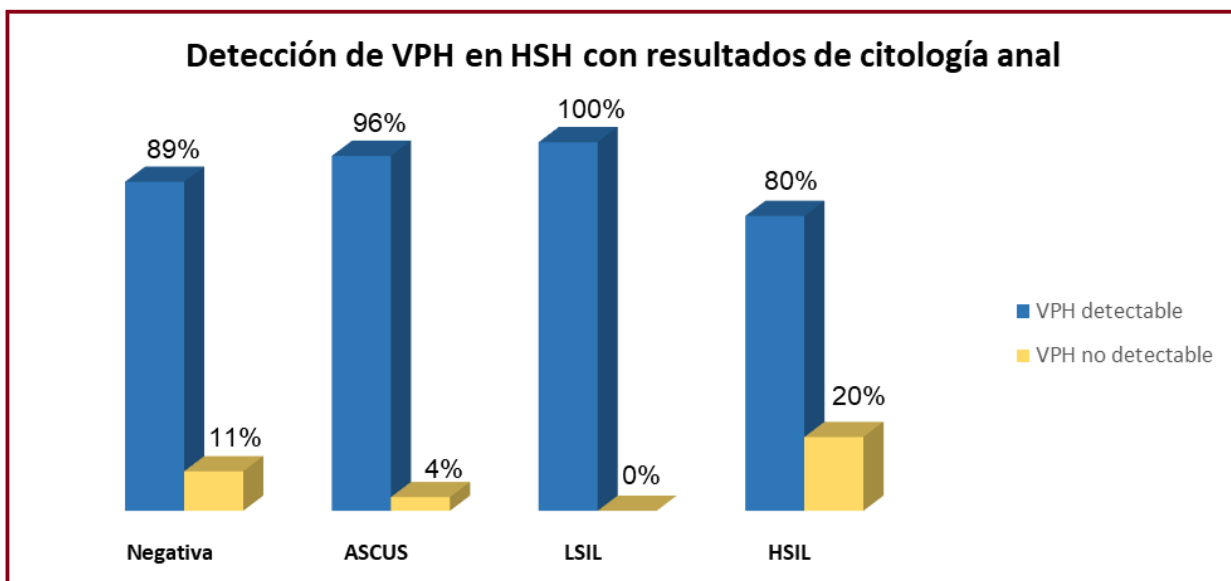


Figura 13: Resultados de detección de VPH por PCR con cebadores BSGP5+/6+biot seguida de RLB en relación con los resultados de citología.

Comparando los resultados de detección obtenidos mediante PCR con cebadores genéricos MY09 y MY11 con la detección por PCR con cebadores BSGP5+/6+biot seguida de RBL se obtuvieron 23 muestras en las que no se detectó VPH a través de la primera técnica que finalmente pudieron ser tipificadas por RLB (tabla 10).

Tabla 10: Resultados comparativos de detección mediante PCR con cebadores genéricos vs PCR BSGP5+/6+biot seguida de RLB	
Resultado	PCR MY09 MY11 / PCR BSGP5+/6+biot
VPH Detectable	97/117
VPH No detectable	25/5
Muestra no apta	4/4
Total de muestras	126

6.5.2. Genotipificación

Fueron identificadas infecciones múltiples en el 74% (86/117) de los participantes positivos para la detección de VPH mediante esta técnica. A modo de ejemplo, en la figura 14 se muestran los resultados de la genotipificación de 40 muestras del canal anal de HSH.

Todas las muestras que resultaron con infecciones múltiples sin determinación de genotipos mediante RFLP fueron resueltas mediante RLB. Además de las 20 muestras con infecciones simples por RFLP el 75% resultaron ser infecciones múltiples mediante RLB.

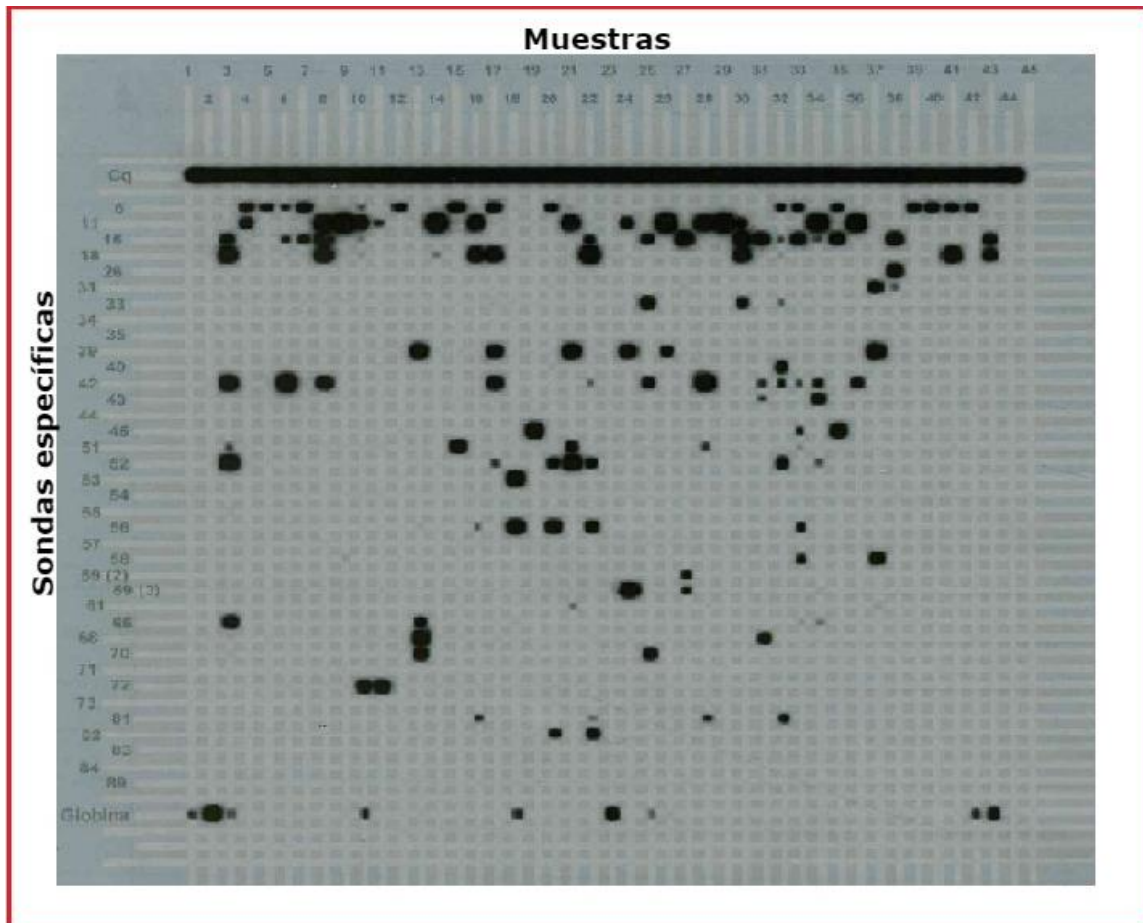


Figura 14: Placa radiográfica resultado de la RLB con previa PCR con cebadores BSGP5+/6+biot. En el carril 45 no se colocó muestra.

Carriles 2 y 23: control de ADN (células no infectadas con VPH). Carriles 2-22: muestras anales positivas para la detección de VPH. Carriles 24-42: muestras anales positivas para la detección de VPH. Carril 43: control C50, muestras celulares con VPH 16 y 18 integrado. Carril 44: control de mix de reacción sin templado de ADN. Cq: control positivo de la reacción de quimioluminiscencia.

6.5.3. Caracterización de los genotipos detectados en el canal anal de HSH.

Infecciones múltiples fueron detectadas en el 74% de las personas, a su vez, el 73% del total presentaba al menos un tipo de VPH AR mientras que el 79% presentaba VPH BR y el 17% VPH PAR.

El genotipo de VPH AR detectado en mayor proporción en los participantes analizados (con y sin diagnóstico previo de VIH) fue el 16 en el 30% de los casos, mientras que el VPH BR más prevalente fue el 11 en el 31% (figura 15). En infecciones simples los genotipos detectados fueron 6, 11, 18, 40, 42, 44, 45, 51 y 68.

Los genotipos identificados y considerados de forma independiente se muestran en la figura 15 diferenciándose entre VPH AR, VPH BR y VPH PAR.

En la tabla 11 se muestran los Genotipos de VPH detectados en infecciones simples y múltiples en relación con la citología.

