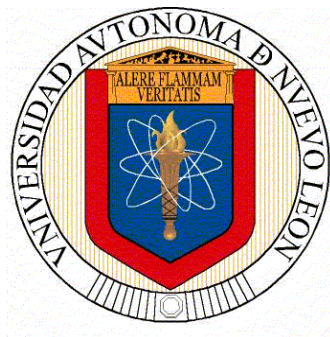


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

**ESTUDIO DE BIOMARCADORES GENÓMICOS PARA
PREDICCIÓN DE CÁNCER CERVICOUTERINO**

Presenta:

MARIEL ARACELI OYERVIDES MUÑOZ

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

2020

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En colaboración con el Laboratorio Nacional Biobanco del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección de la Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez, la co-dirección del Dr. C. Antonio Alí Pérez Maya y como miembros de la comisión de tesis la Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez, el Dr. C. Víctor Manuel Treviño Alvarado y el Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña.

Agradecimientos.

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí. A CONACyT, por la oportunidad profesional para desenvolverme como científica. A las autoridades y personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina.

¿Cómo comenzar a agradecer a tantas personas involucradas en este gran proyecto personal y profesional? No puedo expresar tanta gratitud en tan poco espacio, así que ahí van, algunas hojas para agradecer tantos largos años en esta aventura llamada doctorado.

Primero quiero agradecer de corazón a mi mentora, mi asesora de tesis, la Dra. Lourdes Garza, quien siempre fue mi guía en esta etapa, con sus consejos profesionales y personales, todo su apoyo, su confianza, que sin duda me deja las mejores enseñanzas profesionales y de vida. La admiro muchísimo por lo fuerte que ha sido, y que siempre logra salir adelante. Gracias por todo infinitamente, siempre recordaré hasta donde he llegado gracias a usted.

A mi co-director de tesis, el Dr. Antonio Alí Pérez Maya, quien fue mi tutor y cómplice en muchas ocasiones, todo su apoyo es inigualable. Estoy muy agradecida por todos los consejos y todo el apoyo que recibí.

A la Dra. Celia, gracias por todos los consejos de vida, consejos académicos y profesionales. Al Dr. Hugo A. Barrera, por su apoyo y lecciones brindadas en esta segunda etapa. Al Dr. Víctor Treviño, y al Dr. Ricardo Cerda por su tiempo extra apoyando este proyecto.

Al Dr. Mauro Antonio y al Dr. Lesmez Valdés, por creer en el potencial de este proyecto y su invaluable colaboración en la realización de mi tesis.

A la Dra. Anaís Berlanga, que sin su ayuda, consejos, colaboración, consultas, no hubiera podido terminar de incluir pacientes en este proyecto. Gracias por el tiempo extra de tu residencia para lograr nuestros objetivos. Gracias por tu amistad y apoyo incondicional.

A mis amigos desde la maestría, Liz, Geo, Paola, Moni, por siempre estar al pendiente, así como a mis compañeros de posgrado, que entre hacer ciencia y asistir a seminarios, tuvimos muchas gratas experiencias.

A mis mejores amigos Kame Galán y Alejandro Robles. ¿Cómo plasmar en palabras lo feliz que soy de tenerlos en mi vida? Sí, los amo. Gracias Alex por tantas aventuras (la mayoría relacionadas con comida, series, películas, pláticas y planes de viajes). Gracias Kame por siempre estar ahí, por tanta ayuda que me has dado, por tu apoyo en este proyecto, por explicarme siempre mis dudas y no perder la paciencia (a veces, jaja). Gracias amigos por siempre escucharme, apoyarme, ser mis pañuelos de lágrimas, de salidas a comer, ser mis parejas de bodas, de fiestas, de aventuras, soy muy feliz de ser parte de este “Trío de tres”. Lo mejor de haber llegado a Monterrey, fue definitivamente haberlos conocido.

A Daniela, a quien debo agradecer que siempre estuvo al pendiente de que no me faltara nada, desde material de laboratorio (aunque tenía que rogarle por reactivos y alícuotas, jaja), consejos, ayuda, y hasta estudiantes de servicio. Gracias por siempre motivarme y apoyarme cuando más lo necesité.

A Frecia, por todos los consejos, ayuda y manejo del laboratorio. Por conspirar conmigo, por escucharme y aconsejarme siempre.

A mis compañeros del Lab, que se convirtieron en grandes amigos: Ángel Quiñones, Fernanda Serna, Antonio Ovalle, José Luis, Irma, Rolando Delgado, Jorge Roacho, etc. Gracias por aguantar mis ocurrencias. A todos mis hijos del CaCU, mis estudiantes de servicio y voluntarios, gracias por aligerar tanta carga de trabajo, Adrián Torres, Adrián Pouda, Sonia, las Marianas, Arantza, Fer, Cecy, Rodolfo, Deyanira, Sindy, etc.

Al personal del Departamento que se volvió una segunda familia: Paulina, Veronica Alvarado, Lulú Mendoza, Normita, Lupita Martínez, Vicky, Sol, Juany.

A mis roomies que siempre aguantaron mis desvelos, mis estrés, mis salidas, las lágrimas, y sobre todo las risas: Zulema, Mony, Alberto.

A mis hermosas amigas Larissa Hernández, Yolanda Martínez y Bianca Hernández, gracias infinitas por las salidas, las pláticas, las visitas, las idas al crossfit, al spinning, a comer, las quiero bastante amigas.

A mis amigos de los Serenos, por esas primeras salidas los jueves a pueblo serena, que marcaron el inicio de una excelente amistad, las fiestas, las reuniones, pero sobre todo, la rambla. Los quiero mucho: Genaro, Olivia, Mel, Mickey, Félix, Noe, Tello, Brenda, Thania, Marisol, Uriel, Carranco, etc.

A mis amigos de danza, que siempre recibí su apoyo y porras a la distancia: Helene, Eric, Anny, Andrea, Pedro, Aurora, Verito, Carlos G, Emily, Ricky, etc.

A mis amigos de saltillo, que siempre me acompañaron los fines de semana de desestrés: Muza, Memo, Stephany, Marce, Daniel Charles, Misael, Carri, Rosy...

Así como a los Frens 2020, que siempre están pero no están: Alexa, Aaron,

Jorge, Arturo, Tito, Joel, Pepe, Mariel, Lily, Princess, Siomi, Vec, Vane, Alex, Xac, Michu, las cuatas, André... siempre seremos Team André.

A mis amigos del trabajo, que aguantaron mi estrés en la prepa, y que además se forjó nuestra amistad: Ahilen, Susan, Rosario, Oliver, Xochitl, Jazmín, José Luis, Rubén, Frayre, etc.

A Luis (Bolsas) por siempre estar para mí, por apoyarme, escucharme, aconsejarme, ser mi pañuelo de lágrimas, te quiero mucho.

A mi casi hermano Antonio Duarte, no puedo agradecerte lo suficiente a ti y a tu familia, gracias por siempre estar, los amo.

A Alexandra de la Cruz, bebé, has sido el mejor apoyo que he tenido, ya quiero más viajes, salidas, y aventuras (en uber ya no jaja) para contar a nuestros nietos. Gracias por tanto.

A mis mejores amigas, Alex Medrano y Karina González. Gracias Alex, por estar siempre a pesar de la distancia, gracias a tu familia por todo su apoyo y amor, por seguir siendo parte de mi vida. Karina, dodita, gracias por siempre estar al pendiente de mí, por estar en mis mejores y peores momentos. Las amo a las dos, no sé qué sería de mi vida sin ustedes.

Por supuesto, a mi pilar de vida, a mi familia, a los que siempre están más cerca, y que siempre están al pendiente de mí: tía Juanis, tía Lolis, madrina Ma. Esther, padrinos Mario y Poncho, Marlen, Aquiles, Efraín, Marina, Lizeth, Gerardo, Sofía, Baloy, y todos mis bebés sobrinos. Especialmente a mi hermano Ernesto, y a Perla, gracias por los bebés hermosos que me dieron, son mi motor de vida, Netito, Nina y Luis Antonio, los amo.

Y sobre todo, principalmente a mis padres, que soy lo que soy gracias a ellos, mi papi Ernesto, mi motor de vida e inspiración, mi mami Rosy, que ya no está con nosotros físicamente, pero que su recuerdo me mantiene y me motiva a seguir siempre adelante, te extraño tanto. Los amo a ambos.

No puedo terminar mis agradecimientos sin recordar a quien también se me fue del camino, que me acompañó por 17 años, Migaja, mi bebé.

Y bueno, tengo que agradecer a la pandemia, al coronavirus, a los planes de la pandemia por las oportunidades que se abrieron en este tiempo. Gracias por atrasar la titulación, mi examen de grado, pero gracias porque cuando llegaste aceptaron mi artículo original, porque me permitiste pasar más tiempo con mi familia, porque me diste un nuevo trabajo, y me recordó por qué quise estudiar biología molecular, estar al frente de la batalla de esta pandemia, ayudar a otros, la motivación y la vocación de ser biólogo molecular, mi sueño desde secundaria. Gracias Dios por todas estas oportunidades, por acomodar mi camino, ha sido muy duro, pero espero enorgullecer a todos los mencionados aquí, gracias infinitas a todos por su apoyo y motivación.

A mi mami Rosy...
te fuiste de mi vida sin esperarlo,
pero seguirás siempre en mi corazón.



ÍNDICE.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del CaCU.....	1
1.2. Etiología del CaCU.....	2
1.3. Características moleculares del VPH.....	6
1.4. Patogénesis del VPH	8
1.5. Factores de riesgo para CaCU.....	11
1.5.1. Biomarcadores virales	11
1.5.2. Factores exógenos que contribuyen al desarrollo del CaCU.....	15
1.6. Prevención del CaCU.....	17
1.6.1. Detección de lesiones por el VPH	17
1.6.2. Detección del VPH	23
1.6.3. Vacunas para el VPH	24
1.6.4. Tratamiento	26
1.7. Cambios genéticos en la progresión a CaCU	26
1.8. Filogenia del VPH - Subtipos y variantes del genoma viral.....	27

CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN

2. Justificación	29
------------------------	----

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS

3. Hipótesis	30
--------------------	----

CAPÍTULO IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos específicos	31

CAPÍTULO V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Lugar de realización del estudio e instituciones participantes.....	32
5.2. Material	33
5.2.1. Origen de los reactivos	33
5.2.2. Material Biológico	34

5.2.3. Equipo	34
5.3. Métodos	36
5.3.1. Estrategia General	36
5.3.2. Selección de muestras	37
5.3.2.1. Criterios de selección.....	38
5.3.2.2. Criterios de exclusión	38
5.3.2.3. Criterios de eliminación	39
5.3.3. Extracción de ADN.....	39
5.3.4. Control de calidad de muestras previo a detección del VPH	41
5.3.4.1. Alícuotas de muestras de células cervicales.....	41
5.3.4.2. Control de calidad del ADN y de los productos de PCR.....	41
5.3.5. Detección de VPH por medio de PCR de punto final.....	42
5.3.6. Genotipificación y determinación de carga viral del VPH por qPCR. 44	
5.3.6.1. Preparación de reacciones de qPCR	44
5.3.6.2. Muestras control para carga viral del VPH (calibradores)	46
5.3.6.3. Análisis de datos de qPCR	46
5.3.7. Genotipificación y filogenia por secuenciación Sanger.	49
5.3.8. Determinación de sitios de integración viral en el genoma celular ...	52
5.3.9. Detección de variantes en las secuencias virales por secuenciación de nueva generación (NGS)	54
5.3.10. Análisis estadístico	54

CAPÍTULO VI. RESULTADOS

6.1. Descripción de muestras	56
6.2. Genotipificación del VPH	56
6.3. Carga viral del VPH.....	62
6.4. Seguimiento a pacientes VPH positivas.....	66
6.5. Filogenia y Variantes del VPH	67
6.6. Análisis de integración del VPH por medio de NGS.....	72

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN

7. Discusión.....	75
-------------------	----

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES

8. Conclusiones..... 87

CAPÍTULO IX. REFERENCIAS

9. Referencias..... 88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de infección del VPH	4
Figura 2. Organización del genoma viral y funciones génicas.....	7
Figura 3. Integración del VPH en el genoma huésped.. ..	11
Figura 4. Descripción gráfica de las alteraciones producidas por la integración del VPH.....	15
Figura 5. Distribución de muestras para qPCR.	45
Figura 6. Frecuencia de los VPH detectados	61
Figura 7. Carga viral promedio del VPH 16 entre los grupos analizados	64
Figura 8. Promedio de cargas virales de los VPH-AR	65
Figura 9. Media de las cargas virales de cada uno de los VPH presentes en la población analizada	66
Figura 10. Frecuencia de VPH detectados en la segunda consulta	67
Figura 11. Árbol filogenético de las secuencias aisladas de los VPH	69
Figura 12. Subtipos encontrados del VPH 18.....	70
Figura 13. Subtipos del VPH 52 encontrados.....	71
Figura 14. Subtipos del VPH 16 encontrados en nuestra población	72
Figura 15. Número de rupturas en los genes virales	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación general de los tipos de VPH por su riesgo oncogénico y su asociación con enfermedades según la IARC	3
Tabla 2. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar la región L1 del VPH empleando los iniciadores consenso PGMY 09/11 y β -globina.....	43
Tabla 3. Programa para amplificar la región L1 del VPH.....	43
Tabla 4. Condiciones de temperatura y ciclos para la realización de la qPCR ..	46
Tabla 5. Matriz de comparación de los canales para detectar los fluoróforos y los tipos de VPH y controles internos (CI).	47
Tabla 6. Interpretación de los resultados obtenidos con el estuche Amplisens® HPV HCR Genotype titre	48
Tabla 7. Características de la población	58
Tabla 8. Características gineco-obstétricas de la población analizada	58
Tabla 9. Prevalencia de VPH y su asociación con infecciones múltiples en pacientes agrupadas por Papanicolaou en la primera consulta	59
Tabla 10. Resultado del Papanicolaou en pacientes con infecciones múltiples por VPH.....	60
Tabla 11. Tipos de VPH asociados a infección múltiple de VPH.....	60
Tabla 12. Tipos de VPH-AR más frecuentemente encontrados en infecciones múltiples en la primera consulta	61
Tabla 13. Tipos de VPH asociados a carga viral alta	63
Tabla 14. Número de integraciones por grado de lesión y por tipo de VPH.....	73
Tabla 15. Número de integraciones por tipo de VPH y genes virales.	74
Tabla 16. Sitios de integración en el genoma humano por región génica	75

RESUMEN

M.C. Mariel Araceli Oyervides Muñoz

Fecha de graduación: Junio, 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Título del Estudio: “**ESTUDIO DE BIOMARCADORES GENÓMICOS PARA PREDICCIÓN DE CÁNCER CERVICOUTERINO**”.

Número de páginas: 100

Introducción. Las infecciones persistentes del virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo juegan un papel muy importante en el desarrollo del cáncer cervicouterino (CaCU). Información adicional sobre estas infecciones por VPH, como el tipo y subtipo de VPH, la carga viral, infecciones múltiples, la integración del genoma viral en el genoma humano, podrían ser útiles para el diagnóstico, predicción, y evaluación de las posibles consecuencias de la infección y de la prevención por vacunación. **Objetivo.** Identificar biomarcadores genómicos de la evolución de lesiones epiteliales hacia CaCU. **Materiales y Métodos.** Se recolectaron 294 muestras de células cervicales con alteraciones ginecológicas. Se identificó el tipo de VPH por qPCR. Se recolectaron 80 muestras de pacientes VPH positivas en una consulta de seguimiento y fueron evaluadas. Se determinaron los subtipos de VPH por PCR y secuenciación Sanger. La integración del genoma viral se analizó por secuenciación de nueva generación en la plataforma Illumina. **Resultados.** Los tipos de VPH más prevalentes fueron 16, 18 y 39. Ciento cinco pacientes (59%) presentaron infección múltiple de VPH. En las muestras de seguimiento el 38% de las pacientes no había eliminado la infección y fueron consideradas como infecciones persistentes. Encontramos asociación entre las infecciones múltiples y la carga viral alta con la persistencia de la infección. Logramos identificar integración del genoma de VPHs de alto y bajo riesgo en lesiones tempranas. **Conclusiones.** La persistencia de la infección por VPH está asociada a las infecciones múltiples, a la carga viral alta y a la integración del genoma viral desde lesiones tempranas. Nuestros hallazgos contribuyen a la comprensión de la persistencia de la infección por el VPH y podría contribuir a mejorar los programas de tamizaje y los riesgos individuales de infecciones por VPH.

Título: Estudio de biomarcadores genómicos para predicción de cáncer cervicouterino.

I. Introducción

El cáncer cervicouterino (CaCU) es una alteración celular que se manifiesta a través de lesiones de lenta y progresiva evolución, el cual se ha asociado a la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) en el 99% de los casos [1]. Esta infección es necesaria, mas no suficiente para el desarrollo de este tipo de neoplasia [2]. Existen otros factores inmunológicos propios de las pacientes que participan en la eliminación o progresión de la infección del VPH, además de factores virales como la carga viral, el tipo de VPH, la integración del genoma viral en el genoma huésped, entre otros [3-5].

1.1. Epidemiología del CaCU

El CaCU es el cuarto tipo de cáncer con más muertes de mujeres a nivel mundial y el segundo más común en el grupo etario de 15 a 44 años. Cada año se reportan más de 500,000 casos a nivel mundial y la mortalidad es de más de 200,000 casos al año [6]. En México la incidencia es de 23.3 casos por cada 100,000 mujeres (en el 2012) y tiene el primer lugar de incidencia de cáncer en mujeres de 15 a 44 años de edad [7].

1.2. Etiología del CaCU

Prácticamente todos los casos de CaCU se han asociado a la infección por VPH, la cual es la más común del tracto reproductivo. El VPH es el causante de aproximadamente el 5% de todos los cánceres a nivel mundial [8]. Se han identificado más de 200 tipos de VPH [9] y más de 40 de éstos se transmiten por contacto sexual.