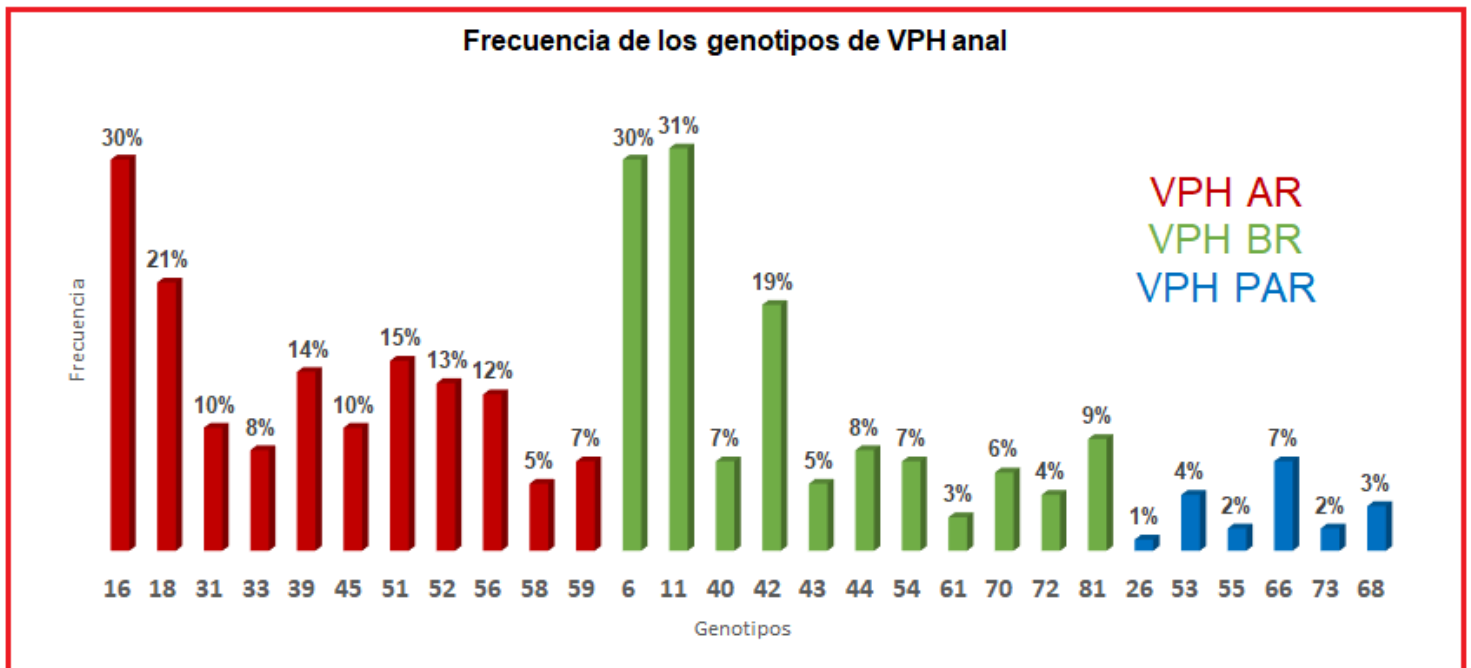


Figura 15: Gráfico de frecuencias de genotipos de VPH detectados en 117 muestras del canal anal de HSH VIH positivos y negativos mediante PCR con cebadores BSGP5+/6+biot seguida de RLB. Para el cálculo de frecuencias los genotipos fueron considerados independientemente. VPH AR: genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico. VPH BR: genotipos de VPH de bajo riesgo oncogénico. VPHPAR: genotipos de posible alto riesgo.

Tabla 11: Genotipos de VPH detectados en infecciones simples y múltiples en relación con la citología.

Resultados de citología								
Genotipos*	Negativo		ASCUS		LSIL		HSIL	
VPH-BR	simple	Múltiple	simple	múltiple	simple	múltiple	simple	múltiple
6			1 (1,1%)	8 (8,8%)	5 (4,5%)	8 (7,2%)		1 (11%)
11	3 (7,7%)	3 (7,7%)		6 (6,6%)	1 (0,91%)	13 (8,2%)		
40				2 (2,2%)		2 (1,8%)		1 (11%)
42	2 (5,1%)	2 (5,1%)		6 (6,6%)		7 (6,4%)		
43		2 (5,1%)				3 (2,7%)		
44		1 (2,6%)		2 (2,2%)	1 (0,91%)	3 (2,7%)		
54		1 (2,6%)		4 (4,4%)		1 (0,91%)		
61				2 (2,2%)				
70		1 (2,6%)		1 (1,1%)		2 (1,8%)		
72				1 (1,1%)		1 (0,91%)		1 (11%)
81		2 (5,1%)		4 (4,4%)		2 (1,8%)		
VPH-AR								
16		4 (10%)		9 (9,9%)		11 (10%)		2 (22%)
18		2 (5,1%)		8 (8,8%)		5 (4,5%)		
31		2 (5,1%)		3 (3,3%)		3 (3,0%)		
33				2 (2,2%)		5 (3,5%)		
39		3 (7,7%)	1 (1,1%)	3 (3,3%)		3 (2,7%)		
45	1 (2,6%)	1 (2,6%)		1 (1,1%)	1 (0,91%)	4 (2,5%)		1 (11%)
51	1 (2,6%)			5 (5,5%)		6 (5,5%)		3 (33%)
52				5 (5,5%)		7 (6,4%)		
56		2 (5,1%)		4 (4,4%)		1 (0,91%)		
58				3 (3,3%)		2 (1,8%)		
59		2 (5,1%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)		5 (4,5%)		
VPH-PAR								
26		1 (2,6%)						
53				2 (2,2%)		2 (1,9%)		
55						2 (1,9%)		
66		1 (2,6%)		2 (2,2%)		3 (2,7%)		
73				1 (1,1%)		1 (0,91%)		
68		2 (5,1%)	1 (1,1%)			1 (0,91%)		
82				2 (2,2%)				

* Para el cálculo de frecuencias los genotipos fueron considerados independientemente.

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado.

LSIL: Lesión intraepitelial escamosa anal de bajo grado.

HSIL: Lesión intraepitelial escamosa anal de alto grado.

6.5.4. Detección y genotipificación de VPH en HSH VIH positivos y negativos

Del total de personas incluidas, 114 contaban con muestras aptas para la detección de VPH y con diagnóstico de VIH al momento del estudio. El 68% eran HSH VIH positivos (77 personas) de las cuales en el 96% de los casos se detectó algún tipo de VPH mediante RLB. Mientras que en los HSH VIH negativos se detectó genoma de VPH en el 95% de los casos. En la tabla 12 se muestran los resultados de la detección de VPH en personas VIH positivas y VIH negativos.

Tabla 12: Resultados de detección de VPH en HSH VIH positivos y VIH negativos			
VIH	Detectable	VPH*	
		ND**	Total
VIH positivo	74 (96%)	3 (4,0%)	77 (68%)
VIH negativo	35 (95%)	2 (5,0%)	37 (32%)
Total	109 (96%)	5 (4,0%)	114 (100%)

* $p=0,9433$

**ND: No detectable.

En la tabla 13 se muestran los resultados de detección de VPH según rangos de edad en las personas VIH positivo y VIH negativo en relación con el diagnóstico citológico.

Las personas con citología tanto normal como anormal y con edades entre 31 y 50 años presentaron en mayor frecuencia infecciones múltiples con VPH. Dichas infecciones múltiples incluyen tanto genotipos de VPH AR como VPH BR y VPH PAR (tabla 13).

Tabla 13: Resultados de detección de VPH según rangos de edades en HSH con diagnóstico VIH y citología por PAP anal

VIH positivos	Resultados de Citología												
	Negativo n= 15 (%)			ASC-JS n=20 (%)			LSIL n=26 (%)			HSL n= 1 (%)			
Rango de edades	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples
≤30 años	0 (0%)	2 (13%)	0 (0%)	6 (30%)	4 (15%)	11 (42%)	0 (0%)	1 (100%)					
31-50	6 (40%)	6 (40%)	2 (10%)	10 (50%)	1 (4,0%)	5 (19%)	0 (0%)	0 (0%)					
≥51	1 (7,0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	2 (8%)	3 (12%)	0 (0%)	0 (0%)					
VIH negativos	Normal n= 10 (%)												
Rango de edades	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples	Infecciones VPH simples	Infecciones VPH múltiples
≤30 años	4 (40%)	4 (40%)	2 (33%)	1 (17%)	1 (11%)	4 (44%)	0 (0%)	2 (67%)					
31-50	0 (0%)	2 (20%)	0 (0%)	2 (33%)	1 (11%)	3 (33%)	0 (0%)	1 (33%)					
≥51	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)					

6.5.4.1 Frecuencia del número de genotipos detectados en HSH VIH positivos

En 74 personas con diagnóstico positivo de VIH en los que se detectó genoma de VPH anal se logró identificar hasta 9 genotipos en una misma muestra. En la figura 16 se presenta la frecuencia del número de genotipos detectados para esta población. El genotipo de VPH AR 16 fue el más prevalente encontrándose en el 32% de los casos seguido por el genotipo 18 en el 23%. Asimismo, el VPH BR más prevalente fue el genotipo 11 en el 30% de los participantes seguido por el 6 en el 29%.