Los VPH identificados a la fecha se clasifican en 4 géneros: *Alpha-*, *Nu-/Mu-*, *Beta-* y *Gamma-* papillomavirus, dependiendo de la estructura del genoma viral y el tropismo a tejidos epiteliales humanos [10]. El género *Alpha* incluye los VPH que se han asociado a cáncer, mientras que el resto son asintomáticos, o en el caso de algunos estados de inmunosupresión, pueden causar papilomatosis cutánea o predisponer a cáncer de piel [11].

Los VPH han sido clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC: International Agency for Research in Cancer) de acuerdo a su riesgo oncogénico (Tabla 1). Existen más de 15 subtipos de VPH que se consideran de alto riesgo (VPH-AR) [12], los cuales causan la mayoría de los casos de CaCU.

Tabla 1. Clasificación general de los tipos de VPH por su riesgo oncogénico y su asociación con enfermedades según la IARC [13].

Riesgo oncogénico	Tipos de VPH	Enfermedad asociada
Oncogénicos y/o de alto riesgo	VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Lesiones precursoras y cáncer cervical, anal, vaginal, vulvar, penil, y orofaríngeo
Bajo riesgo	VPH 6, 11	Verrugas genitales, papillomatosis recurrente respiratoria
Probable riesgo	VPH 68	Cáncer cervical
Posible carcinogénico	VPH 5, 8	Carcinoma de células escamosas de la piel en pacientes con epidermodisplasia verruciforme
Posible carcinogénico	VPH 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, y 97	Incierto

Entre los VPH con mayor riesgo oncogénico, los VPH 16 y 18 se han asociado aproximadamente al 70% de los casos de CaCU [14]. De los diferentes grados de lesiones, el VPH más prevalente es el 16, mientras que el VPH 18 varía entre citologías normales y cáncer invasivo, ya que para este último se ha reportado que la prevalencia puede llegar a ser hasta 15%. El VPH 45 se encuentra como el tercero más frecuente en CaCU invasivo [15], mientras que los VPH de bajo riesgo (VPH-BR), como el 6 y 11, se han asociado a condilomas genitales y/o faríngeos.

La prevalencia de los VPH 16 y 18 en distintos grados de lesiones precancerosas varía a nivel mundial. En América Central, la prevalencia de éstos en citologías normales es del 4.7%, en lesiones de bajo grado es del 15%,

en lesiones de alto grado es del 40.8% y en CaCU se han encontrado en cerca del 63.1% [6].

En México existen variaciones en la prevalencia de los tipos virales según la región, en el centro y sur los VPH 16 y 18 son los más prevalentes [16] en pacientes con CC, mientras que en la región oeste, los VPH más frecuentes son 16 y 58 [17].

La infección por el VPH progresa a CaCU en una serie de cuatro pasos: 1) transmisión, 2) infección aguda o transitoria, 3) infección persistente (que conlleva a cambios precancerosos en las células) y por último, 4) cáncer invasivo (Figura 1) [18].

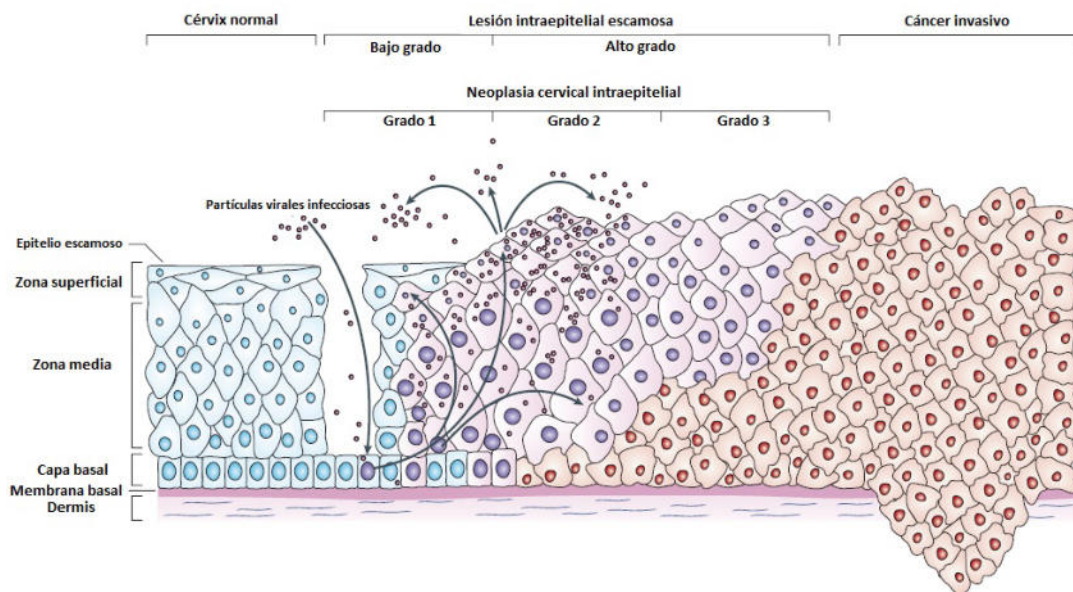


Figura 1. Mecanismo de infección del VPH. Imagen comparativa de los diferentes grados de lesión hasta llegar a cáncer invasivo, donde se observa la replicación de las partículas virales en la zona media del epitelio escamoso [18].

El VPH puede transmitirse a través del contacto directo de piel a piel, piel a mucosa y mucosa a mucosa, de personas infectadas con el VPH. La transmisión se correlaciona con las prácticas sexuales, tanto vaginales como anales y bucales [19]. Con menor frecuencia, la transmisión puede darse de madre a hijo durante el parto natural [20], e incluso por medio de la leche materna [21, 22].

La mayoría de las infecciones por el VPH (~70-80%) son transitorias, [23, 24], es decir, que desaparecen dentro de un año o dos sin necesidad de tratamiento [25]. Del 20 al 30% son infecciones persistentes, mientras que del 1 al 2% de éstas progresan a CaCU [26].

La persistencia de la infección se determina cuando una paciente resulta positiva en las pruebas de detección de VPH en dos o más ocasiones. Sin embargo, esto varía dependiendo del intervalo de tiempo entre las pruebas.

Resulta difícil distinguir entre las infecciones persistentes y transitorias debido a la naturaleza del mecanismo de infección del virus, ya que es muy complejo deducir el tiempo de infección de la paciente antes de la toma de muestra. En algunos estudios se considera una infección persistente a aquella que es padecida por lo menos durante 6 meses. Sin embargo, entre más cortos sean los intervalos de tiempo de las pruebas, es más probable que la infección sea diagnosticada como persistente [27, 28], aunque hace falta determinar si las infecciones persistentes se caracterizan por la continua detección del VPH, o por el estadio latente durante el cual el virus permanece indetectable. Sin embargo, una mujer no puede ser diagnosticada con una infección persistente sólo por resultados positivos para VPH en dos ocasiones en tiempos diferentes, ni

clasificarse como de alto riesgo para desarrollar CaCU. Las pacientes VPH positivas para un tipo de VPH específico, no necesariamente pueden considerarse libres de la infección cuando sus resultados sean negativos para el mismo tipo viral, ya que podría existir un estado latente de la infección, en la cual el virus permanece indetectable y reaparece posteriormente [18]. La persistencia de las lesiones por VPH se encuentra entre los factores de riesgo más importantes para la progresión CaCU y quizás ésta sea la más importante para la progresión a lesiones. Los estudios de seguimiento permiten una evaluación más precisa de la resistencia viral, así como de la progresión de las lesiones por VPH a CaCU [29].

El riesgo de infección por VPH es del 75% en individuos sexualmente activos, aunque el riesgo de infección por VPH y la prevalencia varía según la edad y el género. La infección genital del VPH es más común en edades tempranas (<25 años), los adolescentes y adultos jóvenes tienen el mayor riesgo de infección por este virus [25, 30].

1.3. Características moleculares del VPH

El VPH es un virus pequeño de ADN circular de doble cadena, no envuelto, que infecta la mucosa o el epitelio cutáneo. El VPH tiene un genoma de ocho mil pares de bases que codifica para ocho genes, los cuales, de acuerdo a su expresión, se dividen en tempranos (E) y tardíos (L). EL genoma del VPH se divide en tres regiones principales: la región temprana (E), codifica los genes que se expresan en etapas tempranas de la infección (*E1, E2, E4, E5, E6 y E7*),

estos genes son necesarios para el ciclo viral y tienen un rol importante durante la transformación celular. La región tardía (L), contiene los genes *L1* y *L2*, los cuales codifican para las proteínas de la cápside del virus. Finalmente, la región LCR (Long Control Region), es una región no codificante río arriba que contiene el origen de replicación y los sitios de unión para los factores de transcripción [11, 31] (Figura 2).

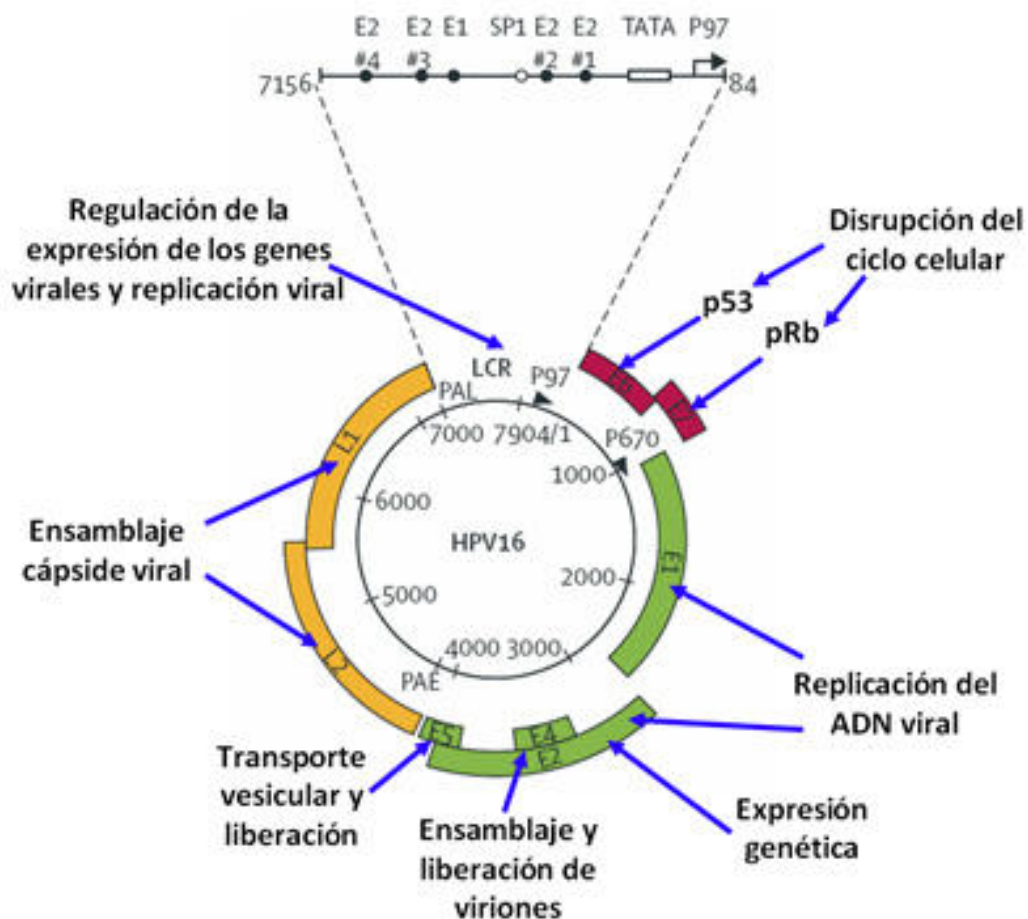


Figura 2. Organización del genoma viral y funciones génicas. El genoma del VPH 16 tiene 7,904 pb (círculo color negro), tiene las regiones promotoras P97 (temprano) y p670 (tardío) marcados con flechas negras. Los 6 marcos de lectura abiertos (ORFs) tempranos (E1, E2, y E5 en color verde), E6 y E7 (color rojo), se expresan desde p97 o p670 en diferentes etapas durante la

diferenciación celular epitelial. Los ORFs L1 y L2 (color amarillo) se expresan desde p670. Los sitios de poliadenilación temprana (PAE) y tardía (PAL) están indicados en el círculo color negro. La región LCR (7156-7184) está agrandada para indicar los sitios de unión de E2 y la caja TATA del promotor p97, así como los sitios de unión E1 y SP1. Las flechas azules indican las funciones de los productos de los genes virales [11].

Las proteínas E1 y E2 se expresan de manera temprana y son requeridas para la replicación del ADN viral y la regulación de la transcripción temprana. La proteína E4 se expresa en los queratocitos completamente diferenciados durante todo el ciclo, mientras que la proteína E5 participa en el ensamblaje viral y la estimulación del crecimiento celular. Las proteínas tardías L1 y L2 conforman la cápside menor y mayor [11]. Las proteínas virales E5, E6 y E7 son oncogénicas y su expresión induce la transformación y la inmortalización celular. Particularmente E6 y E7 son las proteínas oncogénicas que inhiben la función de los genes supresores de tumores p53 y pRb, los cuales regulan el ciclo celular y su inhibición conduce al aumento de la actividad mitótica, la proliferación celular descontrolada y consecuentemente, al desarrollo del CaCU [18].

1.4. Patogénesis del VPH

El VPH infecta las células escamosas epiteliales, las cuales tienen la capacidad de proliferar y acceder a las células basales a través de microtraumas o pequeñas lesiones. El virus llega a la capa basal, en donde las partículas virales se replican ocasionando lesiones de bajo y alto grado, las cuales pueden

progresar a CaCU (Figura 1). El virus puede persistir en las células de la capa basal de forma latente o continuar replicándose mientras las capas basales se diferencian y ascienden a través del epitelio, en el cual comienzan a observarse los cambios histológicos y citológicos. El VPH se mantiene en un número bajo de copias en las células de la capa basal, el número de copias virales aumenta hasta la diferenciación de las células epiteliales y comienza a expresar los genes *L1* y *L2* de la cápside, lo que resulta en nuevos viriones que se liberan en la superficie del epitelio. El VPH se replica y se ensambla en el núcleo de la célula. La expresión de los genes virales depende de la diferenciación celular y está regulada estrictamente a nivel traduccional y postraduccional [32].

Para que exista una persistencia de infección del VPH es necesario que éste infecte células basales con características similares a las células madre y que aún tengan capacidad de proliferar [33]. Lo anterior ocurre en menor frecuencia con los VPH de bajo riesgo. Las zonas de transición, como las del endo y ectocérvix y/o las uniones anorectales, son las regiones más propensas a carcinogénesis ocasionada por los VPH-AR [34]. Los VPH-AR son más propensos a activar la proliferación celular en las capas basales y diferenciadas, promoviendo la transición de una infección “productiva” a una infección “transformante/abortiva”, en la cual ya no continúa el ciclo de vida viral. La integración del genoma viral al huésped puede activar diferentes mecanismos esenciales para la transformación epitelial [35]. Esto podría explicarse por la capacidad oncogénica incrementada que poseen los VPH-AR, particularmente en la actividad de las oncoproteínas E6 y E7, mientras que en los VPH de bajo

riesgo, estos genes están limitados al incremento del estado físico y la producción viral, que es insuficiente para desencadenar el desarrollo de lesiones pre neoplásicas y cáncer [36].

Los VPH-AR han desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped, lo cual es importante para la persistencia viral y progresión de la neoplasia. Uno de los mecanismos para evadir la detección viral por parte del sistema inmune es que el VPH no produce ninguna lisis durante su ciclo viral, por lo que no provoca ninguna señal proinflamatoria que active a las células dendríticas ni induce su migración al sitio de infección [37]. Se han identificado otros mecanismos de evasión del sistema inmune como la regulación de la señal de interferón y la inhibición de las células de Langerhans por la actividad de las proteínas virales E6 y E7, entre otras [26, 38, 39].

Las proteínas E1 y E2 son necesarias para el inicio de la replicación. Además, la proteína E2 controla la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* ya que es un represor transcripcional. Durante el proceso infeccioso, el virus puede encontrarse de manera episomal, es decir, integrado o de forma combinada (episomal/integrado) en relación al genoma de las células huésped. El ADN viral se integra en el genoma de la célula huésped, linearizándose para integrarse, a menudo en la región E1 o E2; esta ruptura del gen E2, produce la desregulación de la síntesis de las proteínas de los oncogenes E6 y E7. Actualmente se ha identificado que el sitio de ruptura del genoma viral puede presentarse en otras regiones del genoma viral y no solo en E1/E2 [40-42].

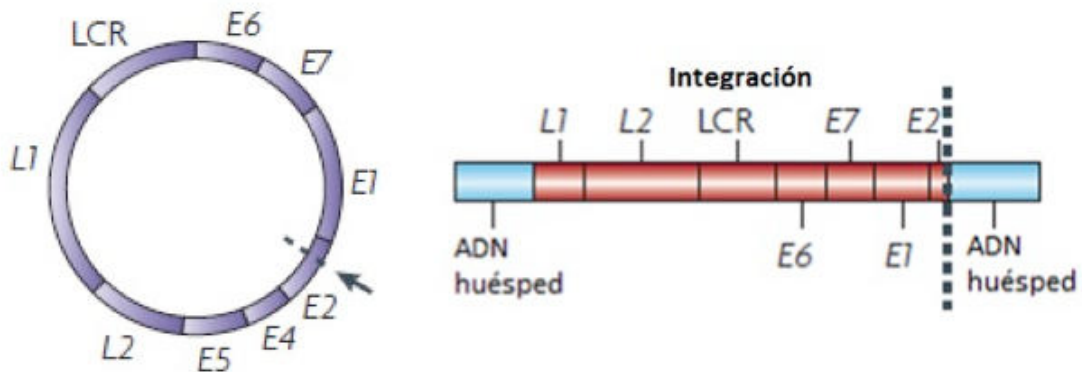


Figura 3. Integración del VPH en el genoma huésped. El ADN del VPH se escinde en el gen E2, se lineariza y se integra en el ADN huésped. Permitiendo así la sobre expresión de los oncogenes virales E6 y E7 [18].

En la forma integrada, el virus llega a producir cambios en el sistema celular, favoreciendo la replicación de las partículas virales. Actualmente existen diversas hipótesis sobre la relación que guarda el estado del virus con el estadio de las lesiones. Se ha sugerido que en los procesos neoplásicos avanzados el virus se ha integrado por completo en el genoma, mientras que en otras investigaciones no se ha podido establecer el momento de integración.

1.5. Factores de riesgo para CaCU

1.5.1. Biomarcadores virales

La infección persistente de los VPH-AR es un factor de predicción de riesgo de CaCU [43, 44]. Aquellas mujeres que no logran eliminar la infección son las que

se encuentran en mayor riesgo de desarrollar una neoplasia. La infección del VPH es necesaria mas no única para el desarrollo de lesiones precancerosas o cáncer. Dentro de los tipos de VPH involucrados en el proceso carcinogénico, el VPH 16 es el que más se ha asociado a una progresión rápida de lesiones y/o cáncer invasivo [45, 46], ya que se ha encontrado en cerca del 60% de los casos de CaCU y en otros tipos de cáncer. Otros tipos de VPH-AR que se han detectado comúnmente en diferentes tipos de cáncer son los VPH 18, 45, 31 y 33 [47].

La infección por los VPH 16/18 en lesiones precancerosas progresa más rápido a cáncer que con otros tipos de VPH-AR [48]. Además, la carga viral alta de los VPH 16 y 18 ha sido asociada con el incremento de grado de lesión [49, 50].

El valor pronóstico de la detección de infecciones persistentes por VPH se ha estudiado para medir la eficacia de los tratamientos para lesiones o CaCU [51, 52], como biomarcador para predecir: lesiones neoplásicas [53], de progresión [54] y de pronóstico clínico [55, 56].

La determinación del genotipo de VPH, tienen un valor clínico que va en aumento al asociarse con el pronóstico de esta neoplasia [57-59]. Además del valor epidemiológico para mejorar y ampliar el sistema de inmunización [60], como pasó con la vacuna para este virus, la cual inicialmente estaba dirigida contra dos genotipos virales (16 y 18) pero que actualmente está dirigida contra nueve tipos (VPH 6,11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, y 58) [20, 61-64].

La carga viral también se ha identificado como un biomarcador de riesgo asociado a la severidad de las lesiones y a la predicción de las mismas [50, 53,

65-67]. Además, en el caso de los VPH-AR, como el 16 y el 18, la carga viral se ha visto asociada al pronóstico del CaCU [54-56, 68].

La expresión de los oncogenes E6 y E7 ha sido empleada como biomarcador de detección de infecciones latentes [69, 70], para determinar el riesgo de progresión de esta neoplasia [70, 71] y como parte de las pruebas de triaje para el diagnóstico de lesiones neoplásicas [72].

El estado físico viral del VPH (episomal e integrado) varía en los diferentes estadios de esta enfermedad y se ha asociado a la severidad de las lesiones. Aunque se ha detectado que el virus se encuentra mayormente integrado en estadios más avanzados, también se ha detectado integración viral en algunos casos de lesiones tempranas [73], por lo se ha sugerido que el estado de integración puede emplearse como biomarcador de progresión [42, 49, 74].

La mayoría de los estudios de determinación del estado viral del VPH, están basado en la relación E2/E6 o E2/E7, sin embargo, el sitio de ruptura del genoma viral no siempre ocurre en la región E1/E2 como se había reportado [40-42]. Estudios recientes evidencian que este fenómeno puede ocurrir en cualquier parte del genoma del VPH, más comúnmente en el gen E1 [75]. Esto sugiere que existen otros mecanismos de oncogénesis independientes de la expresión de E6 y E7, como la metilación del genoma viral y/o del huésped [76], los cuales, en conjunto con la prueba del Papanicolaou sirven como biomarcadores para la predicción de la severidad de las lesiones neoplásicas [77].

La integración del genoma viral en el genoma huésped se ha propuesto como mutación conductora para la carcinogénesis [78, 79]. Este fenómeno es

considerado un biomarcador de predicción de severidad de la infección por el VPH para evolucionar hacia lesiones y/o cáncer [73, 80-82].

Una de las consecuencias de la integración viral, es la alteración de diferentes mecanismos que pueden llevar a la oncogénesis. El primer mecanismo es cuando se produce una pérdida de función de un gen supresor de tumores y así genera la expresión de una forma trunca de la proteína [83-85]. El segundo es cuando hay incremento de la expresión de un oncogen [83], esto debido a que la integración ocurre río arriba del oncogen y provoca la sobreexpresión de éste y/o otros genes involucrados en la vía donde participa [84]. Y el tercer mecanismo oncogénico producido por la integración viral corresponde a los rearrreglos inter e intra cromosomales, los cuales ocurren en genes clave que propician la sobre expresión de oncogenes o que truncan la expresión de genes supresores de tumores [86] (Figura 4).

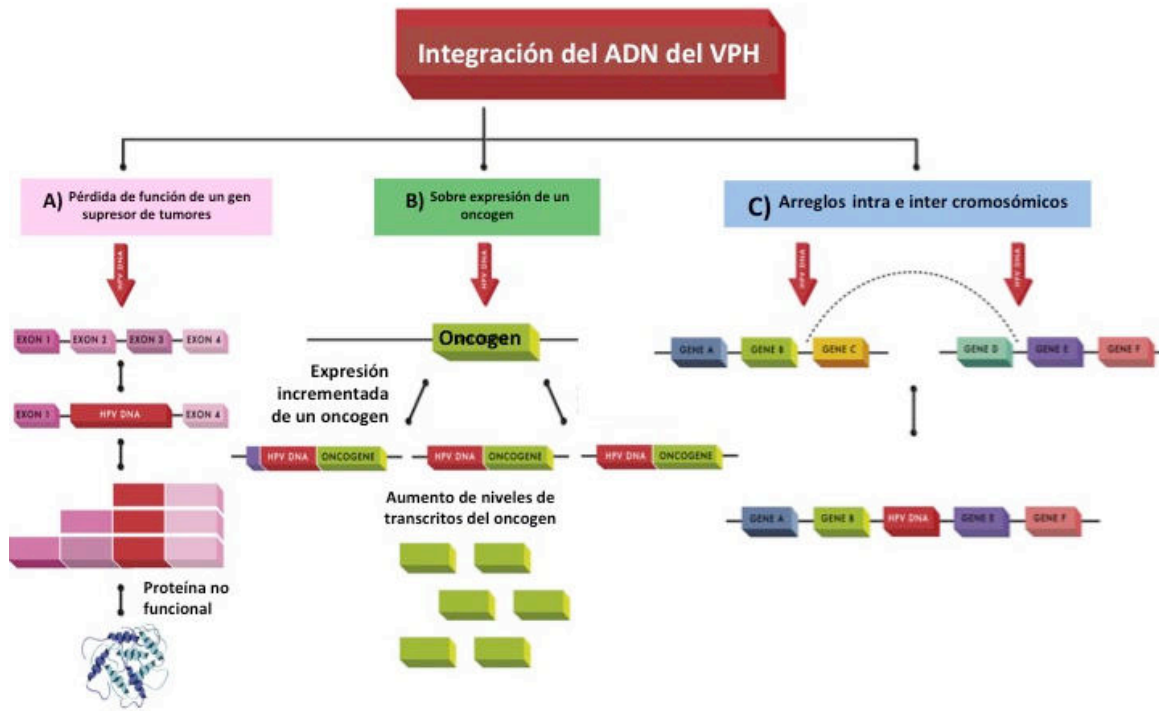


Figura 4. Descripción gráfica de las alteraciones producidas por la integración del VPH. A) Pérdida de la función de un gen supresor de tumores. B) Incremento de la expresión de un oncogen. C) Rearreglos inter o intra cromosomales.

1.5.2. Factores exógenos que contribuyen al desarrollo del CaCU

Además de las características virales que contribuyen a la carcinogénesis, existen otros factores externos o ambientales que a lo largo del tiempo han sido identificados como factores de riesgo de progresión a CaCU. Tales como el tabaquismo [87], el uso prolongado de anticonceptivos orales [88-91], las relaciones sexuales no protegidas y la falta de circuncisión en la pareja masculina [92].

Entre otros factores que aumentan el riesgo de adquirir el virus y su probable evolución a CaCU se encuentran la multiparidad [93], la edad de inicio de vida sexual activa [94, 95], el historial de las parejas sexuales, el número de contactos sexuales, relaciones sexuales no monógamas [94], entre otros.

Otros factores externos incluyen las coinfecciones con otros virus o enfermedades de transmisión sexual, tales como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus del Herpes Simplex 2 (HSV-2), Virus del Hepatitis B (HBV), Virus del Hepatitis C (HCV), los cuales se han asociado a un aumento del riesgo de producir lesiones por el VPH; además de otras infecciones sexuales como la gonorrea, clamidia y sífilis [96]. La evolución de la infección de VPH-AR es afectada por la co-infección con VPH de bajo riesgo, ya que la presencia de verrugas genitales aumentan el riesgo de padecer cáncer relacionado a VPH, como el CaCU [97]. Algunos factores del huésped se ven involucrados en la progresión de la infección a CaCU, como la inmunosupresión (en pacientes con VIH) y algunas deficiencias en la dieta, que se han asociado como probables cofactores, pero no se han encontrado suficientes asociaciones [98-100].

Los factores de riesgo externos incluyen la baja cobertura para detección del VPH y citología en países en vías de desarrollo, factores culturales, la falta de conocimiento de esta neoplasia y las fallas en la detección oportuna. Estos factores han contribuido a la falta de atención personal para acudir a las citas periódicas de control médico. La falta de conocimiento del riesgo que generan las infecciones por el VPH, así como los periodos prolongados entre chequeos

médicos, han contribuido a que esta neoplasia se diagnostique en estadios avanzados. Esto se presenta con mayor frecuencia en poblaciones con bajos ingresos económicos, por lo que un estado socioeconómico bajo representa un factor de riesgo que contribuye al desarrollo de CaCU [101].

1.6. Prevención del CaCU

1.6.1. Detección de lesiones por el VPH

Se ha establecido que para reducir la incidencia y mortalidad del CaCU son necesarios programas de detección del VPH y programas de detección de alteraciones del cuello de la matriz por medio del Papanicolaou. En nuestro país existen estrategias de detección gratuitas, sin embargo, estos no cubren todas las zonas más alejadas y rurales, de difícil acceso. Es debido a esto que la incidencia del CaCU en nuestro país sigue siendo un problema importante de salud pública [7].

La prueba estándar de oro para la detección del CaCU es la citología, en la cual se observan las células cervicales fijadas y teñidas en una laminilla. En caso de encontrarse anomalías se realiza una colposcopia, donde se observa el tracto uterino a través de un colposcopio en busca de anomalías en el cérvix. Para observar las lesiones neoplásicas se realizan tinciones con lugol y ácido acético para revelar posibles lesiones intraepiteliales, ya que éstas se tiñen de color blanco con el ácido acético y no absorben el color café con el lugol. Para

confirmar la presencia de lesiones se realiza una biopsia y se confirma por patología.

Existen dos tipos de citologías, la convencional, en la que el raspado de células de cérvix se fija directamente en un portaobjetos; y la líquida, en donde la muestra de células cervicales es colocada en un medio de transporte líquido y centrifugada para su posterior fijación en laminilla. Un frotis de Papanicolaou logra reunir entre 600,000 y 1.2 millones de células epiteliales cervicales y menos del 20% se transfieren al portaobjeto, además de que es aleatorio y sujeto a errores si las células anormales no se distribuyen de forma homogénea por toda la muestra. La prueba de citología líquida ofrece la ventaja de que la muestra de células puede ser analizada también para la presencia de tipos de VPH-AR en una prueba conjunta de Papanicolaou. Además, se reduce la probabilidad de que una muestra no sea satisfactoria, ya que tras su filtración a través de una membrana, retiene a las células cervicales con la finalidad de impregnarlas formando una monocapa en una laminilla.

En reportes anteriores, se ha observado que la sensibilidad de la prueba de Papanicolaou por sí sola es de aproximadamente 55%, mientras que la detección de VPH es cerca del 94% [102]. La prueba del Papanicolaou tiene una mayor especificidad para detectar lesiones precancerosas (97%) comparada con la detección de VPH es de 94%. Sin embargo, en conjunto, la especificidad y sensibilidad de ambas pruebas llega hasta el 100% para la detección oportuna del CaCU.

Clasificación Bethesda de las anomalías celulares [103].

Este sistema clasifica por separado las anomalías de las células escamosas y de las células glandulares.

1. Células escamosas

Las células escamosas atípicas (atypical squamous cells, ACS), son el resultado anormal más común en las pruebas de Papanicolau. El sistema Bethesda divide esta categoría en dos grupos:

- ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US). En esta clasificación las células escamosas parecen ligeramente anormales sin una causa específica aparente. En algunas ocasiones estos cambios pueden estar relacionados con una infección por VPH, pero pueden ser causados también por otros factores. Para clarificar estos casos, se puede analizar una muestra de células en busca de tipos de VPH-AR. En caso de encontrarse alguno presente, se realizan pruebas de seguimiento. En caso de ser negativo para VPH se puede tener certeza de que no hay cáncer o un estado precanceroso.
- ASC-H: las células escamosas atípicas (atypical squamous cells), no pueden excluir una lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Las células no parecen normales y se desconoce el significado de los cambios celulares. Es posible que exista un riesgo mayor de que las ASC-H sean lesiones precancerosas en comparación con las lesiones ASC-US.

Las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) en la capa de las células de la superficie del cérvix se consideran anomalías leves causadas por una infección por VPH, donde se han observado los primeros cambios en el tamaño y en la forma de las células. Las LSIL suelen clasificarse como displasias leves, o como neoplasias intraepiteliales de cérvix (CIN-1, cervical intraepithelial neoplasia).

Las lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG), son anomalías más graves que tienen una probabilidad mayor de que se conviertan en cáncer si no son tratadas. Se presentan cambios más marcados en el tamaño y en la forma de las células anormales (precancerosas) y las células se ven muy diferentes a las células normales. Las LIEAG comprenden lesiones con displasia moderada o grave y carcinoma in situ (CIS). Se clasifican como CIN-2, CIN-3 o CIN-2/3. El CIS normalmente se incluye en la categoría CIN-3.

El carcinoma de células escamosas (squamous cell carcinoma, SCC), es el cáncer de cérvix. En esta etapa las células escamosas anormales han invadido más profundamente el cérvix, así como otros tejidos u órganos.

2. Células glandulares.

Las anormalidades de las células glandulares se dividen en las siguientes categorías:

- Células glandulares atípicas (atypical glandular cells, AGC). Las células no parecen normales y se desconoce el significado de los cambios celulares.
- Adenocarcinoma endocervical in situ (endocervical adenocarcinoma in situ, AIS). Las células precancerosas se encuentran solamente en el tejido glandular del cérvix. El adenocarcinoma incluye al cáncer endometrial, como también al cáncer extrauterino.

Las pruebas de detección del VPH buscan el ADN viral de diferentes VPH-AR y/o VPH-BR en las células del cérvix y pueden detectar la presencia de una infección viral antes que alguna anomalía de las células se haga visible. Existen diferentes tipos de pruebas de detección del genoma del VPH, la más común es la captura de híbridos (HC2), la cual detecta el ADN de los tipos de VPH-AR; sin embargo no puede identificar el tipo o los tipos específicos que están presentes en la muestra. Existen otras pruebas específicas para detectar el ADN de los tipos de VPH 16 y 18, que son los que causan la mayoría de los cánceres relacionados con VPH, como las que emplean sondas para PCR en tiempo real [104, 105].

En conjunto, estos métodos de tamizaje de lesiones precancerosas se han incorporado como pruebas de triaje para la detección oportuna y priorización de lesiones precancerosas, lo cual permite aumentar la sensibilidad y especificidad

y así disminuir los falsos negativos. Con el avance de la tecnología, las recomendaciones de las pruebas de tamizaje han ido cambiando. La sensibilidad del Papanicolaou puede aumentarse con la detección de biomarcadores predictivos de neoplasias. Entre estos se encuentra la detección de VPH-AR en citologías anormales y la detección de la sobreexpresión de p16/ki67 [106, 107].

Actualmente el diagnóstico del CaCU por la Secretaría de Salud en Nuevo León se realiza mediante una citología en las mujeres de 21 a 35 años. En caso de observar anomalías se prosigue a realizar una colposcopia para observar el estado de la lesión cervical; mientras que a las mujeres mayores de 35 años se les realiza la prueba de captura de híbridos (H2C), la cual detecta el ADN de VPH-AR. En caso de positividad para H2C se realiza una colposcopia para observar la citología y/o estado de la lesión cervical presente o clasificación del estadio de CaCU. Las pruebas disponibles de triaje ayudan a identificar a las mujeres que requieren más pruebas de diagnóstico para la confirmación de una lesión, evitando tratamientos innecesarios y disminuyendo costos en pacientes que tienen un menor riesgo de desarrollar CaCU [108]. Las pruebas de detección de VPH-AR han sido incorporados en países desarrollados, en nuestro país ya se ha implementado la detección de VPH-AR por medio de HC2 por parte del Instituto Nacional de Secretaría de Salud Pública y la Secretaría de Salud [109]. Para el año 2009, estaban operando en México 12 laboratorios de biología molecular para la detección de VPH-AR, proporcionando las pruebas de VPH para el tamizaje de CaCU en la población. La cobertura nacional para estas

pruebas fue del 10% [110]. Si bien las pruebas de VPH estaban disponibles a través de estos nuevos laboratorios, las pautas del programa de detección de CaCU todavía recomendaban la citología de la prueba de Papanicolaou como la prueba de detección primaria para mujeres menores de 35 años; estas pacientes no son evaluadas para la infección por VPH [111]. La desventaja de esta estrategia es la baja sensibilidad de la prueba de Papanicolaou y que no todas las áreas del país tienen acceso a la colposcopia y a la prueba de detección de VPH con H2C.