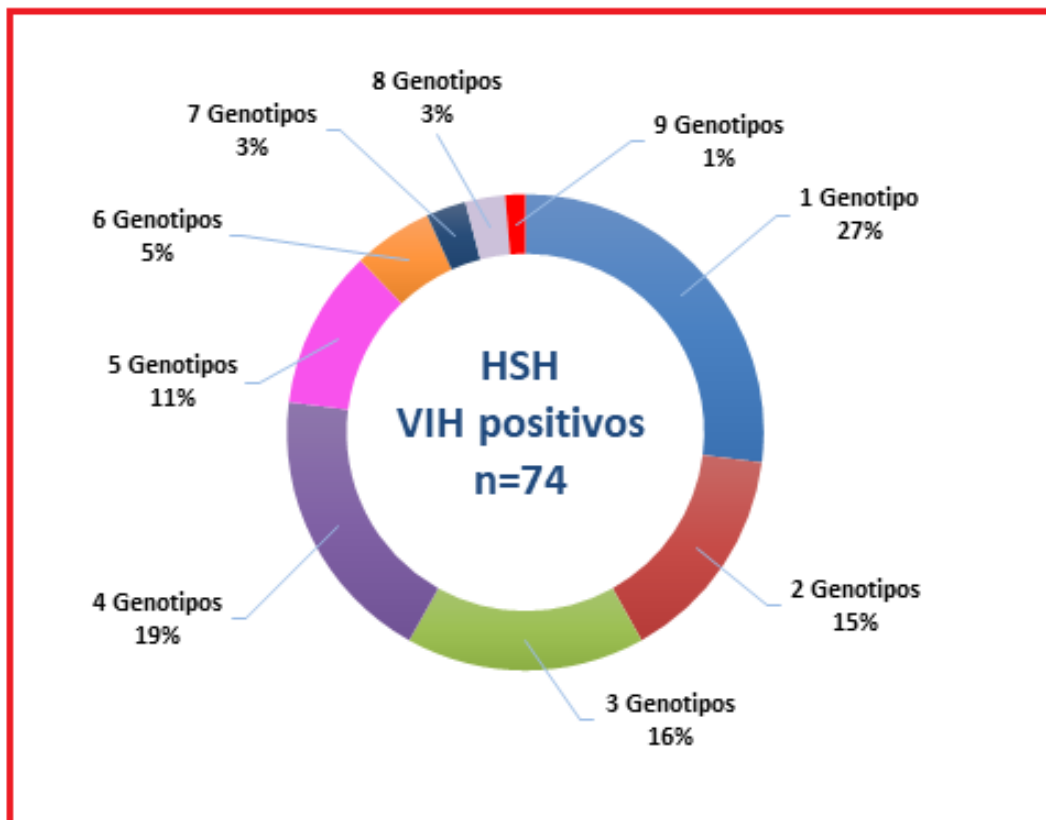


Figura 16: Frecuencia del número de genotipos detectados en 74 HSH, VIH positivos.

6.5.4.2. Frecuencia del número de genotipos detectados en HSH VIH negativos

En los participantes con diagnóstico negativo de VIH en los que se detectó genoma de VPH anal se logró identificar hasta 7 genotipos en una misma muestra. En la figura 17 se muestra la frecuencia del número de genotipos detectados para esta población. Al igual que en los HSH VIH positivos el genotipo de VPH AR 16 fue el más prevalente encontrándose en el 29% de los casos seguido por el genotipo 18 en el 20%. El VPH BR más prevalente fue el genotipo 11 en el 31% de los participantes seguido por el genotipo 6 en el 29%.

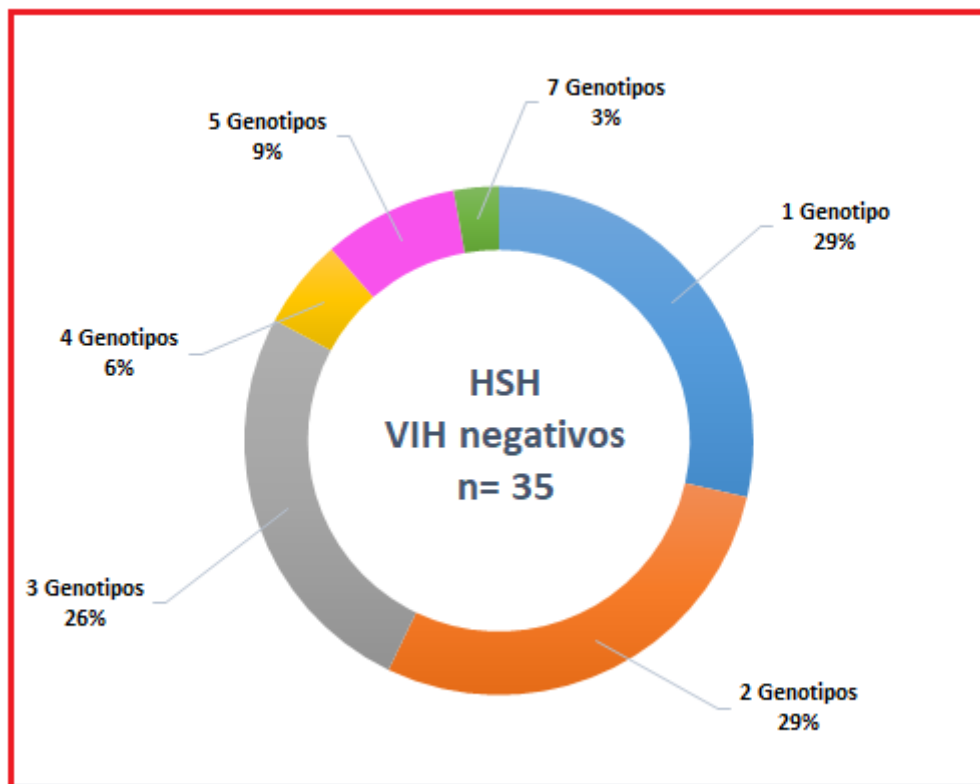


Figura 17: Frecuencia del número de genotipos detectados en 35 HSH, VIH negativos

6.6. Personas HSH VIH positivos y negativos en seguimiento

Dieciséis pacientes se adhirieron a un estudio de seguimiento, 5 VIH negativos (31%) y 11 VIH positivos (69%). El máximo de citas por persona fue de cuatro con intervalos de un año entre cada una. En cada nueva cita se tomaron dos muestras, una para la citología por PAP y la otra para detección de VPH y genotipificación por RLB con previa PCR con cebadores BSGP5+/6+biot. En la tabla 14 se muestra la edad del participante al inicio del estudio, el estado de la infección por VIH, los resultados de citología y los genotipos detectados. De las 36 muestras analizadas 2 (5,6%) no fueron aptas para la genotipificación y en 3 (8,3%) no se detectó el genoma de VPH. Se detectaron hasta 6 genotipos en personas VIH positivas. En 19 muestras se detectaron genotipos de alto riesgo, siendo el VPH18 el más prevalente en las muestras positivas en el 23% (7/31) seguido por el VPH16 en el 16% (5/31). En ningún paciente se observó el mismo patrón de genotipos detectados (tabla 14).