1.6.2. Detección del VPH

Actualmente, la mayoría de las pruebas de detección del VPH se basan en la detección del ADN viral mediante técnicas de amplificación, como la PCR, ya sea específica para un tipo de VPH o para varios (con iniciadores consenso). Existen pruebas de detección del ADN de VPH-AR aprobadas por la FDA (US Food and Drug Administration) de Estados Unidos [112], como la HC2, la cual se ha vuelto la estándar de oro por la alta sensibilidad y relativamente alta especificidad. La HC2 detecta 13 tipos de VPH-AR. Existen otras pruebas de detección de VPH aprobadas como: Cervista HPV HR® y Cervista HPV16/18®, las cuales detectan 14 y 2 tipos de VPH respectivamente, Aptima® que detecta el ARN de 14 tipos de VPH; y el Cobas 4800® que detecta 14 tipos de VPH por PCR en tiempo real (qPCR). Estos últimos métodos de detección son costosos y no se han implementado como parte del tamizaje de nuestro país.

Las pruebas de detección de VPH por PCR empleando iniciadores consenso se basan en la amplificación del ADN viral de la región L1 del virus, ya que esta es la más conservada entre los diferentes tipos virales. La técnica utiliza iniciadores consenso como los PGMY 09/11, MY 09/11, para posteriormente identificar el tipo de VPH mediante otras técnicas como hibridación reversa, secuenciación, o PCRs específicas para un tipo de VPH [113].

Conforme ha avanzado la tecnología, se han buscado y desarrollado nuevos métodos mucho más sensibles para la detección del ADN viral [114], como la PCR digital en nanogotas (ddPCR) [114]. Además de la secuenciación masiva de nueva generación ha permitido identificar de forma más precisa la historia natural del VPH y ha modificado los conocimientos que se tenían en este campo. Estos nuevos conocimientos nos permiten entender mejor la evolución de las infecciones por VPH y su progresión a cáncer, con el fin de buscar formas de detectar a tiempo las lesiones precancerosas y además, determinar cuáles son las pacientes con un mayor riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia.

1.6.3. Vacunas para el VPH

Actualmente existen 3 vacunas para la prevención del CaCU aprobadas por la FDA de Estados Unidos. Las vacunas se han diseñado para prevenir las infecciones del VPH más comunes. La primera vacuna diseñada fue Cervarix®, la cual protege contra la infección de los VPH 16 y 18 . Posteriormente se desarrolló la vacuna cuadrivalente Gardasil®, dirigida contra 4 tipos de VPH, incluyendo dos tipos de VPH-BR 6 y 11 y los VPH-AR 16 y 18 [61, 115].

Recientemente se desarrolló la vacuna 9-valente, de la marca Gardasil® aprobada en diciembre del 2014; en donde además de los 4 tipos de VPH de la vacuna cuadrivalente, se añadieron los VPH 31, 33, 45, 52, 58 [64].

El esquema de vacunación consiste en 3 dosis, una subsecuente a los 2 meses y posteriormente a los 6 meses. La vacuna está recomendada para aplicarse tanto en hombres como en mujeres, desde los 9 hasta los 26 años de edad, preferentemente aquellos que no hayan iniciado una vida sexual activa. Aún no existen estudios que comprueben la efectividad en pacientes que hayan estado en contacto con el virus [32]. En nuestro país, únicamente se distribuyen las primeras dos vacunas (las de 2 y 4 tipos de VPH), esto como parte del esquema nacional de vacunación, las cuales fueron implementadas en el 2012 [6]. La vacunación contra el VPH en México comenzó en el 2009 [116]. La vacuna bivalente (Cervarix) se implementó con un esquema de tres dosis (0, 6 y 60 meses). En la actualidad, un escenario de cobertura de vacunación universal contra el VPH en México no es viable, dados los altos costos de la vacuna [117]. La opción rentable más factible ha sido seguir una estrategia de vacunación selectiva, donde las mujeres que viven en áreas marginadas y con menos acceso a los servicios de salud tienen prioridad para recibir la vacuna. Actualmente, la cobertura de la vacuna contra el VPH en México es del 40% [118]. El objetivo es alcanzar una cobertura nacional superior al 70% en niñas de 12 a 16 años.

1.6.4. Tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento médico para las infecciones por el VPH. Las lesiones cervicales y las verrugas que pueden resultar de dichas infecciones se pueden tratar por los métodos comúnmente usados para tratar las lesiones cervicales como crioterapia, escisión quirúrgica, láser, conización o histerectomía. Además, pueden administrarse algunos medicamentos para tratar las verrugas como Imiquimod (Aldara), Podofilina y podofilox (Condylox) que son estimuladores del sistema inmune [119, 120].

1.7. Cambios genéticos en la progresión a CaCU

Actualmente no están muy claros los factores de riesgo involucrados en la progresión y persistencia de las infecciones de VPH a CaCU, por lo que es importante la búsqueda de biomarcadores. Los biomarcadores son indicadores de un estado biológico y pueden servir como nuevos blancos terapéuticos, para un monitoreo personalizado y/o una detección oportuna. Estos pueden encontrarse por medio de diferentes técnicas y actualmente una de ellas es la secuenciación masiva, la cual nos proporciona diferentes ventajas como: 1) una alta sensibilidad, ya que puede revelar mutaciones de una sola célula; 2) un monitoreo de eficacia de tratamiento, 3) una mejor comprensión de los cambios genéticos conducentes al cáncer y de sus vías oncogénicas, lo cual nos permite distinguir entre mutaciones “conductoras” vs mutaciones “pasajeras”, 4) analizar la relevancia de la heterogenicidad intratumoral y 5) la identificación de nuevos

blancos terapéuticos, así como nuevos genes asociados a cáncer, entre otros [121-123].

Existen estudios en donde se han asociado genes que al acumular mutaciones conllevan a la progresión del CaCU [83], sin embargo, aún no se desconoce si estas mutaciones están presentes en lesiones precursoras.

1.8. Filogenia del VPH - Subtipos y variantes del genoma viral

Se han identificado variaciones en el genoma del VPH en pacientes infectadas con el VPH 16 que evolucionan a cáncer invasivo, en las cuales el gen E7 se encuentra altamente conservado, en comparación con aquellas infectadas con VPH 16, que no evolucionan a cáncer y en las cuales existen más variantes en el gen E7. La conservación de E7 es crítica para la progresión a CaCU [124]. Además, se ha reportado que existen variantes del VPH que tienen un mayor riesgo oncogénico, como los subtipos de VPH 16 no europeos. En el 2015, en una población en Estados Unidos en donde analizaron 796 muestras de VPH 16, se reportó que los linajes de subtipo no Europeo (B/C/D) estaban asociados a un mayor riesgo de lesiones precursoras y CaCU [125]. En un reporte en México, en el 2013, se identificaron linajes Asiáticos Americanos (D) asociados con mayor riesgo de cáncer cervical [126].

Los factores virales y del huésped actúan directamente en la desregulación de los mecanismos de control generando alteraciones genéticas que pueden acumularse y conducir al desarrollo de CaCU [86]. En muchos estudios estos factores se han propuesto como biomarcadores y se han tratado de asociar con

la severidad de las lesiones, con la progresión, confirmación de diagnóstico, pronóstico, entre otras.

A pesar del uso de técnicas novedosas en la determinación de biomarcadores, no hay reportes de estudios recientes en lesiones precursoras de CaCU en los que se combinen estos marcadores virales y del huésped, los cuales permitan determinar y predecir el riesgo de persistencia y progresión de dichas lesiones a CaCU.

II. JUSTIFICACIÓN

2. Justificación

Aunque el examen histológico es aún el “estándar de oro” en el diagnóstico del CaCU, éste está limitado a la interpretación morfológica y proporciona información limitada sobre el riesgo de persistencia y progresión o de regresión. Además, existe una alta variabilidad entre observadores del Papanicolau. Por lo tanto, se requiere de biomarcadores más objetivos que proporcionen un diagnóstico temprano, mejoren la precisión diagnóstica de lesiones cervicales, identifiquen pacientes con riesgo de progresión a cáncer y permitan evaluar y monitorear tratamientos terapéuticos.

Encontrar biomarcadores que estén específicamente asociados con la progresión de la enfermedad será de gran utilidad para mejorar el diagnóstico oportuno del CaCU.

III. HIPÓTESIS

3. Hipótesis

El tipo de VPH, la carga viral, las variantes de las secuencias virales, la integración del VPH y las mutaciones en genes asociados a CaCU, pueden emplearse como biomarcadores de predicción de progresión a CaCU.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar biomarcadores genómicos predictivos de la evolución de una lesión epitelial hacia cáncer cervicouterino.

4.2. Objetivos específicos

1. Identificar el tipo de VPH y la carga viral presente en pacientes con lesiones cervicales de bajo y alto grado y en biopsias con CaCU. (Genotipificación)
2. Identificar el tipo de VPH y la carga viral en muestras de pacientes con infección persistente. (Seguimiento).
3. Identificar variantes del gen viral L1 de los diferentes tipos de VPH. (Filogenia).
4. Determinar los sitio de ruptura del genoma viral y los sitios de integración en el genoma humano. (Integración).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Lugar de realización del estudio e instituciones participantes

El desarrollo experimental del proyecto tuvo como sede el laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Este proyecto contó con el valioso apoyo de uso de equipos del Laboratorio Nacional Biobanco del CONACYT.

Los Departamentos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL que colaboraron en este trabajo fueron:

- El Departamento de Ginecología y Obstetricia
- El Departamento de Anatomía Patológica

En el Departamento de Ginecología y Obstetricia se reclutaron todas las pacientes, se realizó el historial clínico, se tomaron las citologías líquidas y se llevó a cabo el estudio de seguimiento. En el Departamento de Anatomía Patológica se realizó el diagnóstico de las muestras de Papanicolaou y se seleccionaron las de tejidos cervicales para su posterior estudio con pruebas moleculares.

5.2. Material

5.2.1. Origen de los reactivos

Las muestras citológicas fueron preservadas en medio líquido de la marca ThinPrep PreservCyt Solution (Marlborough, MA, EUA). La extracción de ADN total de las células cervicales se realizó con el estuche comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit de la casa comercial Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). La extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina se realizó con el estuche comercial AllPrep FFPE DNA/RNA/miRNA Universal Kit de la compañía Qiagen (Hilden, Alemania). Para la realización de la PCR, se usó el AmpliTaq Gold 360 Master Mix de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por la compañía IDT Technologies (Coralville, IA, EUA). Para la realización de la qPCR se utilizó el estuche comercial Amplisens® HPV HCR-genotype-titre-FRT de la marca *E. Coli* (Bratislava, República Eslovaca). El estuche comercial utilizado para la purificación del producto de PCR para secuenciación Sanger fue de la marca Promega (Madison, WI, EUA). La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el estuche BigDye Terminator v3.1 de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). La purificación de los productos de la PCR del ciclo de secuenciación se llevó a cabo con el estuche de purificación BigDye XTerminator (Foster City, CA, EUA). La determinación del sitio de integración del VPH se realizó utilizando sondas de VPH de la compañía MyGenostics, EUA. Se construyeron las librerías utilizando los estuches comerciales de la compañía Illumina (San Diego, CA, EUA). La cuantificación de

las librerías se llevó a cabo con el estuche High Sensivity de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA).

5.2.2. Material Biológico

Las muestras citológicas fueron colectadas en la consulta de colposcopia del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL. Las muestras fueron preservadas en 5 mL de medio líquido PreservCyt, divididas en alícuotas y conservadas a -70° C hasta su uso.

Las muestras de los tejidos embebidos en parafina se recolectaron en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL. Todas las muestras se almacenaron a temperatura ambiente.

5.2.3. Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizó el siguiente equipo: microcentrifuga Eppendorf modelo 5415 (Hamburg, Alemania), centrifuga Thermo Scientific modelo ST16R (Altham, MA, EUA), congelador TSU series 300A de la compañía Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA), fuente de poder Thermo Scientific EC 300 XL (Waltham, MA, EUA). Para visualizar los geles de agarosa, se utilizó el fotodocumentador UVITEC (Cambridge, Reino Unido). Para la cuantificación del ADN y análisis de calidad, se utilizó el equipo nano Drop 2000 de la compañía

Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA). Los reactivos se almacenaron en un congelador CV 16 marca Torrey (Monterrey, NL, Mex). El termociclador utilizado fue el modelo 9902 Verity Thermal Cycler de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Para realizar la qPCR, se utilizó el equipo 7500 Fast Real Time System de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). La secuenciación Sanger se llevó a cabo en el ABI 3500 de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). La secuenciación masiva se llevó a cabo en un secuenciador HiSeq 2000 de la compañía Illumina Inc (San Diego, CA, EUA).

El procesamiento de los datos se realizó en computadoras Apple modelo MacBook Pro 13. Los procesadores de texto utilizados fueron: Microsoft Word for Mac 2011 versión 14.1.0 (Redmon, WA, EUA), procesadores de gráficos Microsoft Power Point y Microsoft Excel para Mac 2011 Versión 14.1.0 (Redmon, WA, EUA), EndNote basic de Web Of Knowledge de Thomson Reuters (Nueva York, NY, EUA). Los programas de análisis en Biología Molecular utilizados fueron: Gene coder 4 for Mac de Molecular Biology software, MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 7.0 para mayor conjunto de datos, 7500 Real Time software versión 2.0 de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), SeqScape® Software 3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Para el análisis estadístico, se utilizaron los programas computacionales IBM SPSS Statistics para Macintosh versión 20 y el paquete estadístico R (R Core Team, 2013) (R: A language and environment for statistical computing).

5.3. Métodos

5.3.1. Estrategia General

El presente proyecto es un estudio descriptivo, observacional, longitudinal y prospectivo, en el cual se dio seguimiento a dos grupos de pacientes con el objetivo de identificar biomarcadores para predecir la evolución del cáncer cervicouterino. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con la clave B111-002. Después de su aprobación se colectaron muestras citológicas de pacientes que se atendieron en la consulta de colposcopia del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y que aceptaron participar en el estudio. Se colectaron datos geográficos, epidemiológicos, factores de riesgo e historial clínico. Se creó un biobanco de muestras de citología líquida con su respectiva base de datos. Para realizar el estudio de seguimiento se tomó una segunda muestra de citología líquida entre 6 meses y un año después de la primera toma, En esta segunda muestra se identificaron a las pacientes con persistencia de la infección por VPH. Para aquellas pacientes que tenían indicada una toma de muestra de tejido o biopsia, se incluyeron los tejidos embebidos en parafina para el análisis, los cuales nos fueron proporcionados por el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. A las muestras biológicas (citología en base líquida y bloques de parafina) se les extrajo el ADN para realizar la

detección, genotipificación y cuantificación del VPH por PCR de punto final y qPCR respectivamente. Además, se realizó secuenciación de los productos de PCR para confirmar los resultados de genotipificación y realizar filogenia de los virus encontrados. Con las muestras obtenidas en la segunda visita, se determinó la persistencia de la infección por VPH en las pacientes. A partir de las muestras de ADN, se amplificaron los genes L1, E6 y E7 de los VPH-AR y se realizó el análisis de variantes. Se determinó el sitio de ruptura del genoma viral y el sitio de integración en el genoma humano mediante una hibridación con sondas de VPH y secuenciación masiva de los productos híbridos. Se realizó el análisis de variantes y el análisis de los sitios de integración del VPH en las muestras. Se analizaron los datos con el programa estadístico SPSS y el paquete estadístico de R.

5.3.2. Selección de muestras

Se incluyeron pacientes que asistieron a la consulta de Colposcopia del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL. Se seleccionaron 4 grupos de pacientes. Todas las pacientes que participaron en el proyecto lo hicieron de forma voluntaria, se realizó una entrevista en donde se les explico en que consistía en proyecto y se resolvieron todas sus dudas. Una vez terminada la entrevista, todas las pacientes que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado.

1. Grupo control: Pacientes sin lesiones neoplásicas y/o infecciones por VPH; y que a los 6 meses resultaron negativas a la infección.

2. Grupo de regresión: Pacientes con lesiones ocasionadas por VPH y que en la consulta de seguimiento eliminaron la infección por el VPH y ya no presentaran ningún tipo de lesión.
3. Grupo persistente: Pacientes con lesiones ocasionadas por VPH y que en la consulta de seguimiento no eliminaron la infección por el VPH o que presentaron algún tipo de lesión neoplásica.
4. Grupo CaCU: Pacientes con lesiones de alto grado y/o CaCU positivas a VPH.

5.3.2.1. Criterios de selección

- Pacientes que cumplieron con los requisitos de alguno de los 4 grupos.
- Pacientes que no habían recibido quimioterapia en los últimos 10 años.
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio.
- Mujeres mayores de 18 años.

5.3.2.2. Criterios de exclusión

- Mujeres menores de 18 años.
- Pacientes VIH y/o VHC, positivas.
- Pacientes embarazadas.

5.3.2.3. Criterios de eliminación

- Muestras que no cumplieron los criterios de calidad del ADN.

5.3.3. Extracción de ADN

A partir de las muestras de células cervicales se realizó extracción de ADN empleando el Kit Invitrogen, siguiendo el protocolo del fabricante, el cual se describe a continuación.

Tratamiento de muestra. Se calentó en el termomixer a una temperatura de 55 °C, se agregaron 400 µL de solución PBS a la muestra y se mezcló en vortex. Se añadió un volumen de 20 µL de proteinasa K y se homogeneizó con vortex; posteriormente, se añadió un volumen igual (400 µL) del reactivo PureLinkLysis/Binding Buffer al lisado y se mezcló nuevamente en vortex. Se colocó en el termomixer a 55°C por 15 minutos sin agitación.

Unión del ADN. Se introdujo la columna en tubo colector y se añadió al lisado preparado 640 µL, con el buffer y etanol PureLinkLysis/Binding la columna (se puede repetir con sobrante). Se centrifugó la columna a 10,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó el tubo colector y se introdujo la columna en un tubo colector limpio PureLink.

Lavado del ADN. Se añadió 500 µL de Buffer de lavado 1 a la columna; posteriormente, se centrifugó la columna a temperatura ambiente a 10,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el tubo colector y se introdujo la columna en un tubo colector limpio PureLink. Se añadieron 500 µL de Buffer de lavado 2 a la

columna y se centrifugó la columna por 3 minutos a razón de 15,000 rpm. Finalmente se descartó el tubo colector.

Elución del ADN. Se colocó la columna en un micro tubo estéril de 1.5 mL y se añadió 25 μ L de GenomicElution Buffer a la columna, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugó a 15,000 rpm por 1 minuto. En algunos casos se realizaron más eluciones a partir de la columna, siguiendo los mismos pasos de este protocolo.