Tabla 14 Resultado de análisis citológico de genotipificación de VPH para 15 participantes del seguimiento

Paciente	Muestra	Edad inicial	VIH	Citología	Resultados genotipificación RBL
A	A1	40	SI	INS	11/16/18/33
	A2			L-SIL	11
B	B1	38	SI	NEGATIVO	11
	B2			ASC-US	53
E	E1	39	SI	ASC-US	11/54
	E2			L-SIL	11/59
F	F1	55	SI	L-SIL	11/31/52
	F2			INS	31/51/52
H	H1	36	SI	ASC-US	16/31/40/54
	H2			SD	16/40
I	I1	20	SI	NEGATIVO	11/18/39/42/44/81
	I2			INS	18/42/66
J	J1	23	SI	ASC-US	18/39/40/44/54//81
	J2			L-SIL	6/44/81
M	M1	26	SI	ASC-US	18/42/51/56
	M2			ASC-US	NA
N	N1	26	SI	INS	18
	N2			ASC-US	11
O	O1	22	SI	NEGATIVO	11/39/59
	O2			NEGATIVO	ND
P	P1	35	SI	L-SIL AIN-1	11/18
	P2			SD	42/51/70/73
K	K1	55	NO	ASC-US	ND
	K2			ASC-US	ND
	K3			ASC-US	NA
L	L1	19	NO	ASC-US	59
	L2			SD	59
C	C1	23	NO	NEGATIVO	11
	C2			L-SIL	6
D	D1	28	NO	ASC-US	68
	D2			ASC-US	11/16/33
	D3			L-SIL	16/68
	D4			L-SIL	33/58/68
G	G1	32	NO	L-SIL	11/31/53
	G2			L-SIL	70
	G3			L-SIL	70

Ins: Insatisfactoria, muestra no apta para procesamiento citológico. SD: Sin dato de resultado citológico. ND: No detectable, muestra negativa por RLB. NA: No Apta, muestra no apta para genotipificación por RLB.

6.7. Variabilidad de VPH 16

Las 17 secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo se alinearon con otras 58 obtenidas del GenBank que se encontraban antes descritas (Al-Awadhi et al. 2013; Burk et al. 2013; Chan et al, 1992; Coronet et al. 2012; Mendoza et al. 2013; Tornesello et al, 2011).

La figura 18 es el árbol filogenético obtenido. Las variantes UY.HSHM44 y UY.HSHM27 se ubicaron dentro de la rama AA. La variante UY.HSHM37 quedó ubicada dentro de la rama Af1 mientras que el resto de las variantes (UY.HSHM131; UY.HSHM123; UY.HSHM99; UY.HSHM122; UY.HSHM55; UY.HSHM47; UY.HSHM8; UY.HSHM30; UY.HSHM48; UY.HSHM50; UY.HSHM72; UY.HSHM88; UY.HSHM112; UY.HSHM125) se ubicaron dentro de la rama E.

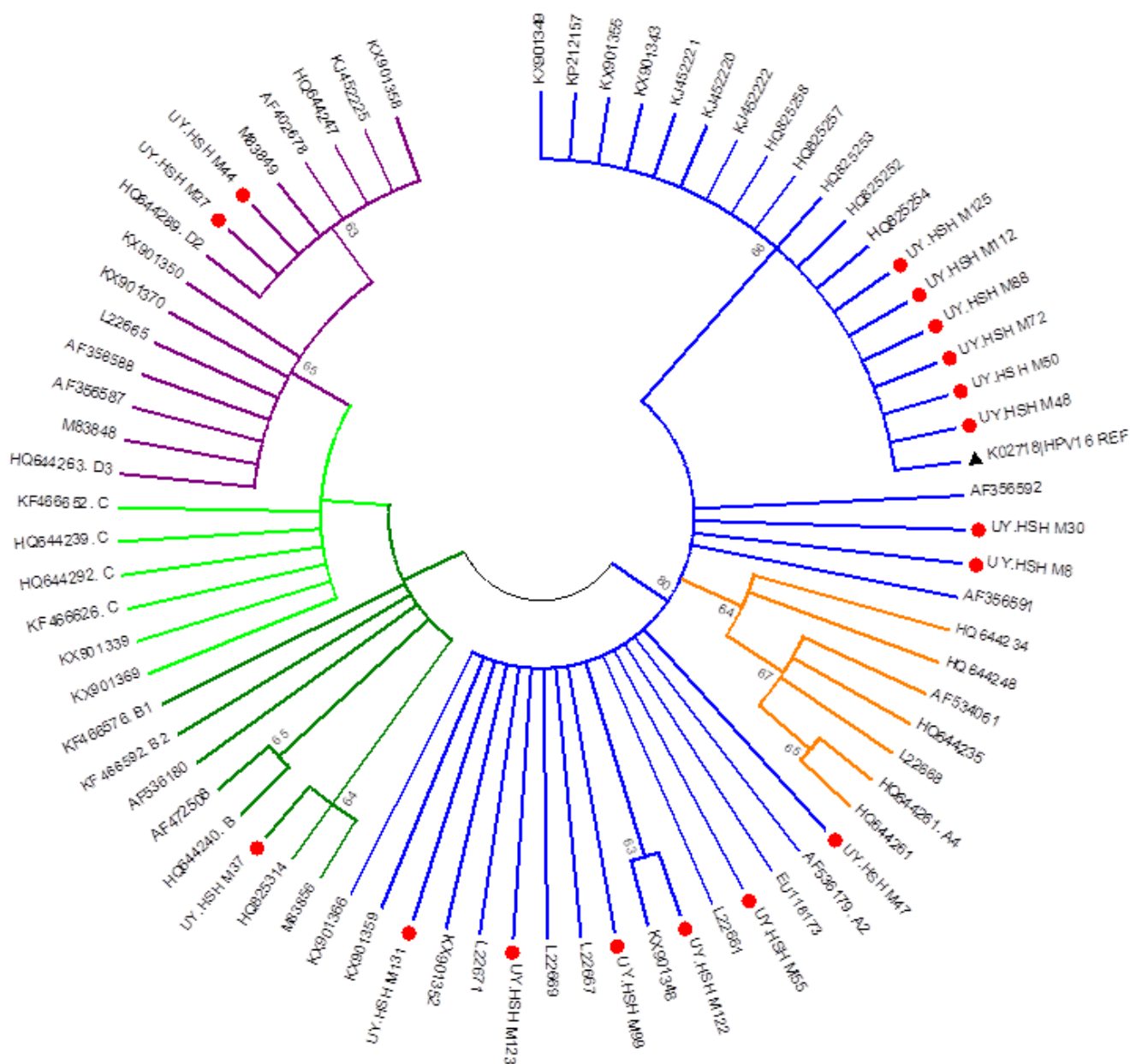


Figura 18: Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias de LCR de VPH genotipo 16. Los círculos rojos señalan las variantes obtenidas en este estudio. Las distintas ramas se distinguen con colores: violeta rama AA; verde claro rama Af2; verde oscuro rama Af1, naranja rama As y azul rama E.

7. Discusión



Este trabajo presenta por primera vez datos acerca de la infección por VPH en el canal anal de HSH en Uruguay, así como los genotipos circulantes y la variabilidad del genotipo de alto riesgo más prevalente a nivel mundial.

De las 126 personas incluidas en el estudio, las muestras de cepillado anal de 122 fueron aptas para la detección molecular de VPH. La mayoría de estas personas (96%) estaba infectada con al menos un genotipo de VPH en el canal anal. No se encontraron diferencias significativas entre VIH positivos y negativos. En la mayoría se detectaron infecciones múltiples y con alta prevalencia de infección con VPH AR.

La frecuencia de infección por VPH encontrada en nuestro estudio es similar a la reportada en trabajos de la región como en Argentina (*dos Ramos Farías et al. 2011*) donde se reportó una prevalencia de infección por VPH del 97,4%, o un estudio de Perú que mostró un 97,1% de prevalencia de VPH en VIH positivos y 73,3% en VIH negativos (*Blas et al, 2015*). En cambio, otros estudios de la región muestran prevalencias menores, 65,2% para Brasil y México (*Ishibashi et al. 2008*) o 34,0% en Chile (*Hinojos Armendáriz et al, 2016*). Estudios de otras regiones del mundo reportan tanto prevalencias inferiores (China 74,1% en HIV positivos y 29,2% en HIV negativos) así como prevalencias superiores a 90,0% de infección por VPH en HSH VIH positivos (*Machalek et al. 2012; de Pokomandy et al. 2009*).

Las diferencias en las frecuencias de VPH detectadas en HSH, en los trabajos citados, podrían deberse a parámetros de comportamiento sexual como el número de parejas sexuales, así como también en las técnicas utilizadas para la detección de VPH. La sensibilidad de las técnicas explicaría la diferencia en las frecuencias de infección por VPH detectadas en nuestro estudio ya que en la detección por PCR usando cebadores genéricos MY09 y MY11 la frecuencia de infección por VPH fue de 76% mientras que mediante PCR BSGP5+/6+biot seguida de RLB la frecuencia fue de 96%. La incorporación de cebadores consenso Gp5+/6+Biot consiste en la adición de 8 cebadores directos y 2 reversos biotinilados a los tradicionales Gp5+/6+. Esta incorporación permite una amplificación homogénea para los VPH genitales de la especie alfa debido a que este pool se une a la misma región que los cebadores Gp5+/6+, minimizando el número de incompatibilidades entre los distintos tipos de VPH. Esta técnica posee alta sensibilidad y es capaz de amplificar hasta una única copia de la molécula de ADN blanco (*van de Brule et al. 2002*).

En cuanto a la prevalencia de displasia analizada mediante citología con técnica de PAP, en el presente estudio el 71% de las personas resultaron con citología anormal. Asimismo, el elevado porcentaje de ASCUS (29%) podría deberse a la sensibilidad y especificidad de la técnica de citología ya que algunos estudios indican que la misma oscila entre el 69 y el 93% (Repiso et al. 2014). Técnicas como la AAR u otras técnicas del tipo molecular podrían mejorar la definición de los resultados citológicos indeterminados (Salit et al. 2010).

En cuanto a los genotipos de VPH circulantes, se detectaron 28 tipos distintos, dentro de los VPH-AR el genotipo 16 fue el más frecuente seguido por el genotipo 18 tanto en muestras con infección simple o múltiple). Los VPH-AR 16 y 18 se consideran responsables de más del 70% de los cánceres anales, se sabe, además, que la tasa de aclaramiento es menor respecto a otros genotipos no oncogénicos de VPH y su persistencia puede conducir a lesiones epiteliales de alto grado. Resultados similares fueron encontrados en estudios realizados en esta población (Blas et al. 2015; dos Ramos Farías et al. 2011; Schim et al. 2014). De los VPH-BR, los genotipos 6 y 11 fueron los detectados con mayor frecuencia y son los que se asocian fundamentalmente a la aparición de verrugas y condilomas anogenitales. En este caso, el 70% de las personas que presentaron inspección anal anormal (17/29), ya sea condilomas o verrugas en ano o pene, se encontraban infectadas con los genotipos 6 u 11 (dato no mostrado). La alta prevalencia de VPH en el canal anal de los genotipos 6, 11, 16 y 18 justificaría la vacunación cuadrivalente como medida de prevención primaria para el CA y lesiones de alto grado en esta población.

Se detectaron dos o más genotipos de VPH en la mayoría de los HSH VIH positivos con un máximo de 9 genotipos en la misma muestra, también la mayoría de los VIH negativos presentaron más de un genotipo siendo el máximo de 7, las muestras con infecciones múltiples incluyen VPH-AR, VPH-BR y VPH-PAR. En aquellas personas con displasia de bajo grado (ASCUS y LSIL) se detectaron infecciones con genotipos múltiples de VPH, con mayor frecuencia en menores de 50 años tanto VIH positivos como VIH negativos. La presencia de infecciones con VPH múltiples en HSH se asocia con un mayor riesgo de hallazgos de citología anormal especialmente en aquellos VIH positivos. Esto refleja la importancia de identificar múltiples infecciones con VPH en esta población (Rovelli et al. 2017).

De las 126 personas incorporadas en este trabajo, 16 accedieron a un estudio de seguimiento con toma de muestras anuales y un máximo de 4 muestras por persona. En ninguna de las muestras de la misma persona se observó igual patrón de genotipos de VPH, este resultado podría deberse a la adquisición de nuevas infecciones relacionadas con el número de parejas sexuales (media de la población de 17 parejas sexuales en los últimos 6 meses y 173 durante toda la vida); al aclaramiento de la infección principalmente en inmunocompetentes (Machalek et al. 2012) o que debido a la técnica utilizada aquellos genotipos que se hallan en menor proporción no se detectaron en las sucesivas muestras. En este último caso, se podrían implementar técnicas como secuenciación masiva para poder detectar la totalidad de genotipos presentes en las muestras.

El genotipo de VPH-AR 16 es el más prevalente a nivel mundial, responsable de los cánceres asociados a la infección por VPH en más del 50% de los casos (Méndez-Martínez et al. 2014). Hasta el momento no existen datos de las variantes moleculares de este genotipo en los HSH en Uruguay, cabe aclarar que existen escasos estudios de este tipo a nivel mundial. En el presente trabajo el VPH 16 fue el genotipo de alto riesgo detectado con mayor frecuencia tanto en personas VIH positivas como negativas.

El análisis de las variantes a través de la región LCR permite la identificación de 5 linajes: europeo (E), asiático (As), asiático-americano (AA) y los linajes africanos (Af1 y Af2). En nuestro estudio, dos de las 17 secuencias nucleotídicas obtenidas pertenecen al linaje asiático-americano, 14 al linaje europeo y 1 al africano Af1. Las variantes AA y Af se asocian a una mayor oncogenicidad (Berumen et al. 2001). En Uruguay estudios de variabilidad de VPH 16 realizados en 18 muestras de cérvix uterino mostraron que las variantes pertenecían en mayor proporción al linaje E y además se encontraron linajes AA y Af (Ramas et al. 2018).

Los resultados del presente estudio podrían contribuir en estrategias de salud pública para la prevención (como lo es la incorporación de medidas de tamizaje o la vacunación nonavalente) del cáncer anal y lesiones precursoras asociadas en HSH.

8. CONCLUSIONES



Mediante distintas técnicas moleculares se determinó alta prevalencia de infección por VPH anal en HSH (96%), encontrándose hasta 28 genotipos distintos. No se observaron diferencias significativas entre VIH positivos y negativos. En la mayoría de los HSH se detectaron infecciones múltiples y con alta prevalencia de infección con VPH AR.

El VPH-AR detectado en mayor frecuencia fue el genotipo 16 tanto en infecciones simples como múltiples seguido por el genotipo 18. Los VPH-BR de mayor circulación fueron los genotipos 6 y 11 encontrados en el 70% de las personas con verrugas o condilomas en la inspección anal.

Tanto los HSH VIH positivos como negativos presentaron altas frecuencias de infecciones múltiples de VPH con un máximo de hasta 9 genotipos en la misma muestra.

En personas que participaron de seguimiento no se repitió el mismo patrón de genotipos de VPH en las distintas muestras.

Se confirma la alta prevalencia de las coinfecciones con múltiples genotipos VPH en esta población, el predominio de los VPH-AR (en especial VPH16) y la alta frecuencia de infecciones con múltiples VPH-AR, expondría a esta población a un riesgo aumentado de desarrollo de preneoplasia y cáncer anal.

En el análisis filogenético de la región LCR de VPH 16 se encontraron variantes pertenecientes al linaje asiático-americano, al linaje europeo y al africano Af1. Aportando por primera vez en Uruguay y la región datos acerca de la variabilidad del VPH-AR anal.

9. PERSPECTIVAS



Existe evidencia acerca de la infección por los VPH cutáneos pertenecientes a los géneros *Betapapillomavirus* y *Gammapapillomavirus* en el canal anal de los HSH. Por lo tanto, sería de interés implementar técnicas moleculares para la detección de genotipos cutáneos pertenecientes a esos géneros en esta población.

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la citología podría incorporarse al estudio resultados de AAR.

En cuanto a los HSH VIH positivos, sería valioso correlacionar los valores de la carga viral de VIH, así como los niveles de CD4+ y tratamiento antirretroviral de cada participante para poder realizar análisis comparativos de la infección por VPH en cada caso.

Para complementar el análisis de la variabilidad de VPH 16 se podría incorporar la amplificación por PCR de las regiones E6 y E7 ya que aportaría en la determinación de variaciones en la secuencia nucleotídica asociadas a la oncogenicidad.

Se espera a corto plazo la publicación de los resultados obtenidos en el presente estudio.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Aguiar, C.; Jaumandreu, S.; Alvarez, C.; Rodríguez, M. C.; Ortega, C. (2015). Lesiones rectoanales por VPH, diagnóstico mediante PAP anal y anoscopia de alta resolución con biopsias. *Rev Méd Urug* 2015;31(2), p.: 97-102.

Al-Awadhi, R.; Chehadeh, W.; Al-Jassar, W.; Al-Harmi, J.; Al-Saleh, E.; Kapila, K. (2013). Phylogenetic analysis of partial L1 gene of 10 human papillomavirus types isolated most commonly from women with normal and abnormal cervical cytology in Kuwait. *Arch Virol.* 158, p.:1687–99.