Para las muestras de tejido embebido en parafina, se realizó extracción de DNA empleando el estuche QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit de la marca QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante, el cual se describe a continuación.

Tratamiento de muestra. Se rompió el tejido mediante uso del tissue ruptor, posteriormente usando dicho tejido, se añadió el buffer RLT Plus (usando 600 μ L en caso de 10 a 30mg,) y se homogeneizó durante 20-40 segundos. Transferimos el lisado homogeneizado en la columna AllPrep DNA en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó durante 30 segundos a máxima velocidad (20,000xg)

Se colocó la columna en un nuevo tubo a temperatura ambiente ó almacenar a 4°C, para posterior purificación de DNA.

Purificación de ADN genómico. Se agregaron 350 μ L AW1 buffer a la columna y centrifugó por 15 segundos a a velocidad máxima (20,000xg). Posteriormente se descartó el flujo de trabajo. Se añadió 20 μ L de proteinasa k con 60 μ L de Buffer AW1 (volumen total de 80 μ L) y se agregó dicha mezcla a la columna.

Se realizó incubación por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 350 μ L AW1 buffer a la columna y centrifugó por 15 segundos a máxima velocidad (20,000xg). Se descartó el flujo de trabajo, se adicionó 500 μ L buffer AW2 a la columna y se centrifugó por 2 minutos a máxima velocidad (20,000xg).

Posteriormente, se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 1.5 mL. Se añadieron 100 μ L de buffer EB directamente a la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto para eluir el DNA.

5.3.4. Control de calidad de muestras previo a detección del VPH

5.3.4.1. Alícuotas de muestras de células cervicales

La muestra de citología líquida se homogenizó en vortex por aproximadamente 30 segundos, posteriormente se retiró el cepillo recolector de células con pinzas previamente limpiadas con alcohol y se dividió en alícuotas de 1mL. Las alícuotas fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso. De una de las alícuotas se extrajo el ADN y éste se guardó a -20 °C hasta su uso.

5.3.4.2. Control de calidad del ADN y de los productos de PCR

- a) Cuantificación: se tomó una alícuota de 1 μ L de cada ADN y se midió la absorbancia (260 nm) en el equipo Nanodrop.

- b) Determinación de pureza: se tomó 1 μ L de la muestra y se evaluó su pureza con los cocientes de absorptividad 260/280 y 260/230 nm. El criterio de aceptación para el cociente 260/280 fue de 1.8-2.0 y para el cociente 260/230 fue de 2.0-2.2.
- c) Control de calidad del ADN por medio de PCR: para comprobar que el ADN extraído fuese amplificable por PCR, se emplearon iniciadores que generaban un amplicón de 238 pb, correspondientes a un fragmento del gen β -globina humano. Los productos se observaron en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio.

5.3.5. Detección de VPH por medio de PCR de punto final

La detección del VPH en el ADN de las muestras se realizó con los iniciadores consenso PGMYS 09/11 (PGMY 09 [5'- CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC -3'] PGMY 11 [5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3']), cuyo producto de amplificación, de aproximadamente 450 pb, corresponde a una región parcial del gen L1 del VPH. Esta región del VPH se amplificó a la par con un control interno de amplificación (gen endógeno), empleando los cebadores de una región del gen humano β -globina (Fwd 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC -3', Rv 5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC -3'), bajo las siguientes condiciones de reacción (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar la región L1 del VPH empleando los iniciadores consenso PGMY 09/11 y β -globina.

Reactivos (Concentración inicial)	Concentración final	Volumen final (μ L)
Taq Gold Master Mix 2X	1 X	15
PGMY 09 50 mM	1 mM	0.6
PGMY 11 50 mM	1 mM	0.6
β G1 10 mM	.1 mM	0.3
β G2 10 mM	.1 mM	0.3
ADN	400 ng	--
Agua	--	--
Vol. Final	--	30

Tabla 3. Programa para amplificar la región L1 del VPH.

Pasos	Temperatura	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	95° C	12 min
2. Desnaturalización	95° C	1 min
3. Alineamiento	55° C	1 min
4. Extensión	72° C	1 min
5. Se repite desde paso 2 40 veces		

Extensión final	72° C	5 min
-----------------	-------	-------

Los productos amplificados de PCR fueron observados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

5.3.6. Genotipificación y determinación de carga viral del VPH por qPCR

Para la genotipificación de los tipos de VPH-AR de las muestras se utilizó el estuche Amplisens® HPV HCR Genotype titre de la marca Ecoli.

5.3.6.1. Preparación de reacciones de qPCR

El volumen de reacción final fue de 25 μ L, el volumen de muestra de ADN y agua máximo fue de 10 μ L. La concentración de ADN utilizada fue de 30 a 800 ng.

Se preparó la mezcla de los reactivos PCR-buffer-B y la polimerasa (TaqF). Para esto se añadió el total del volumen de la polimerasa TaqF (60 μ L) en el tubo con PCR-buffer-B (600 μ L). Cuidadosamente se mezcló por vórtex, evitando la formación de burbujas.

Para cada reacción se utilizaron 10 μ L de PCR-mix-FL HPV y 5 μ L de la mezcla de PCR-buffer-B y polimerasa TaqF. Para llevar a cabo las reacciones que incluyen las muestras y los controles (controles negativos y dos estándares con número exacto de copias de cada tipo de VPH) se mezclaron en un tubo nuevo estéril. Se añadieron 15 μ L de la mezcla preparada a cada uno de los tubos. El análisis de cada muestra se llevó a cabo en 4 reacciones con diferentes

mezclas. Se colocaron las mezclas de cada mix como se muestra en la Figura 5.

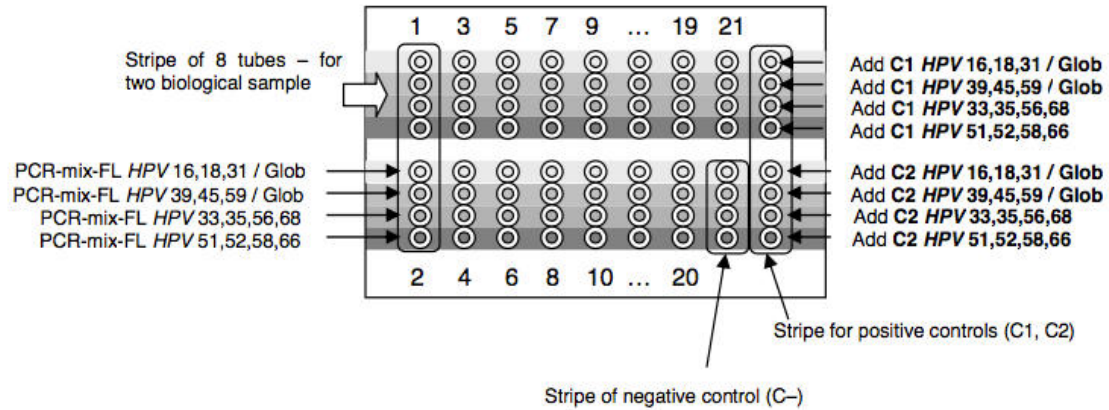


Figura 5. Distribución de muestras para qPCR. Se muestra la forma en como se distribuyeron las muestras en las tiras de 8 pocillos para realizar los ensayos de qPCR para identificación de VPH-AR y sus cargas virales. C1 corresponden a los calibradores 1 de los distintos tipos de VPH de cada reacción, mientras que los C2 corresponden a los calibradores 2 de los distintos tipos de VPH de cada reacción. Estos calibradores tienen un número de copias de cada uno de los 14 tipos de VPH y de controles internos de β -globina para poder realizar la cuantificación de la carga viral por 100,000 células.

Se añadieron 15 μ L de la mezcla preparada “16, 18, 31 / Glob” en el 1er tubo de cada tira. Se añadieron 15 μ L del mix “39, 45, 59 / Glob” en el segundo tubo. Se añadieron 15 μ L del mix “33, 35, 56, 68” en el tercer tubo. Se añadieron 15 μ L del mix “51, 52, 58, 66” en el cuarto tubo.

Se añadieron 10 μ de muestra de ADN en cada uno de los 4 tubos con mezclas diferentes.

5.3.6.2. Muestras control para carga viral del VPH (calibradores)

Para el análisis cuantitativo del VPH se prepararon los calibradores y se añadieron los controles negativos. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 4. La señal de fluorescencia se detectó en los canales FAM, JOE, ROX y CY5.

Tabla 4. Condiciones de temperatura y ciclos para la realización de la qPCR.

Condiciones para la qPCR		
Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	95	15 min
5	95	5 s
	60	20 s
	72	15 s
40	95	5 s
	60	30 s *
	72	15 s

*Adquisición de fluorescencia.

5.3.6.3. Análisis de datos de qPCR

El análisis de los resultados se realizó por el programa 7500 de Applied Biosystems usado para medir la señal de fluorescencia acumulada en los 4 canales (Tabla 5).

1. La señal de la amplificación del producto de amplificación del ADN de los genotipos de VPH 16, 39, 33, 58 fue detectada en el canal para el fluoróforo FAM.

2. La señal de la amplificación del producto de amplificación del ADN de los genotipos de VPH 31, 45, 35, 52 fue detectada en el canal para el fluoróforo JOE.
3. La señal de la amplificación del producto de amplificación del ADN de los genotipos de VPH 18, 59, 68, 66 fue detectada en el canal para el fluoróforo ROX.
4. La señal de la amplificación del producto de amplificación del ADN de los genotipos de VPH 56, 51, y de los 2 controles internos de β -globina fue detectada en el canal para el fluoróforo Cy5.

Tabla 5. Matriz de comparación de los canales para detectar los fluoróforos y los tipos de VPH y controles internos (CI).

	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4
FAM		JOE	ROX	Cy5
16		31	18	CI
39		45	59	CI
33		35	68	56
58		52	66	51

Los resultados se interpretaron por el cruce (o no cruce) de la curva de fluorescencia con el umbral fijado a un nivel específico que correspondió a la presencia (o ausencia) de un valor de Ct de la muestra de ADN en la correspondiente columna de la cuadrícula en el software del equipo.

La curva de calibración se graficó automáticamente de acuerdo a la base del threshold y los valores de Ct obtenidos de los calibradores con concentraciones conocidas. El número de copias de ADN humano y de cada uno de los tipos de VPH detectados se calculó. Los valores obtenidos se utilizaron para el cálculo de la cantidad de ADN de VPH por cada 100,000 células humanas.

Los resultados de los cálculos y el análisis se realizaron utilizando el software AmpliSens® HPV HCR genotype titre en el formato Excel de Microsoft®.

La interpretación de los resultados en log10 (número de copias por cada 100,000 células humanas) se llevó a cabo de acuerdo con los parámetros establecidos para el estuche (Tabla 6).

Tabla 6. Interpretación de los resultados obtenidos con el estuche Amplisens® HPV HCR Genotype titre.

Resultado log10	Interpretación clínica
<3	Significado clínico bajo
3-5	Clínicamente importante. La displasia no se excluye, riesgo de displasia.
>5	Clínicamente importante. Displasia sugestiva.

5.3.7. Genotipificación y filogenia por secuenciación Sanger.

Para realizar la confirmación del genotipo viral del VPH en muestras mono-infectadas (con un solo tipo de VPH) se empleó el método de Sanger para secuenciar los productos de PCR obtenidos por los cebadores PGMY 09/11. Los productos de PCR se purificaron por centrifugación con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante que se describen a continuación.

Para disolver la porción del gel. Posterior a electroforesis, se retiró la banda de DNA del gel y del lugar, removiendo a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Se agregó 10 µL a la membrana de unión con solución por cada 10 mg de porción de gel. Se agitó al vortex y se incubó por 50-65°C hasta que la porción gel termine totalmente disuelta.

Amplificación por pcr. Se agregó un igual volumen con solución de membrana de unión a la amplificación de PCR.

Unión del ADN. Se colocó la minicolumna SV en el tubo colector. Posteriormente se transfirió la disolución del gel de PCR producido por la unión con minicolumna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó a 16,000g por 1 minuto, se descartó el volúmen y se reintrodujo la columna en el tubo colector

Lavado. Se agregaron 700 µL de solución de lavado de membrana. Se centrifugó a 16,000g por 1 minuto y se descartó el flujo de trabajo, reinsertando

la minicolumna en un tubo colector. Se adicionaron 500 μL de solución de lavado de membrana.

Se centrifugó a 16,000g por 1 minuto. Se descartó el flujo de trabajo y se reinsertó la minicolumna en un tubo colector. Se vació el tubo colector y se centrifugó la columna por 1 minuto hasta evaporación del etanol residual.

La elución del ADN de la columna se realizó en un volumen total de 50 μL , centrifugando a 16,000g por 1 minuto.

Después de este proceso de purificación se cuantificó y diluyó el producto a una concentración de 3-10 ng. La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando 8 μL de BigDye Terminator v3.1, 8 μL de agua y 2 μL de producto diluido. Se dividió en 2 alícuotas y a cada una se le añadió 1 μL del cebador correspondiente (a una PGMY09 y a la otra PGMY11). La PCR de secuenciación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización: 96 °C por 1 minuto. Alineamiento: 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos y 60 °C por 4 minutos. Terminación: 4 °C hasta la siguiente purificación.

Los productos fueron purificados con Big Dye XTerminator, este reactivo está diseñado para eliminar los componentes del ciclo de secuenciación como sales, nucleótidos fluoróforos no incorporados y los dNTPs para prevenir su coinyección al equipo con los productos marcados con fluoróforos. El reactivo se añadió directamente a la reacción de secuenciación y se agitó en vórtex. Durante la agitación, los reactivos del BigDye XTerminator capturan e inmovilizan los componentes no deseados. Después de la agitación mecánica, la

reacción se centrifugó para mover la fracción insoluble de la mezcla de reacción.

El BigDyeXterminator Purification Kit consta de dos reactivos:

- . XTerminator Solution: El cual captura los terminadores marcados y sales libres posteriores a la reacción del ciclo de secuenciación.
- . SAM Solution: La cual mejora el rendimiento del reactivo de BigDye XTerminator y estabiliza la muestra después de la purificación. La purificación con el BigDye XTerminator se llevó a cabo añadiendo a cada reacción posterior al ciclo de secuenciación 45 μ L de la solución SAM, procurando agitarla a máxima velocidad previamente y sin permitir una sedimentación mayor a 2 minutos. Posteriormente se añadió la solución XTerminator agitando previamente por agitación mecánica por 10 segundos hasta homogenizar. Se agregaron 10 μ L de esta solución a cada reacción. Para su lectura en el analizador genético, se cubrieron las reacciones con MicroAmp Clear Adhesive Films. Posteriormente se agitaron al vórtex por 30 minutos a máxima velocidad y finalmente se centrifugaron. Para posteriormente ser secuenciados en el Genetic Analyzer 3500.

Se obtuvieron 2 secuencias, la cadena positiva (PGMY 11 Fwd cebador) y la cadena negativa (PGMY 09 Rv cebador), las cuales fueron ensambladas con el programa SeqScape® v3 utilizando los genomas de referencia: VPH16: K02718; VPH18: X05015; VPH52: X74481; VPH51: M62877; VPH31: J04353; VPH53: NC_001593; VPH56: X74483; VPH66: U31794; VPH59: X77858; VPH45:

X74479; VPH68: DQ080079; VPH39: M62849; VPH44: U31788; VPH11: M14119; VPH6: X00203; VPH81: AJ620209; VPH72: X94164; VPH69: AB027020; VPH82: AB027021; VPH70: U21941; VPH84: AF293960; VPH71: AB040456. Posteriormente fueron analizados con la herramienta BLAST de la plataforma NCBI para alinear las secuencias con las ya reportadas en dicha plataforma. De esta forma se diferenciaron los genotipos y se clasificó el tipo viral de acuerdo a la homología.

Las secuencias que fueron obtenidas, más las secuencias reportadas en GenBank, fueron utilizadas para hacer un alineamiento múltiple en el programa MEGA v7 (Arizona State University, Tempe, AZ, EUA). Para el alineamiento se utilizó el algoritmo MUSCLE por su rapidez y precisión. Se incluyeron las secuencias de referencia utilizadas para el ensamble. Se incluyó una secuencia de referencia de Papillomavirus del mono Rhesus para darle dirección al árbol. La reconstrucción de la filogenia se realizó por el método de máxima similitud. Se utilizó el modelo GTR con una distribución gama de cuatro categorías y un soporte de 1000 réplicas.

5.3.8. Determinación de sitios de integración viral en el genoma celular

Para la determinación de los sitios de integración, se optó por un servicio de secuenciación en China con resultados comprobados [75]. Solo los registros de alta significancia fueron usados. Brevemente, se utilizaron sondas complementarias para la detección de 17 tipos de VPH (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69 y 82). Las librerías se construyeron siguiendo las instrucciones del fabricante Illumina. El ADN se fragmentó utilizando un

ultrasonicador Covaris, para obtener fragmentos de 150-200 pb. Los fragmentos se purificaron, se le dejaron con los extremos romos, se les añadieron colas de Adeninas, y se ligaron los adaptadores. Las librerías se cuantificaron con el equipo Bioanalyzer.

El proceso de hibridación de las sondas de VPH se llevó a cabo siguiendo el protocolo de MyGenostics GenCap Target Enrichment (MyGenostics, USA). Las librerías se hibridaron con las sondas de VPH de los 17 tipos de VPH a 65 °C por 24 horas, se lavaron para remover los fragmentos no capturados. Los fragmentos eluidos se amplificaron con 18 ciclos de PCR para formar las librerías para la secuenciación. Las librerías se cuantificaron y se procedió a la secuenciación, utilizando el equipo HiSeq 2000 de Illumina.

Para el análisis de las secuencias, las lecturas de baja calidad, las lecturas duplicadas y las lecturas contaminadas de los adaptadores, fueron removidas para obtener las lecturas “limpias” para los análisis.

Las lecturas fueron mapeadas a los genomas de VPH y al genoma humano. Las lecturas que se alinearon únicamente con secuencias del VPH se descartaron, lo mismo se hizo con las secuencias que alinearon solo con el genoma humano. Las lecturas que parcialmente alineaban con los genomas del VPH previamente mencionados y el genoma humano se utilizaron para reconstruir las secuencias fragmentadas y localizar los puntos de ruptura exactos, tanto en el genoma viral como el del genoma humano.

5.3.9. Detección de variantes en las secuencias virales por secuenciación de nueva generación (NGS)

Los datos obtenidos por NGS se procesaron utilizando el algoritmo BWA-Mem en la plataforma Galaxy. Se filtraron las secuencias híbridas de acuerdo al CIGAR obtenido, se seleccionaron aquellas con un número de bases alineadas al VPH mayor a 20 y donde los espacios vacíos (soft clipping) fueron mayor a 20. Las lecturas fueron alineadas a los genomas de VPH de referencia (HPV6: FR751337.1, HPV82: AF293961.1, HPV69: AB027020.1, HPV68: FR751039.1, HPV66: EF177191.1, HPV59: EU918767.1, HPV58: HQ537777.1, HPV56: EF177181.1, HPV52: HQ537751.1, HPV45: EF202167.1, HPV39: M62849.1, HPV35: HQ537730.1, HPV33: HQ537688.1, HPV31: HQ537687.1, HPV18: AY262282.1, HPV16: NC_001526.2, HPV11: HE574705.1), y al genoma humano (NCBI build 37, hg19). Las lecturas que se alinearon completamente y se ensamblaron a los genomas de los VPH reportados.

De acuerdo al resultado obtenido de los archivos bam, las variantes fueron analizadas con el SVdetect para obtener la región inicial del sitio de integración. Los sitios de integración se analizaron con el programa CREST. Se detectaron y clasificaron las variantes encontradas en las secuencias analizadas.

5.3.10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se realizaron pruebas paramétricas y no paramétricas para cada tipo de variable obtenida del proyecto. Para encontrar la posible asociación de los grupos de clasificación del resultado del Papanicolaou

(Normal, ASCUS, LIEAG y LIEBG) con a) Los tipos de VPH (14 tipos de VPH de alto riesgo) b) infección múltiple de VPH y c) Carga viral (alta o baja), se realizaron tablas de contingencia.

Para comparar el resultado del Papanicolaou: Normal, ASCUS, LIEBG y LIEAG, con la carga viral (transformada en log 10) para cada tipo de VPH (14 tipos de VPH-AR), se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. Se utilizó el programa estadístico SPSS.

Para el análisis de componentes principales (PCA) y los mapas de calor, se usó el paquete estadístico R. El PCA se realizó con la matriz de carga viral (en log 10) por tipos en todos los pacientes usando colores y símbolos para cada grupo de pacientes. El orden de renglones en el mapa de calor se determinó usando un agrupamiento jerárquico con aglomeración "Ward" y distancia euclidiana.

VI. RESULTADOS.

6.1. Descripción de muestras

Se recolectaron 294 muestras de células cervicales en la consulta de Colposcopia del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Se logró detectar el VPH en 178 muestras (60.5%) con el método de PCR punto final, utilizando los iniciadores PGMY 09/11. Además, se recolectaron los datos ginecológicos como paridad, el estado de menopausia, tratamiento recibido, entre otros (Tablas 7 y 8). Se identificó al VPH en 48 muestras (16.3%) con reporte de citología normal, en 10 casos con ASCUS (3.4%), 57 con LIEBG (19.38%), 47 con LIEAG (15.98%) y en 3 de CaCU (1.02%). El grupo más predominante en nuestro estudio fue el de LIEBG, como se muestra en la tabla 10. Otros datos ginecológicos importantes fueron el inicio de vida sexual activa (IVSA) antes de los 18 años, donde hubo una diferencia significativa ($p=0.019$) entre el grupo de pacientes VPH positivas vs las pacientes VPH negativas. Al analizar el número de parejas sexuales, no encontramos diferencia estadísticamente significativa.

6.2. Genotipificación del VPH

En la tabla 9 se muestran los resultados de los tipos de VPH más predominantes entre los grupos de acuerdo con el resultado del Papanicolaou. El VPH encontrado con mayor frecuencia en las 178 muestras positivas fue el VPH 16 (33.7%), seguido del 18 (45 casos 25.3%) y 39 (40 casos 22.5%) (Figura 6).

Además, al clasificar las muestras de acuerdo al resultado de su Papanicolaou, encontramos que en las muestras citológicas con resultado aparentemente normal, el VPH más predominante fue el VPH 52, seguido del 18 y 16 (Tabla 9); en LIEBG los VPH más prevalentes fueron 18, 52 y 16, mientras que en LIEAG los más prevalentes fueron 16, 39 y 18. Podemos observar que sin importar el grado de lesión, los VPH 16 y 18 son los más predominantes.

Identificamos que 105 muestras (59%) tenían una infección múltiple de VPH, es decir, más de un tipo de VPH en la misma muestra. Como se muestra en la tabla 10, el grupo de LIEAG tuvo un alto porcentaje de infecciones múltiples (62.5%), en las LIEBG fue de 55.40% y en las citologías normales de 62.1%. Realizamos un análisis de Chi cuadrada para encontrar asociación entre los VPH-AR más predominantes y las coinfecciones, encontramos que los VPH-AR que mostraron mayor asociación fueron los VPH 16, 18 y 39. Las infecciones múltiples más comunes encontradas fueron con los VPH 16, 18 y 18, 51.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre los VPH 16, 18, 31, 39, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 con infecciones múltiples, es decir, que estos se encontraron coinfectando con otro tipo de VPH en la misma muestra, los VPH 16, 18, 39 y 59 tuvieron la mayor diferencia significativa (Tabla 11). Las infecciones múltiples más frecuentes fueron VPH 16, 18; VPH 18, 51; y VPH 18, 52, respectivamente (Tabla 12). Además, analizamos si el tipo de VPH estaba asociado a infección múltiple en cada uno de los grupos analizados. Encontramos que en las LIEBG y LIEAG el VPH 16 se encontró asociado a infección múltiple ($p=0.037$ y $p=0.01$ respectivamente).

Tabla 7. Características de la población.

Características de la población		
n= 294	VPH + n=178	VPH - n= 116
Edad	35 (± 12)	37 (± 12)
Lugar de origen	Noreste 93%	89%
Ocupación	Hogar 47%	60%
Estado civil	Casada 43%	44%
Escolaridad	46%	36%
AHF cáncer	43%	36%
Comorbilidad	14%	16%
Alcohol	30%	27%
Tabaco	34%	27%
IMC	39% Normal	25%

Tabla 8. Características gineco-obstétricas de la población analizada.

Antecedentes gineco-obstétricos		
Característica	VPH +	VPH -
Menarquia	13 (± 1.6)	13 (± 1.6)
IVSA (<18 años)	64%	56%
<i>p=0.019</i>		
Contactos sexuales (+1)	77%	62%

Anticonceptivos de barrera	33%	20%
ETS	54%	33%
Vacuna VPH	3%	1%
Años en realizar el 1er pap.	6 años	6 años

Tabla 9. Prevalencia de VPH y su asociación con infecciones múltiples en pacientes agrupadas por Papanicolaou en la primera consulta

Todos los VPH detectados			Infección múltiple	
Tipo de VPH	# casos	%	# casos	<i>p</i>
16	60	33.7	47	<0.0001
18	45	25.3	38	<0.0001
39	40	22.5	34	<0.0001
52	39	21.9	32	0.001
51	33	18.5	26	0.011
Normal				
Tipo de VPH	# casos	%	# casos	<i>p</i>
52	18	31	16	0.009
18	17	29.3	16	0.002
16	16	27.6	15	0.005
39	14	24.1	12	0.062
51	13	22.4	10	0.338
LIEBG				
Tipo de VPH	# casos	%	# casos	<i>p</i>
18	15	26.8	12	0.034
52	13	23.2	9	0.345
16	12	21.4	11	0.007
51	12	21.4	9	0.191
39	11	19.6	9	0.88
58	11	19.6	8	0.312
LIEAG				
Tipo de VPH	# casos	%	# casos	<i>p</i>
16	23	47.9	17	0.145
39	12	25	10	0.167
18	11	22.9	9	0.171
31	11	22.9	9	0.171
56	9	18.8	9	0.018

Tabla 10. Resultado del Papanicolaou en pacientes con infecciones múltiples por VPH

Resultado del Papanicolaou	Total de casos por grupo	Total de casos de infecciones múltiples de VPH		<i>p</i>
		Número de casos	% de casos	
Normal	48	36	75.0	0.2431
ASCUS	10	0	0.0	0.0147
LIEBG	57	31	54.3	0.7598
LIEAG	47	30	63.8	0.7968
CC	3	1	33.3	1.0000
No disponible	13	-	-	
Total	178	105	59.0	

Tabla 11. Tipos de VPH asociados a infección múltiple de VPH.

Infección múltiple (coinfecciones)			
VPH	# casos totales	# casos con infección múltiple	<i>p</i>
16	60	47	<0.001
18	45	38	<0.001
31	27	22	0.011
33	5	5	0.079
35	12	9	0.364
39	40	34	<0.001
45	11	8	0.529
51	33	26	0.01
52	39	32	0.001
56	27	22	0.011
58	26	19	0.134
59	27	25	<0.001
66	11	5	0.362
68	15	13	0.027

Tabla 12. Tipos de VPH-AR más frecuentemente encontrados en infecciones múltiples en la primera consulta.

VPH-AR más frecuentes en infecciones múltiples	
Tipos de VPH	Casos
16, 18	15
18, 51	13
18, 52	12
39, 51	12
39, 52	12
Otros	41

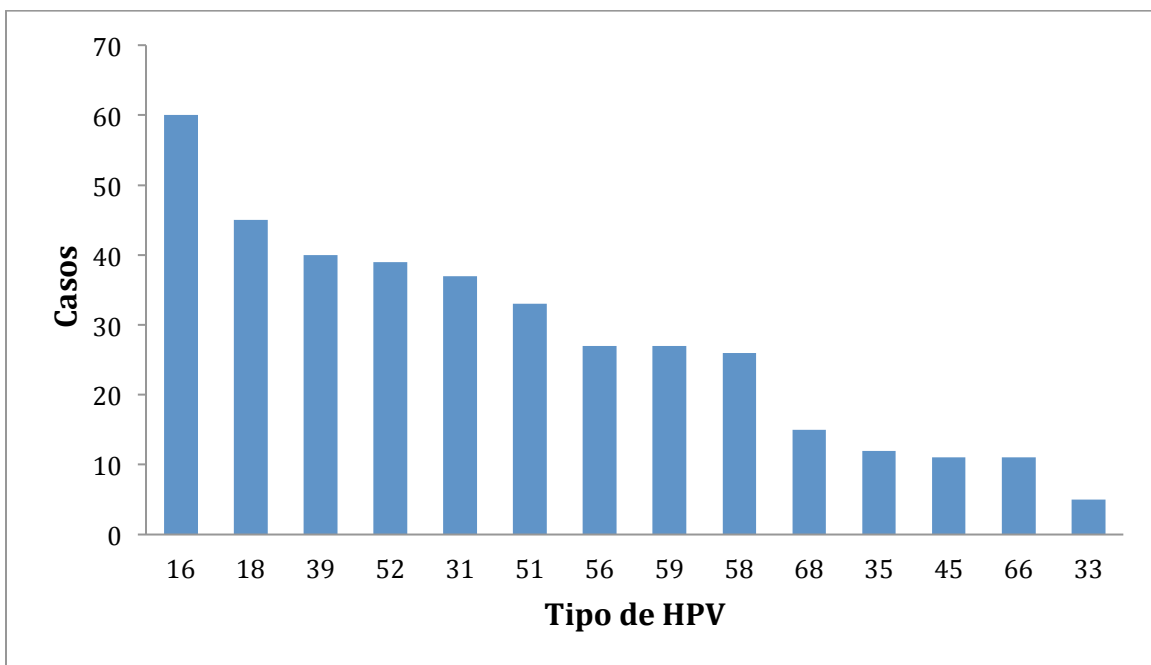


Figura 6. Frecuencia de los VPH detectados. Se muestran en la gráfica el número de casos de VPH identificados en la población analizada. En el eje de las X se encuentran los tipos de VPH acorde a la frecuencia con la que se encontraron. En el eje de las Y se encuentra el número de casos encontrados de cada tipo de VPH.

6.3. Carga viral del VPH

Además de la genotipificación de los VPH, calculamos la carga viral de cada uno de los 14 VPH-AR y las clasificamos en alta y baja carga viral. No encontramos ninguna diferencia significativa entre los grupos de estudio y la carga viral total de los VPH.

Encontramos una asociación de los VPH 18, 51 y 56 con cargas virales altas ($\log >3$) (Tabla 13). Además, comparamos cada una de las cargas virales promedio de cada VPH entre los grupos analizados. Sólo encontramos una diferencia significativa de la carga viral del VPH 16 en LIEBG en comparación con otros grupos (Figura 7). Identificamos que la carga viral del VPH 16 estaba incrementada en el grupo de LIEBG y que era menor en las LIEAG. No se encontró ninguna diferencia significativa entre la carga viral promedio de otros VPH-AR y el resultado del Papanicolaou (Figura 8).

El análisis de componente multivariable de las cargas virales de cada uno de los VPH detectados por el estuche, no mostró agrupamientos evidentes por las cargas virales y/o resultado del Papanicolaou.

Comparamos cada una de las cargas virales de cada tipo de VPH y encontramos diferencias significativas entre los rangos promedio de los VPH 18 y 31 ($p=0.02$) y VPH 56 ($p=0.004$). El VPH 18 se encontró mostró cargas virales más bajas.

Se realizó una prueba de U de Mann-Whitney para comprar todos los tipos de VPH de todas las muestras y se encontró una diferencia significativa de la carga viral de los VPH 16 y 18. Identificamos que la carga viral del VPH 16 era más

alta en comparación con el VPH 18 (log 2.18 vs log 3.43, copias por cada 10^5 células, $p=0.016$). Al comparar la medias de todas las muestras, el VPH 45 tuvo una carga viral promedio más alta que el VPH 16 ($p=0.008$) (log 4.37 vs 2.18), utilizando una prueba T para comparación de las medias. El VPH 56 también se encontró en cargas virales más altas que el VPH 16 ($p=0.04$) en todas las muestras, como se muestra en la figura 9.

Tabla 13. Tipos de VPH asociados a carga viral alta

Tipo de VPH	# de casos*	<i>p</i>
18	24/44	0.012
51	18/33	0.034
56	25/27	0.005

* Número de casos con carga viral alta

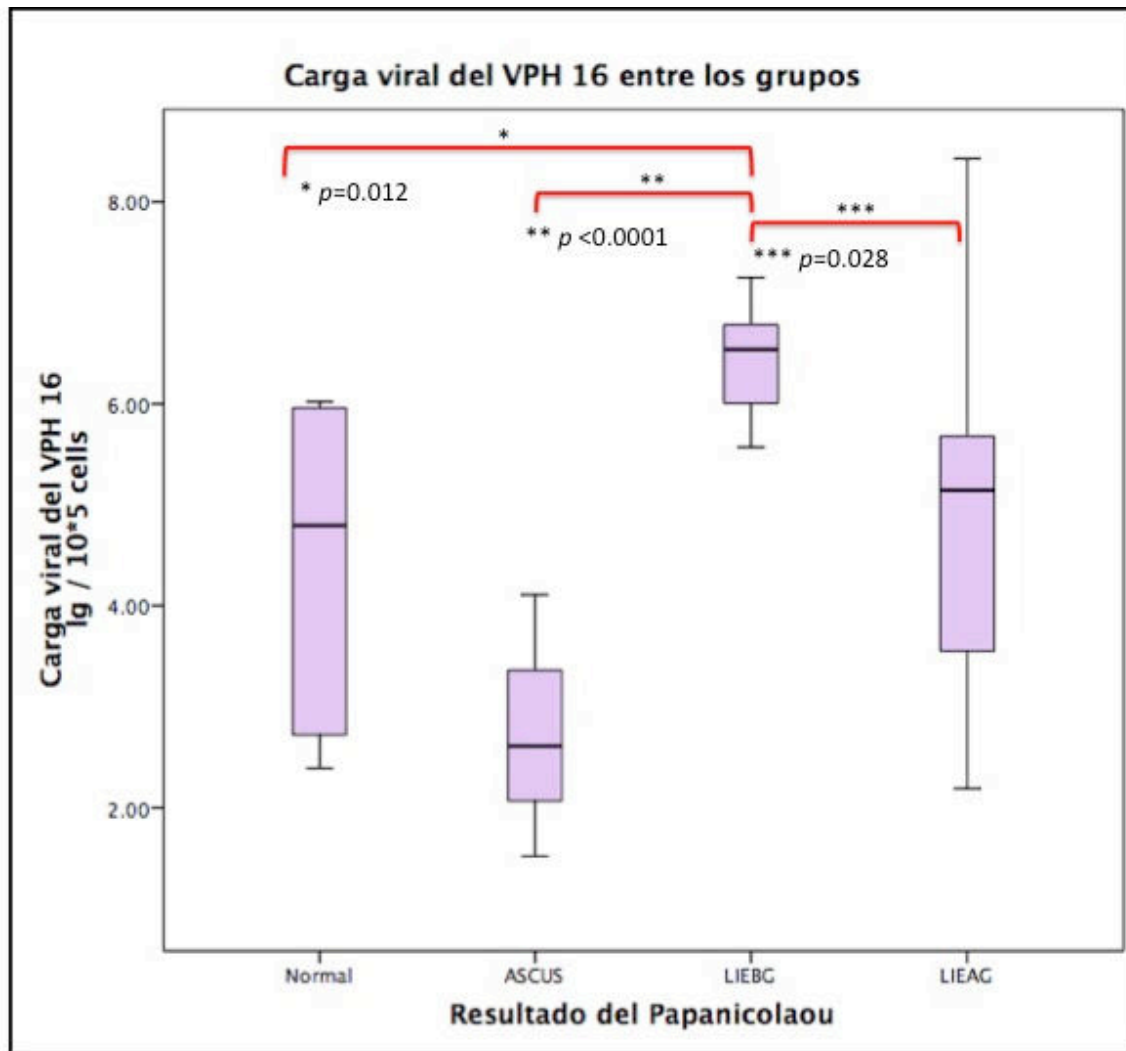


Figura 7. Carga viral promedio del VPH 16 entre los grupos analizados. Se muestran los grupos de acuerdo al resultado del Papanicolaou (Normal, ASCUS, LIEBG y LIEAG) y las diferencias significativas del grupo LIEBG con el resto de los grupos analizados.