Adolf K. Awua, A. K.; R. M. K. Adanu, R. M. K.; Wiredu, K. E.; Afari, E. A.; Zubuch5, V. A.; Asmah, R. H.; and Alberto Severini5, A. (2017). Unique LCR variations among lineages of HPV16, 18 and 45 isolates from women with normal cervical cytology in Ghana. *Virology Journal.* DOI 10.1186/s12985-017-0755-z.

Benson, D. A.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D36–D42. doi:10.1093/nar/gks1195

Bernard, H. U.; Chan, S. H.; Manos, M.; Ong, C. K.; 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.

Bernard, H. U.; Calleja-Macias, I. E.; Dunn, S. T. (2006). "Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications." *Int J Cancer* 118(5): p.: 1071-6.

Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., 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), p.: 70-9.

Berois, N.; Heard, I.; Fort, Z.; Alonso, R.; Sica, A.; Moerzinger, P.; Rodriguez, G.; Sancho-Garnier, H.; Osinaga, E.; Favre, M. (2014). Prevalence of Type-Specific HPV Infection in Uruguay. *Journal of Medical Virology*. 86, p.: 647–652.

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), p.: 1325-30.

Blas, M. M.; Brown, B.; Menaho, L.; Alva, I.; Silva-Santisteban, A.; Carcamo, C. (2015). HPV Prevalence in Multiple Anatomical Sites among Men Who Have Sex with Men in Peru. *Plos One*. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139524>.

Bluth, M. J.; Bluth, M. H. (2013). Molecular Pathology Techniques. *Clin Lab Med*. 33, p.: 753–772.

Boshart, M.; Gissmann, L.; Ikenberg, H.; Kleinheinzl, A.; Scheurlen, W.; zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO Journal*. 3(5), p.: 1151-1157.

Bradbury, M.; Cabrera, S.; García -Jiménez, A.; Franco-Camps, S.; Sánchez-Iglesias, J.; Díaz-Feijoo, B.; Pérez-Benavente, A.; Gil-Moreno, A.; Centeno-Mediavilla, C. (2016). Vulvar intraepithelial neoplasia: clinical presentation, management and outcomes in women infected with HIV. *AIDS*, 30, p.: 859–867.

Burland T.G. (2000) DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software. In: Misener S., Krawetz S.A. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology™*. Humana Press, Totowa, NJ. (132).

Burk, R. D.; Chen, Z.; Van Doorslaer, K. (2009). Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 12, p.: 281–290.

Burk, R. D.; Harari, A.; Chen, Z. (2013). Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 445, p.:232–43.

Cornet I, Gheit T.; Franceschi, S.; Vignat, J.; Burk, R. D.; Sylla, B. S.; et al. (2012). Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *J Virol*. 86, p.:6855–61

Cortés, J.; F. Martínón, G. Ferret, E. García, J.M. Ramón y Cajal, R. Garrido, P. Miranda, D. Dexeus, A. Gil, R. Cisterna. (2010). Vacunas frente al virus del papiloma humano: actualización. *Clin Invest Gin Obst*. 37(2), p.:63–74

Daling, JR.; Madeleine, MM.; Johnson, LG.; et al. (2004). Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer*. 101, p.: 270–280.

Darragh, T. M., Colgan, T. J., Cox, J. T., Heller, D. S., Henry, M. R., Luff, R. D., ... Stoler, M. H. (2012). The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 136(10), p.: 1266–1297.

Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2004) Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, p.: 14252–14257.

de Pokomandy, A.; Rouleau, D.; Ghattas, G.; Vézina, S.; Côté, P.; Macleod, J.; Allaire, G.; Franco, E. L.; Coutlée, F.; HIPVIRG Study Group. (2009). Prevalence, clearance, and incidence of anal human papillomavirus infection in HIV-infected men: the HIPVIRG cohort study. *J Infect Dis.* 1(7), p.:965-73.

de Villiers, E. M.; Fauquet, C., Broker, T. R.; Bernard, H. U.; zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 24 (1), p.: 17-27.

de Villiers, E. M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 445 (1-2) p.: 2-10.

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

dos Ramos Farías, MS.; Picconi, MA.; Garcia, MN.; González, J.; Basiletti, J.; Pandoa, MA.; Ávilaa, MM. (2011). Human Papilloma virus genotype diversity of anal infection among trans (male to female transvestites, transsexuals or transgender) sex workers in Argentina. *Journal of Clinical Virology.* 51, p.: 96–99.

Dürst, M.; Gissmann, L.; Ikenberg, H.; and H zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(12), p.: 3812–3815.

Egawa, N.; Egawa, K.; Griffin, H.; Doorbar, J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia Viruses. 7(7), p.: 3863–3890.

Harden, M. E. and Munger, K. (2017). Human Papillomavirus molecular biology. *Mutat Res.* 772, p.: 3–12.

Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M. (2007). *Field's Virology.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Giuliano, AR.; Palefsky. JM.; Golstone S. (2011). Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. *N Engl J Med.* 364, p.: 401-11.

Gissmann, L.; Pfister, H.; Zur Hausen, H. (1977). Human Papilloma Viruses (HPV): Characterization of Four Different Isolates. *Virology.* 76. p.: 569-580.

Graham, S. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science.* 131, p.: 2201–2221.

Hidalgo, Tenorio, C.; Esquiavias, López, J, Ramírez, Taboada, J. et al. (2017). Which test is better for sceening AIN2+ lesions: P16/ki67, anal cytology or high-risk HPV PCR in HIV+ patients? Poster: 1253. 27th ECCMID. Viena Austria. 22-25.

Hinojos, D. A.; Palma-Cano, L. E.; Moreno-Brito, V.; Licón-Trillo, A.; Lora-Orduo, N. A.; Carrera-Chávez, N. N.; Santana-Rodríguez, V. M.; Duque-Rodriguez, J.; Leal-Berumen, I. (2016). Prevalencia de tipos de virus del papiloma humano en hombres que tienen sexo con hombres, en Chihuahua, México. *Acta univ.* 26(5).

Ho, L.; Chan, S. Y.; Chow, V.; Chong, T.; Tay, S. K.; Villa, L. L.; Bernard, H. U. (1991). Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 29(9), p.: 1765-72.

Hoff, PM.; Coudry, R.; Moniz, C. (2017). Pathology of anal cáncer. *Surg Oncol Clin N Am,* 26, p.: 57–71.

Ishibashi, M. A. et al. (2008). Human Papillomavirus infection in men residing in Brazil, Mexico, and the USA. *Salud pública de Mexico* 50(5), p.: 408-418.

Kidd, LC.; Sharon Chaing S.; Chipollini. J.; Giuliano. AR.; Spiess, PE.; Pranav Sharma, P. (2017). Relationship between human papillomavirus and penile cancer implications for prevention and treatment. *Transl Androl Urol* 6(5). p. 791-802.

King, L. E.; Fisk, J. C.; Dornan, E. S.; Donaldson, M. M.; Melendy, T.; Morgan, I. M. (2010). Human papillomavirus E1 and E2 mediated DNA replication is not arrested by DNA damage signalling *Virology* 406 p.: 95–102.

Lehtinen, M.; Dillner, J. (2013). Clinical trials of human papillomavirus vaccines and beyond. *Nat Rev Clin Oncol.* 10(7), p.:400-10.

Leszczyszyn, J.; Łebski, I.; Łysenko, L.; Hirnle, L.; Gerber, H. (2014). Anal Warts (*Condylomata Acuminata*) – Current Issues and Treatment Modalities. *Adv Clin Exp Med.* 23, (2), p.: 307–311.

Longacre, T, A.; Kong, C, S.; Welton, M, L. (2008). Diagnostic problems in anal pathology. *Adv Anat Pathol.* 15(5). p.263–78.

Machalek, DA.; Poynten, M.; Jin, F.; et al. (2012). Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 13(5). p. 487–500.

Maglennon, G.A., McIntosh, P. and Doorbar, J. (2012) Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 414, p.: 153–163.

Mandell, Douglas and Bennett'S Priciples and Practice of Infectoious Disease. 8E (2015). Pag 176.

Manos, M.; Ting, Y.; Wright, D. K.; Lewis, A. J.; Broker, T.; Wolinski, S. M. (1989). The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells*. 7, p.: 209-214.