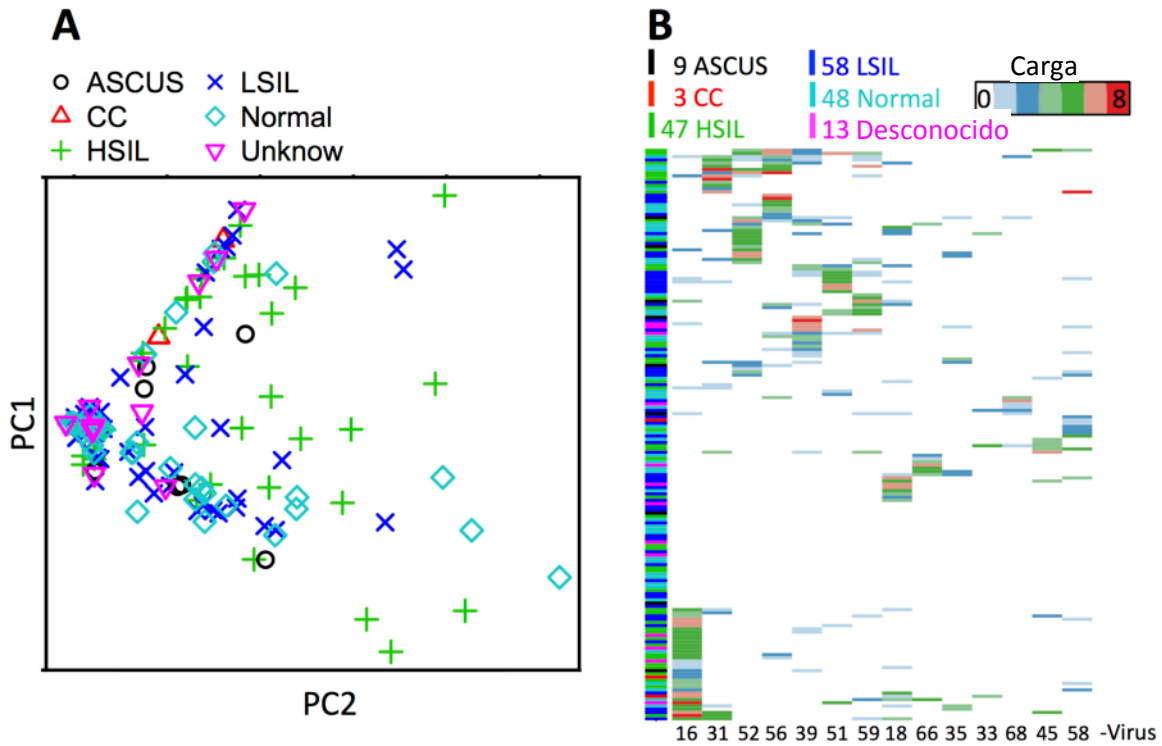


Figura 8. Promedio de cargas virales de los VPH-AR. A) Análisis de componentes principales. Se muestran los primeros 2 componentes que capturan la mayor variabilidad. B) Mapa de calor representativo de los datos de carga viral. Las pacientes se muestran en vertical mientras que el tipo de VPH en horizontal. La carga se muestra en código de color como se indica en "Load". Las filas y columnas se ordenaron por agrupamiento jerárquico usando la aglomeración de Ward.

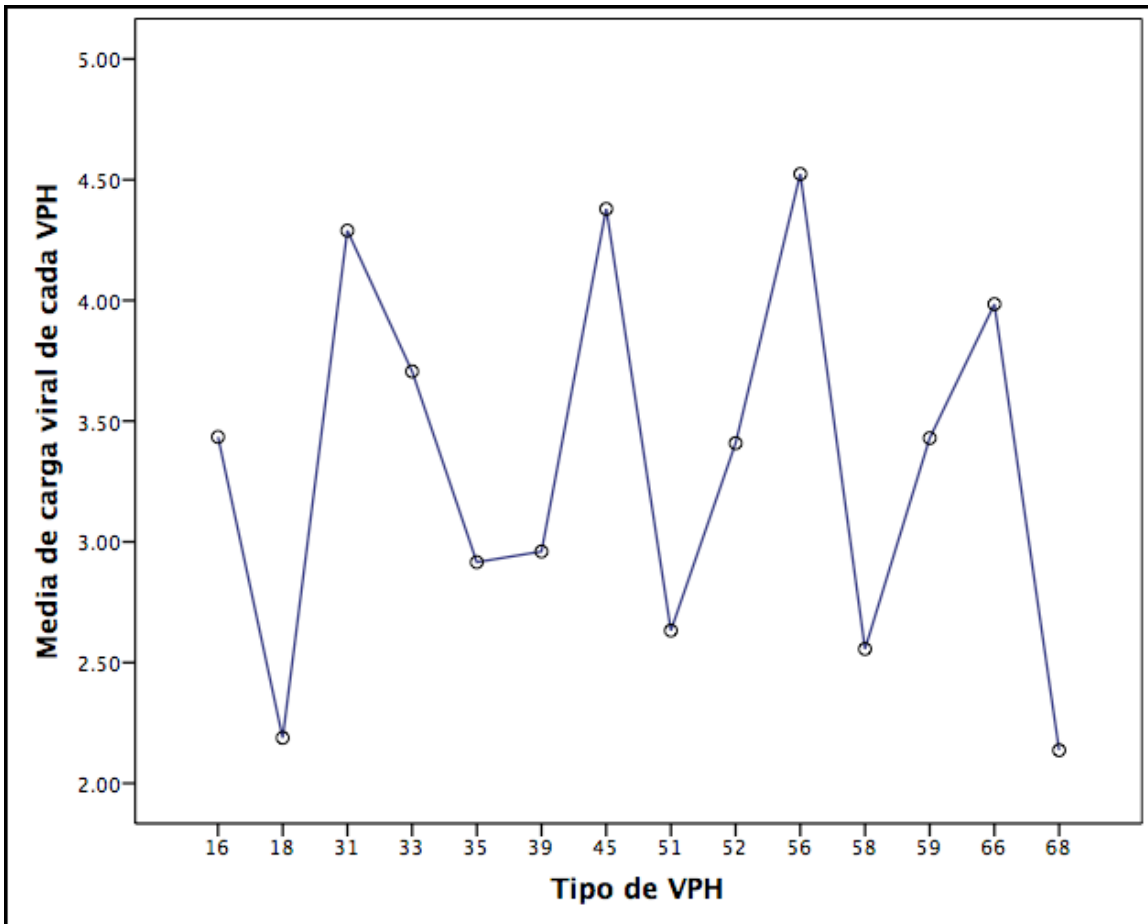


Figura 9. Media de las cargas virales de cada uno de los VPH presentes en la población analizada. Se muestran en el eje horizontal los tipos de VPH y en el eje vertical la media de la carga viral de cada tipo de VPH en log10.

6.4. Seguimiento a pacientes VPH positivas.

En este estudio se logró dar seguimiento a 81 pacientes en la consulta de Colposcopia, el cual fue de 6 meses a 1 año después de su primera consulta. A las pacientes de seguimiento se les tomó una segunda muestra de Papanicolaou en fase líquida. Se detectaron 31 muestras VPH positivas, es decir, con una infección persistente por este virus (34.56%). En 15 muestras (48.38%) identificamos más de un tipo de VPH (coinfeción), y el tipo de VPH más

frecuente encontrado fue el VPH 59 (42.9%), seguido del 56 (32.1%), 39 (28.6%), 52 (25%) y 16 (17.9%) (Figura 10). El 67.9% de las pacientes con persistencia tenían una carga viral alta. Solamente el VPH 39 se encontró asociado a una infección múltiple en las muestras de seguimiento ($p=0.009$).

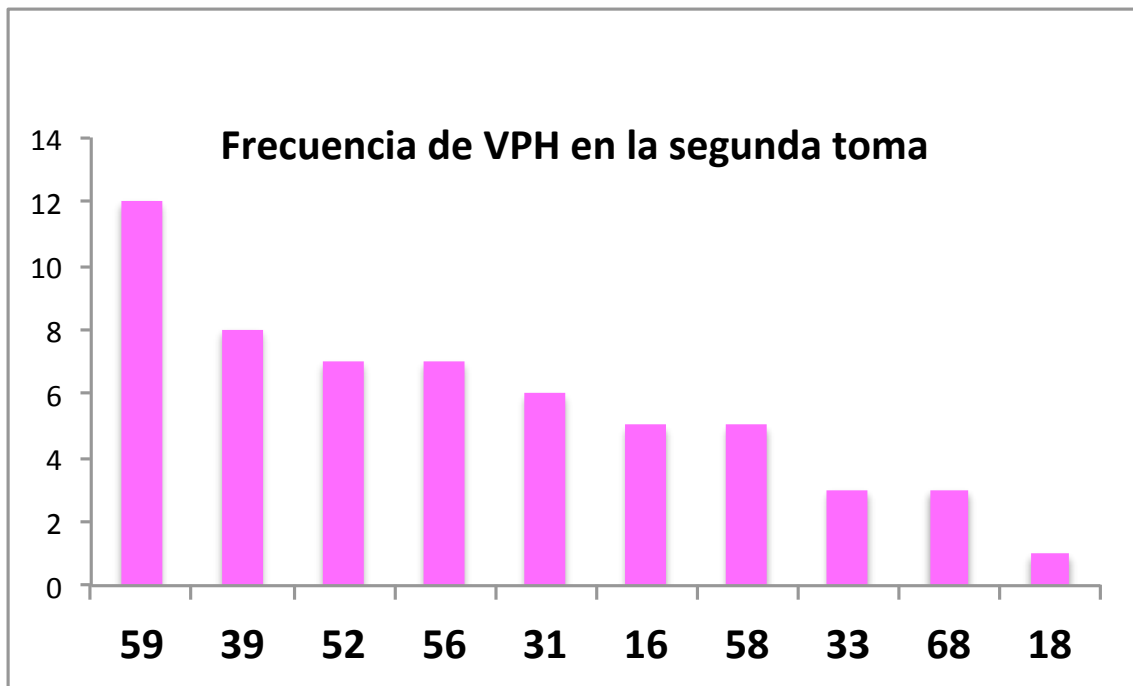


Figura 10. Frecuencia de VPH detectados en la segunda consulta. En el Eje de las X se muestra el tipo de VPH detectado, mientras que en el eje de las Y se encuentra el número de casos encontrados. Podemos observar que los VPH más frecuentes encontrados fueron 59, 39, 52 y 56.

6.5. Filogenia y Variantes del VPH

Se analizaron 34 muestras que tenían monoinfección de VPH-AR, se secuenció una región de 450 pb correspondiente al gen L1 del VPH. Los VPH encontrados fueron los siguientes: VPH31, VPH44, VPH11, VPH69, VPH82, VPH53, VPH56,

VPH59, VPH45, VPH68, VPH39, VPH70, VPH84, VPH81, VPH72 y VPH71. En la Figura 11 se observa como se agruparon las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia utilizadas. La mayoría de las muestras se agruparon con las secuencias de referencia con un soporte alto (>70%). Sin embargo, la muestra MK142 que corresponde a VPH 82 se agrupó con el VPH51. Esto puede deberse a que el modelo de sustitución no es el más adecuado para este tipo de VPH. Las secuencias obtenidas del VPH 18 se agruparon dentro del linaje A con un soporte de 62 (Figura 12). Sin embargo, las muestras no se agruparon con un sublinaje en particular y formaron su propio clado. Las cinco muestras obtenidas del VPH 52 se agruparon en el linaje A con un soporte de 77 (figura 13). Debido al tamaño corto del producto secuenciado, no se pudo discernir a cuál de los dos sublinajes pertenecen las muestras secuenciadas.

Las cuatro muestras de VPH16 se agruparon en el linaje A, específicamente en el sublinaje A4 (llamado anteriormente Asiático del Este). La separación entre linajes tuvo un soporte de 87 (Figura 14). Las tres secuencias de VPH 51 se agruparon en el linaje A, sublinaje A1 con un soporte de 88. Las dos secuencias identificadas para el VPH 6 no pudieron agruparse de manera confiable con alguno de los linajes y sublinajes. La muestra MK110 pareciera agruparse con el sublinaje B3 pero el soporte es bajo. Se confirmó que la muestra MK90 no pertenece al linaje B y que la muestra MK175 pertenece al linaje C del VPH31. La muestra MK07 pertenece al linaje A del VPH 11.

Estas secuencias nos permitieron agrupar las muestras en linajes y sublinajes, los resultados no fueron concluyentes ya que es necesario secuenciar el

genoma completo o una región más grande del genoma del VPH para confirmar el linaje o el sublinaje, como en el caso de las secuencias de VPH 18.

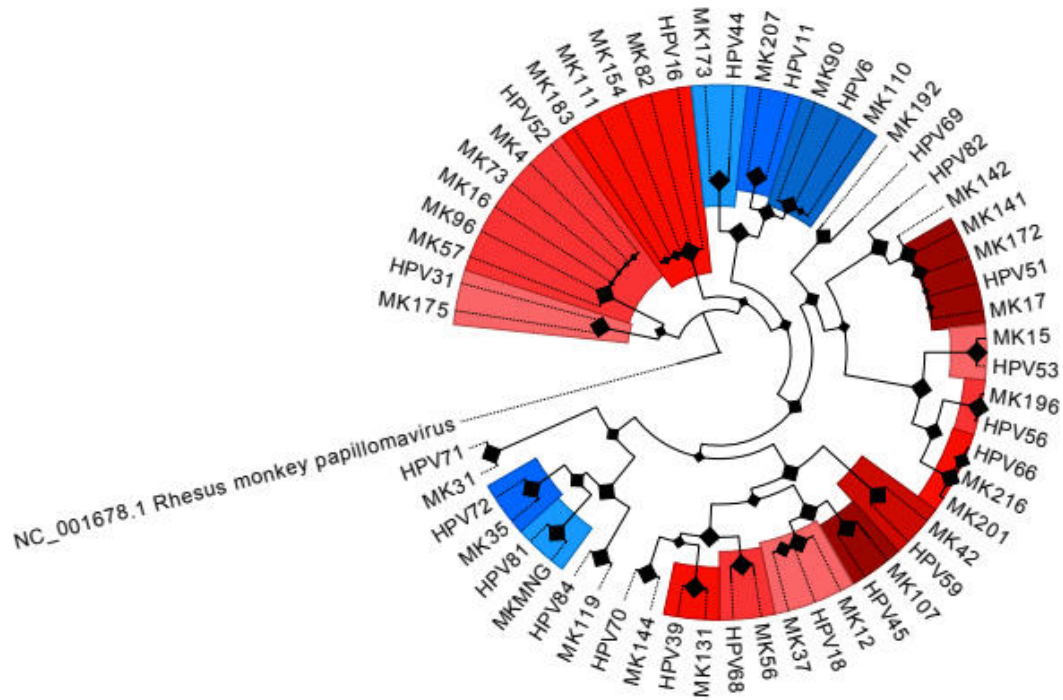


Figura 11. Árbol filogenético de las secuencias aisladas de los VPH. Se asignó el prefijo MK al número de identificación de las muestras de nuestra población y están marcadas con un cuadrado en color negro. Se observó cómo nuestras muestras se agrupan con las reportadas en las bases de datos Papillomavirus Episteme. La gama de color rojo señala a los VPH de alto riesgo, el color azul los VPH de bajo riesgo y el blanco señala riesgo desconocido. Los diamantes negros simbolizan el soporte con el que se agrupan las secuencias.

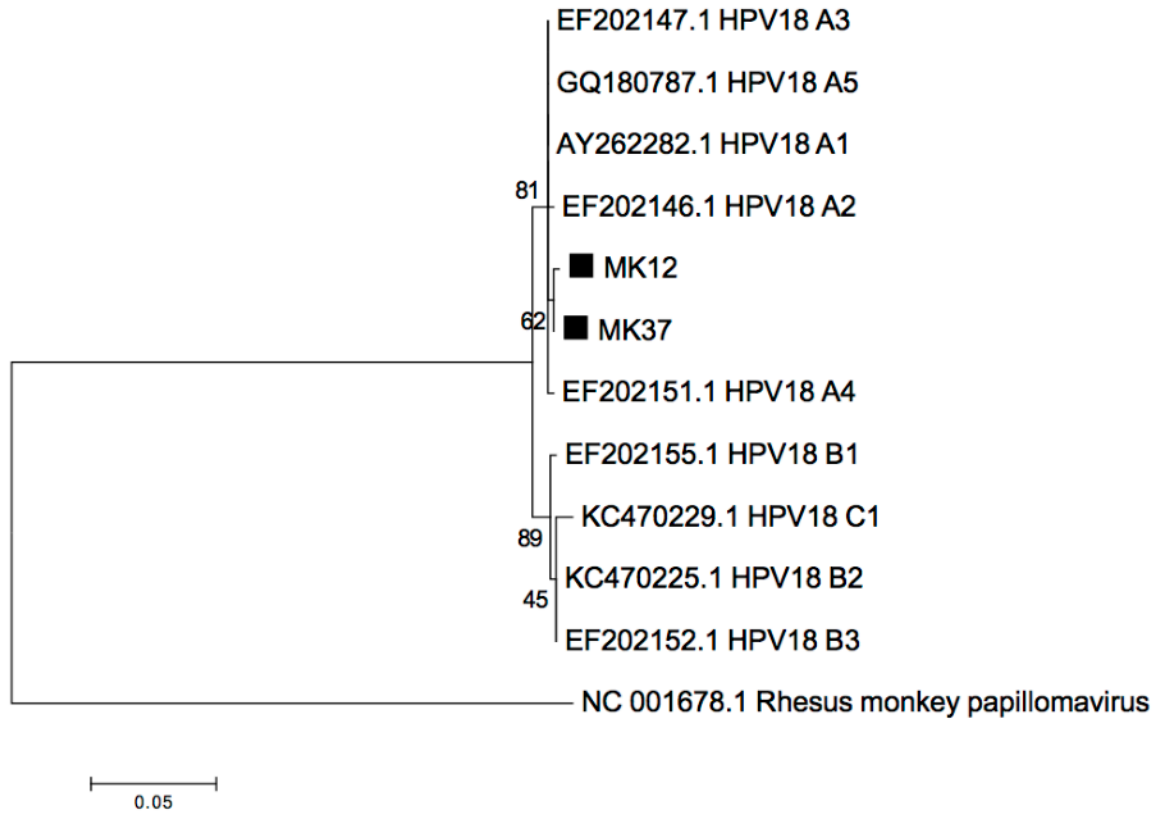


Figura 12. Subtipos encontrados del VPH 18. A las dos cepas de las muestras de nuestra población que se agrupan con el linaje A se les asignó el prefijo MK y están marcadas con un cuadrado en color negro. Ambas muestras tuvieron un soporte de 62.