Méndez-Matinez, R.; Rivera-Martinez, N. E.; Crabtree-Ramirez, B.; Sierra-Madero, J. G.; Caro-Vega, Y.; Galván, S. C.; Cantú de León, D.; García-Carrancá, A. (2014). Multiple human papillomavirus infections are highly prevalent in the anal canal of human immunodeficiency virus-positive men who have sex with men. *BMC Infectious Diseases*. 14: 671.

Mendoza, L.; Picconi, M. A.; 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), p.: 44-7.

Ming, Z. M.; Baker, C, C. (2006). Papillomavirus genoma structure, expresión, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 1(11), p.:2286-302.

Misa-Jalda, R.; Martínez-Láuz, M. (2018). Cáncer de ano. *Clin Quir Fac Med UdelaR*.

Muñoz, 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.

Münger K., Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 89(2), p.: 213-28.

Montero, P. H. (2018). Cáncer de Cabeza y Cuello asociado a Virus Papiloma Humano: Prevención, diagnóstico y tratamiento. *REV. MED. CLIN. CONDES*. 29(4), p.: 419-426.

Myers, G.; Bernard, H. U.; Delius, H.; Baker, C.; Icenogle, J.; Halpern, A.; Wheeler, C. (1995). Human papillomavirus. A compilation of analysis of nucleic acid and amino acid sequences." Los Alamos National Laboratory. 95, p.:3675.

Nelson, V. M.; Benson, A. L. (2017). Epidemiology of Anal Canal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 26, p.: 9–15.

Ong, J. J.; Grulich, A.; Walker, S.; Hoy, J.; Read, T.; Bradshaw, C.; Garland, S. M.; Hillman, R.; Templeton, D.; Hocking, J.; Eu, B.; Tee, B. K.; Fairley, C. K. (2016). Baseline findings from the Anal Cancer Examination (ACE) study: screening using digital ano-rectal examination in HIV positive men who have sex with men. *J Med Screen.* 23(2), p.:70-6.

Orth, G.; Jablonska, S.; Favre, M.; Jarzabek-Chorzelska, M.; Rzeska, G. (1978) Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75, p:1537-41.

Palefsky, JM.; Shiboski, S.; Moss, A.J.; (1994). Risk factors for anal human papillomavirus infection and anal cytologic abnormalities in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. *Acquir Immune Defic Syndr.* 7(6). p. 599-606.

Palefsky, J. (2008). Human papillomavirus and anal neoplasia. *Curr HIV/AIDS Rep.* 5(2), p. 78–85.

Parés, D.; Mullerat, J.; Pera, M. (2006). Neoplasia intraepitelial anal *Med Clin (Barc).* 127(19), p.:749-55.

Picón, T.; D´Albora, C.; Speranza, N.; Varela, A.; Zunino, C. (2018). Manual de situaciones especiales. Ministerio de Salud Pública, Uruguay.

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

Ramas, V.; Mirazo, S.; Sylvia Bonilla, S.; Ruchansky, D.; Arbiza, J. (2018). Analysis of human papillomavirus 16 E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women. *Gene.* 654, p.: 103–109

Repiso-Jiménez, J. B.; Frieyro-Elicegui, M.; Padilla-España, L.; Palma-Carazo, F.; de la Torre-Lima, J.; Rivas-Ruiz, F. (2014). Anal intraepithelial neoplasia in a sexually transmitted diseases outpatient clinic: correlation with cytological screening. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(5), p.: 658-61.

Rovelli, C.; Poli, A.; Galli, L.; Cernuschi, M.; Tamburini, AM.; Racca, S.; Tambussi, G.; Rolla, S.; Luca Albarello, L.; Rosati, R.; Lazzarin, A.; Castagna, A.; Nozza, S. (2017). Presence of multiple genotypes in subjects with HPV-16 infection is highly associated with anal squamous intraepithelial lesions in HIV-1 infected males. *Plos One.* Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186367>.

Sadler, C.; Lynam, A.; O'Dea, S.; Delamere, S.; Quinlan, M.; Clarke, S.; Sheils, O.; Bergin C. (2016). HPV vaccine acceptability in HIV-infected and HIV negative men who have sex with men (MSM) in Ireland. *Hum Vaccin Immunother.* 12(6), p.:1536-41.

Schim van der Loeff, M, F.; Mooij, S. H.; Richel, O.; de Vries, H. J. C.; Prins, J, M. (2014). HPV and Anal Cancer in HIV-Infected Individuals: A Review 11(3), p.: 250–262.

Sahba Sedaghat, N. 2013. Papilomatosis respiratoria recurrente y el rol de la vacunación antiVPH. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.*73 (1), p.: 89-93.

Salit, IE.; Lytwyn A, Raboud J, Sano M, Chong S, Diong C, et al. (2010). The role of cytology (Paptests) and human papillomavirus testing in anal cancer screening. *AIDS*. 24(9), p.: 1307- 13.

Santos-López, G.; Márquez-Domínguez, L.; Reyes-Leyva, J.; Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 53 (2), p.:166-71

Seedorf, K.; Krammer, G.; Durst, M.; Suhai, S.; Rowekamp, W. G. (1985). "Human papillomavirus type 16 DNA sequence." *Virology* 145(1), p.: 181-5.

Sendagorta, E.; Romero, MP.; Bernardino, JI.; Beato, MJ.; Alvarez-Gallego, M.; Herranz, P. (2015). Human papillomavirus mRNA testing for the detection of anal high-grade squamous intraepithelial lesions in men who have sex with men infected with HIV. *J Med Virol*. 87(8), p.:1397-403.

Sichero, L.; Sobrinho, J. S.; Villa, L. L. (2012). "Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants." *Virology* 432(1): 127-32.

Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular Biology and Evolution* 30 (12), p.: 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

Tornesello, M. L.; Losito, S.; Benincasa, G.; Fulciniti, F.; Botti, G.; Greggi.; S.; et al. (2011). Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*. 121, p.: 32-42.

Torres, M.; Tarik Gheita, McKay-Chopina, S.; Rodríguez, C.; Del Romero, J.; Filoticoc, R.; Donád, MG.; Ortize, M.; Tommasinoa, M. (2015). Prevalence of beta and gamma human papillomaviruses in the anal canal of men who have sex with men is influenced by HIV status. *Journal of Clinical Virology*. 67, p.: 47–51

Vajdic, CM.; Anderson, JS.; Hillman, RJ.; Medley, G.; Grulich, AE. (2005). Blind sampling is superior to anoscope guided sampling for screening for anal intraepithelial neoplasia. *Sex Transm Infect.* 81(5), p.: 415-8.

Van den Brule, A. J., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C.J., and Snijders, P. J. (2002). GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J. Clin. Microbiol.* (40): 779–787.

Van Doorslaer, K.; Chen, Z.; Bernard, H. U.; Chan, P. K. S.; DeSalle, R.; Dillner, J.; Forslund, O.; Haga, T.; McBride, A. A.; Villa, L. L.; Burk, R. D.; ICTV Report Consortium. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *Journal of General Virology.* 99. p.: 989–990.

Wheeler C, Hunt W, Joste N, Key C, Quint W, Castle P. (2009). Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 101(7), p.: 475-87.

Wilkin, T.; Lee, J. Y.; Lensing, S. Y.; Stier, E. A.; Goldstone, S. E.; Berry, J. M.; Jay, N.; Aboulafia, D.; Cohn, D. L.; Einstein, M. H.; Saah, A.; Mitsuyasu, R. T.; Palefsky, J. M. (2010). Safety and immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus vaccine in HIV-1-infected men. *J Infect Dis.* 202(8), p.:1246-53.

Yang, Y.; Li1. Z.; Zhang, Z.; Qian, H, Z.; Ruan, Z.; Zhou, F.; Gao, C.; Li, M.; Jin, Q.; Gao, L. (2012). Association of Human Papillomavirus Infection and Abnormal Anal Cytology among HIV-Infected MSM in Beijing, China *Plos One.* 7 (4).

Yanofsky, V. R.; Patel, R. V.; Goldenberg, G. (2012). Genital warts, A comprehensive Review. *J Clin Aesthet Dermatol.* 5(6) p.:25-36.

Zheng, Z, M.; Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genoma structure, expresión ando post- transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11, p.: 2286–2302.

11.ANEXOS

ANEXO I

Mapa de referencia con patrones de restricción para genotipificación por RFLP, Bernard et al. 1994.

HPV Type	BamHI	DdeI	HaeIII	HirFI	PstI	RsaI	Sau3AI
HPV6b	449	382	217	234	449	161	366
		67	124	215		149	63
uncut: 449 bp			108			72	20
						67	
HPV11	336	447	217	234	242	216	366
	83	2	124	215	207	135	63
uncut: 449 bp			108			72	20
						26	
HPV13	372	326	204	240	213	175	372
	83	62	127	215	242	135	63
uncut: 455 bp			67	124		73	20
						72	
HPV16	452	452	444	452	216	310	369
			8		210	72	63
uncut: 452 bp					26	70	20
HPV18	372	432	455	455	242	135	372
	83	23			213	125	63
uncut: 455 bp						85	20
						38	
HPV26	455	455	455	455	102	365	372
					353	72	63
uncut: 455 bp						18	20
HPV31	452	283	328	237	216	380	369
		167	124	215	210	72	63
uncut: 452 bp			2		26		20
HPV31b	452	285	328	237	216	380	369
		90	124	215	210	72	63
uncut: 452 bp			77		26		20
HPV32	366	320	317	234	449	216	366
	83	21	124	215		161	63
uncut: 449 bp			108	8		72	20
HPV33	449	320	449	234	242	236	267
		77	215	207	102	162	
uncut: 449 bp			52		72	20	
						39	
HPV34	458	211	334	458	253	186	438
		151	124		179	161	20
uncut: 458 bp			88		26	96	
			8			15	
HPV35	452	294	261	452	426	177	369
		135	180		26	161	63
uncut: 452 bp			23	8		72	20
				3		42	
HPV39	455	324	455	355	330	260	249
		131		100	125	123	123
uncut: 455 bp						72	63
							20
HPV40	240	297	447	455	455	365	240
	132	158	8			90	132
uncut: 455 bp			83				63
							20
HPV42	366	341	449	234	449	242	366
	83	108		215		135	63
uncut: 449 bp						72	20
HPV44	455	297	223	455	455	222	405
		112	124			161	30
uncut: 455 bp			46	108		72	20
HPV45	372	324	447	455	242	338	372
	83	131	8		213	72	63
uncut: 455 bp						45	20
HPV51	237	362	379	452	452	380	237
	215	90	73			72	132
uncut: 452 bp							63
							20
HPV52	449	357	258	449	423	449	366
		92	183		26		63
uncut: 449 bp			8				20
HPV53	449	206	232	368	449	449	342
		158	217	81			87
uncut: 449 bp			85				20
HPV54	369	452	217	234	452	138	369
	83		127	218		125	63
uncut: 452 bp			108			117	20
						72	
HPV55	455	112	215	215	455	165	405
		111	124	207		161	30
uncut: 455 bp			101	108	33	72	20
			85	8		57	
							46

HPV Type	BamHI	DdeI	HaeIII	HirFI	PstI	RsaI	Sau3AI
HPV56	449	307	275	449	242	310	429
		142	166		207	72	20
uncut: 449 bp			8			49	18
						18	
HPV57	449	211	449	449	296	449	328
		142			153		38
uncut: 449 bp			50				33
			46				26
							24
HPV58	449	348	449	235	216	306	366
		101		214	207	111	57
uncut: 449 bp					26	32	20
							6
HPV59	452	452	396	452	426	452	402
			56		26		24
uncut: 452 bp							20
							6
HPV61	455	455	212	455	455	185	372
			211			180	63
uncut: 455 bp			24			72	20
			8			18	
HPV62	449	449	232	449	341	359	399
			217		108	72	30
uncut: 449 bp						18	20
HPV64	375	211	334	367	253	186	375
	83	151	124	91	179	161	63
uncut: 458 bp			87		26	72	20
			9			39	
HPV66(PAP88)	366	291	449	449	207	449	366
	83	158			150	63	
uncut: 449 bp					66	20	
					26		
HPV67	449	307	266	234	423	310	366
		92	183	215	26	72	63
uncut: 449 bp			50			67	20
HPV68(ME180)	372	455	455	215	455	260	249
	83			140		85	123
uncut: 455 bp				100		72	63
						38	20
HPV69	372	455	223	455	455	365	372
	83		183			72	33
uncut: 455 bp			49			18	30
							20
MM4(W138)	455	288	455	241	455	383	435
		167		214		72	20
uncut: 455 bp							
MM7(PAP291)	369	452	383	452	317	380	369
	83		69		135	72	63
uncut: 452 bp							20
MM8(PAP155)	452	220	346	214	452	310	369
		142	106	106		142	63
uncut: 452 bp			90		95		20
					37		
MM9(PAP238A)	458	243	458	458	432	201	408
		215			26	161	30
uncut: 458 bp						96	20
LVX100	452	297	220	452	452	362	369
		155	208			72	63
uncut: 452 bp			24			18	20
IS39	455	243	455	241	455	383	435
uncut: 455 bp		212		214		72	20
CP141	372	455	232	240	242	231	372
	83		117	215	213	123	63
uncut: 455 bp			106			72	20
						29	
CP6108	369	246	325	452	452	380	369
	83	152	127			72	33
uncut: 452 bp			54				24
							20
							6
CP8304	452	452	127	452	341	452	432
			121		111		20
uncut: 452 bp			108				
			96				
CP4173	455	300	220	455	455	365	372
		155	211			72	63
uncut: 455 bp			24			18	20
CP8061	452	320	217	346	360	380	381
		132	127	106	92	72	51
uncut: 452 bp			108				20

ANEXO II

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Infección por el Virus de Papiloma Humano y neoplasia anal en hombres que tienen sexo con hombres VIH positivos y VIH negativos” Este estudio es coordinado por la Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, con la participación del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, UdelaR, y el Laboratorio de Citología Conjunto de la RIEPS. Para obtener más información sobre el estudio puede dirigirse al investigador responsable Dra. Victoria Frantchez de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas. El docente responsable del mismo es la Prof. Adj. Zaida Arteta, Cátedra de Enfermedades Infecciosas – Servicio de Enfermedades Infectocontagiosas - tel. 24876981. Propósito del estudio: El propósito de esta investigación es analizar muestras clínicas obtenidas de cepillados de canal anal, a efectos de realizar un relevamiento de datos sobre tipos de lesión causada por la infección y genotipos existentes de VPH en hombres que tienen sexo con hombres. Con el mismo, se lograría un beneficio individual para las personas que intervengan en este estudio, aportando al médico tratante, información para la toma de decisiones frente a un tratamiento para esta patología. El procedimiento consiste en la toma de dos muestras por cepillado del canal anal y se realizará también la inspección visual de la zona anal en busca de verrugas u otras lesiones. La prueba de detección inicial es la citología o Papanicolaou anal y con la segunda muestra se buscará la presencia del virus de papiloma humano (VPH). Es una técnica sencilla donde se introduce en el canal anal un pequeño cepillo obteniéndose así células que serán estudiadas. Es indoloro y requiere unos pocos segundos. Aquellos pacientes con resultados anormales en la citología anal, en la inspección visual, o con tipos de virus papiloma humano que predisponen a cáncer anal serán evaluados con otra técnica llamada anoscopía y se realizará el tratamiento correspondiente a cada tipo de lesión. Su participación es absolutamente voluntaria. Si por alguna razón Ud. decide no participar de este estudio, esta decisión de ninguna manera afectará la atención que Ud. recibe. No hay costos para Ud. por tomar parte de la investigación, ni tampoco se le pagará ningún dinero por participar. Se deja constancia que el resultado del

estudio citológico y virológico se incorporará a su historia clínica y el equipo investigador será responsable de comunicar los resultados y la derivación correcta a cirugía de ser necesario, quien realizará la evaluación y/o tratamientos que correspondan. Luego de utilizadas las muestras, el material excedente será guardado, si Ud. lo autoriza, para estudios posteriores con el mismo objetivo. La información que Ud. nos brinde es absolutamente confidencial. No incluiremos ninguna información que pueda hacer posible su identificación en publicaciones o reportes posteriores.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO: He leído atentamente y he tenido la posibilidad de hacer preguntas sobre el estudio y estas preguntas fueron contestadas satisfactoriamente. Voluntariamente acepto participar en este estudio y entiendo que tengo el derecho de retirarme en cualquier momento sin que esto signifique ningún perjuicio para mí. Firmado este consentimiento no delego ningún derecho que me pertenezca. Consiento en participar del estudio SI NO Consiento en que las muestras sean guardadas para ser utilizadas en otros estudios con los mismos objetivos SI NO

Firma:.....Fecha: .../.../.... C.I.: N°:
..... Receptor..... Versión 1.
Fecha 16/03/2015.