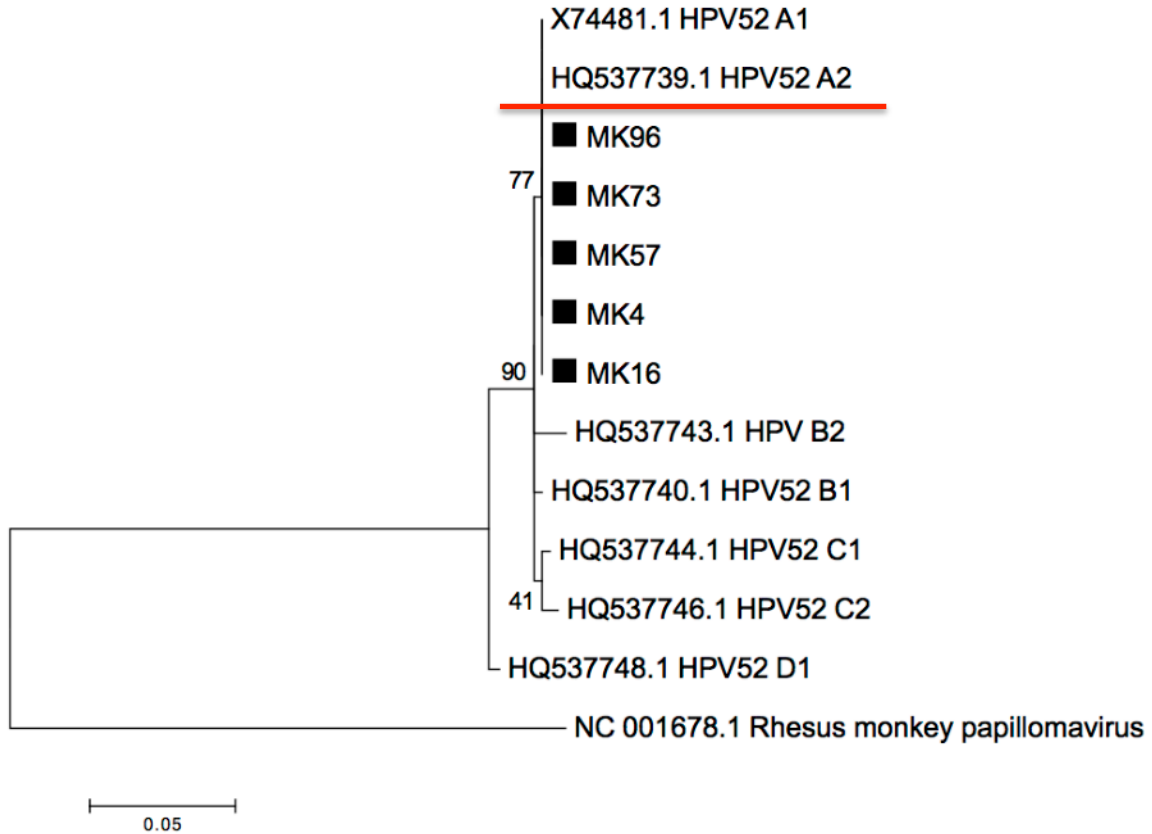


Figura 13. Subtipos del VPH 52 encontrados. Se asignó el prefijo MK al número de identificación de las muestras de nuestra población analizadas y están marcadas con un cuadrado en color negro. Se observó que las 5 cepas VPH 52 se agruparon con el linaje A con un soporte de 77, de acuerdo con las secuencias reportadas en la base de datos del Papillomavirus Episteme.

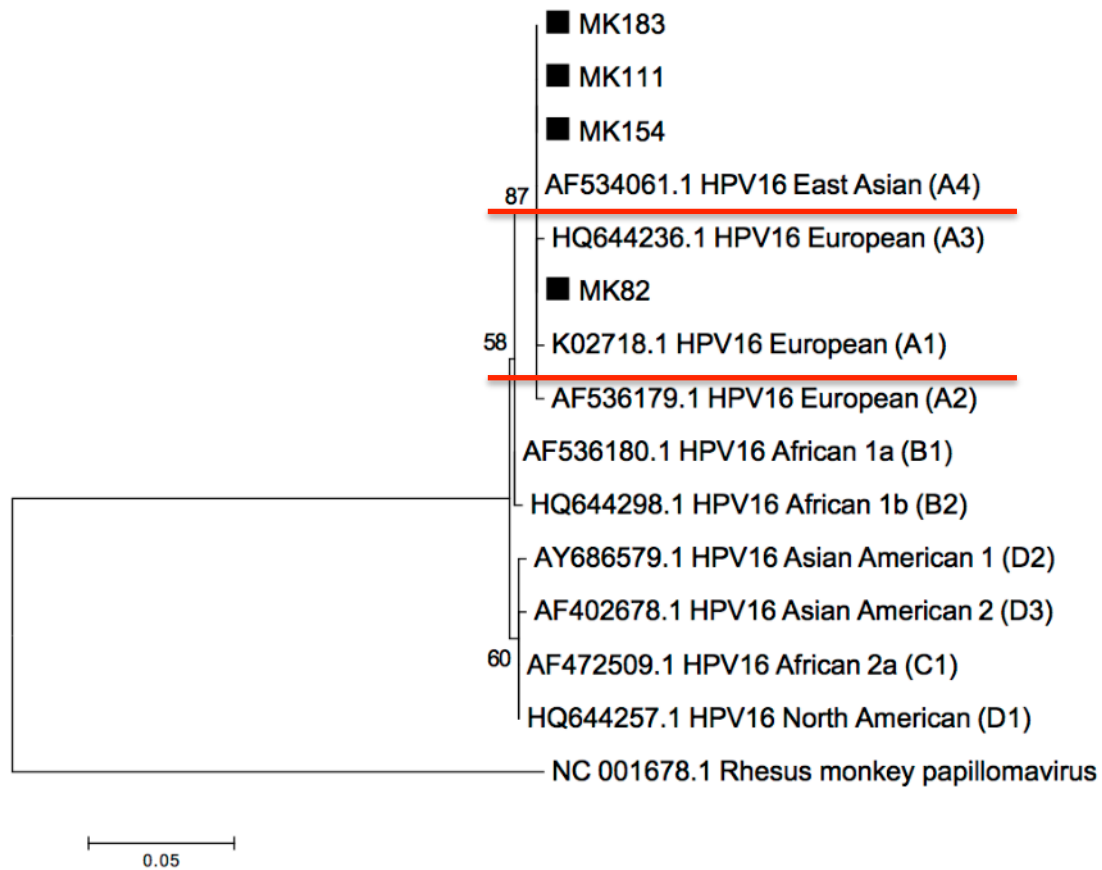


Figura 14. Subtipos del VPH 16 encontrados en nuestra población. Se asignó el prefijo MK al número de identificación de las muestras de nuestra población analizadas y están marcadas con un cuadrado en color negro. Se encontraron 4 cepas que ensamblan con el subtipo A4 con un soporte de 87, las cuales conciden con cepas Asiáticas del Este.

6.6. Análisis de integración del VPH por medio de NGS

Se realizó secuenciación masiva en 22 muestras, de las cuales se muestra el análisis de 7 secuencias que tuvieron un mayor número de lecturas, por lo que se clasificaron como de alta confianza. Se encontraron desde 1 hasta 63 integraciones por muestra, donde el VPH con mayor número de integraciones

fue el VPH 31 (Tabla 14). Se identificó que todas las muestras tuvieron al menos 1 integración de al menos un VPH-AR. Todas las muestras analizadas tenían infecciones múltiples, las cuales, además, eran infecciones clasificadas como persistentes durante al menos 6 meses.

Se encontró que el sitio con mayor número de rupturas en el genoma del VPH fue el gen E1, seguido de L1 y L2 como se observa en la figura 15.

Se encontró que en el VPH 31, el sitio con mayor número de rupturas fue L1, seguido de E1, como se muestra en la tabla 15. Todos los sitios de ruptura se distribuyen a lo largo del genoma viral, sin embargo no se observó ningún patrón por tipo de VPH.

En la tabla 16, se muestran los sitios en donde se encontró la integración del genoma viral en el genoma huésped. Se puede observar que la mayoría de las integraciones en estas lesiones precancerosas se encontraron en regiones intergénicas e intrónicas. De los cuales encontramos afectados aproximadamente 173 genes (Anexo 1).

Tabla 14. Número de integraciones por grado de lesión y por tipo de VPH

Muestra	Tipo de lesión	VPH 16	VPH 30	VPH 31	VPH 42	VPH 51	VPH 52	VPH 59	VPH 68	VPH 74	Total de integraciones
m59	LIEAG			63							63
m52	ASCUS							30			30
m45	LIEBG								29		29
m47	LIEAG						18			8	26
m54	LIEBG		18		1	4					23
m55	LIEAG	1									1
m62	LIEBG					1					1
Total		1	18	63	1	5	18	30	29	8	173

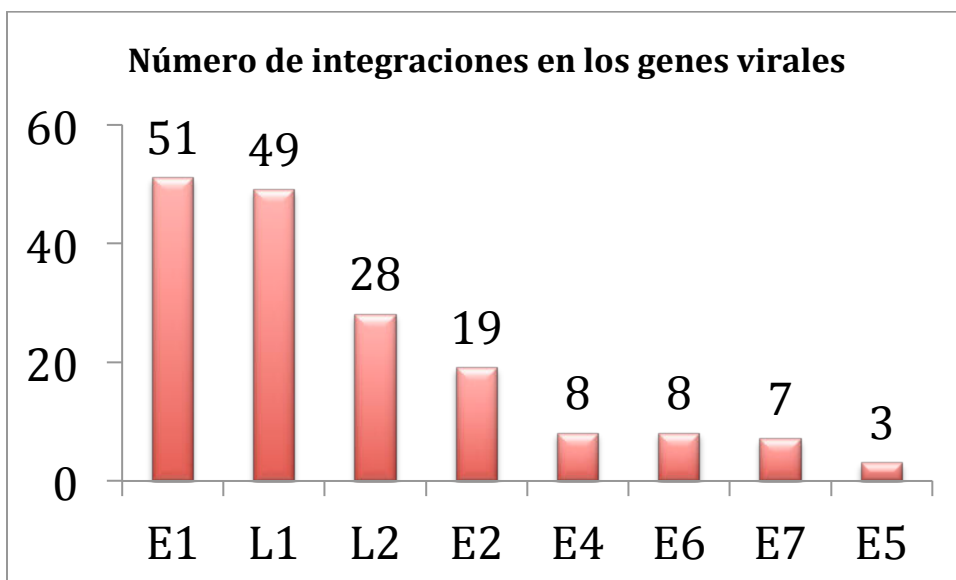


Figura 15. Número de rupturas en los genes virales. Se encontró un mayor número de rupturas en el gen E1 del VPH, seguido del gen L1 y L2. El gen E2 no se encontró como el gen con mayor número de rupturas.

Tabla 15. Número de integraciones por tipo de VPH y genes virales.

Tipo de VPH	E1	E2	E4	E5	E6	E7	L1	L2	Total
31	16	5	1		3	4	24	10	63
59	10	2	1		3		10	4	30
68	8	3	1	3	1		7	6	29
30	4	4				3	3	4	18
52	7	3	2				3	3	18
74	5	1	1				1		8
51	1	1	2				1		5
16								1	1

42					1				1
Total	51	19	8	3	8	7	49	28	173

Tabla 16. Sitios de integración en el genoma humano por región génica.

Región	Número de integraciones
Intergénica	88
Intrónica	68
ncRNA intrónica	8
Exónica	3
UTR3	3
ND*	2
Upstream	1

VII. DISCUSIÓN

7. Discusión

Se colectaron 294 muestras de pacientes con un rango de edad de 18 a 80 años. No hubo una distribución normal en la edad, pero se observó que la mayoría de las pacientes VPH positivas eran jóvenes cercanas a los 18 años. Esto muestra que en nuestra población se presentan lesiones precancerosas desde edades muy tempranas, lo cual es un factor de riesgo para el desarrollo del CC.

Todas las pacientes fueron reclutadas en la consulta de Colposcopia del Departamento de Ginecología y Obstetricia, por lo que este estudio no fue al azar. Sin embargo, en términos epidemiológicos, ginecológicos y de biomarcadores, las variables analizadas tuvieron distribuciones normales.

La media de edad fue de 37 años, la mayoría de las pacientes provenían de la región Noreste de México (89%), se dedicaba al hogar y estaban casadas. Cerca de un 43% tenía antecedentes heredofamiliares de cáncer. No se encontraron diferencias significativas entre el consumo de alcohol o tabaco y las pacientes VPH positivas y negativas.

Entre los antecedentes gineco-obstétricos encontramos diferencias significativas en el inicio de vida sexual activa antes de los 18 años, el 64% de las pacientes VPH positivas cayó en este grupo ($p=0.019$). Además encontramos diferencias significativas en el número de contactos sexuales, donde cerca del 77% de las pacientes VPH positivas mencionó haber tenido más de una pareja sexual, en comparación con las VPH negativas (62%). Hubo un índice bajo de uso de preservativos (33%) y la mayoría de las pacientes VPH positivas tenía antecedentes de una ETS (54%). En nuestro país la cobertura de la vacuna para el VPH es muy baja, ya que de esta población sólo el 3% mencionó haber recibido la vacuna. En otros países sin embargo, ha habido un decremento de lesiones precancerosas (hasta 12%) con el ingreso de la vacuna [127], en contraste, en México la implementación de la vacuna comenzó en el 2008 y aún no hay datos equivalentes del impacto de la vacuna en nuestra población.

Existe además una baja cultura de la realización del Papanicolaou, ya que después del primer contacto sexual, las pacientes tardaron 6 años en promedio para realizarse el primer Papanicolaou.

Nosotros utilizamos como método de detección de VPH una PCR punto final utilizando los iniciadores PGMY 09/11, los cuales amplifican un amplio espectro

de tipos de VPH, con una sensibilidad de hasta 10 genomas de VPH [113, 128, 129]. Para determinar los tipos de VPH decidimos utilizar un estuche de qPCR multiplex para poder cuantificar 14 VPH-AR, el cual es un ensayo *in vitro* que permite la detección, diferenciación y cuantificación de estos VPH, utilizando un fragmento del gen β -globina como control endógeno. Cada genotipo es detectado en un canal diferente de fluorescencia que permite la cuantificación y diferenciación de cada uno. Debido al alto índice de coinfecciones de VPH en la misma muestra un método multiplex fue necesario para permitir la detección de los VPH-AR más prevalentes, sin embargo, no descarta la presencia de VPH de bajo riesgo, que podrían estar participando en la sinergia de la infección por este virus.

Los estudios epidemiológicos pueden ayudar a comprender la prevalencia y diversidad de de los VPH en la población Mexicana. En este estudio, catorce tipos de VPH-AR fueron detectados en mujeres Mexicanas con alteraciones ginecológicas, donde los VPH 16, 18 y 39 fueron los más prevalentes. En la región Noreste de México, los VPH 59, 52, y 16 fueron previamente reportados como los más prevalentes en muestras citológicas normales [130, 131]. Cuando analizamos las muestras de las pacientes conforme a su resultado del Papanicolaou, encontramos que los tipos de VPH más prevalentes en LIEBG fueron 18, 52, y 16; mientras que en LIEAG encontramos 16, 39, y 18 [5, 131].

En un estudio en México donde se utilizó el método de arreglo lineal para la genotipificación de VPH, se encontraron con mayor frecuencia en LIEBG los VPH 16 y 58, y en LIEAG los VPH 16 y 31. Estos resultados resaltan la

importancia del tamizaje del VPH en diferentes regiones de nuestro país. Los estudios que se han llevado a cabo en la población mexicana, han demostrado diferencias en la prevalencia del genotipo viral, dependiendo de la zona geográfica. Por ejemplo, un estudio llevado a cabo en los estados de Aguascalientes, Jalisco y Zacatecas, encontraron el VPH 51 y 16 como los genotipos más prevalentes [132]. Otro estudio realizado en la población del estado de Tlaxcala, encontró que los tipos de VPH 16 y 18 tenían la mayor prevalencia [133].

A nivel mundial los tipos de VPH más prevalentes son 16, 18 y 52 [134-136].

El inconveniente de llevar a cabo estudios comparativos es la estrategia metodológica utilizada y la población analizada; el estuche de genotipificación Linear Array® puede detectar un mayor número de tipos de VPH. Además el criterio de selección de población varía entre los distintos estudios, por ejemplo, población abierta vs grupos de riesgo.

En este estudio detectamos 48 casos VPH positivos con una citología normal aparente, donde el 62.10% tenía infección múltiple de VPH-AR y 63.8% tenían una carga viral alta. Previamente se ha asociado la carga viral alta con el riesgo de persistencia de infección del VPH [137]. En otros reportes [138], la incidencia de VPH en citologías normales fue de 14.5% en la región del centro de México en un tamizaje de población abierta. En nuestro estudio encontramos el 30% de infección de VPH en estas citologías aparentemente normales, superior a lo encontrado en la región centro del país.

Encontramos que el 59% de las muestras VPH positivas tenían una infección múltiple de VPH. Otros estudios reportan infecciones múltiples de VPH en el 68.2% de las muestras de LIEAG [5] y 13.23% en muestras de tejidos embebidos en parafina [139]. Sin embargo, existen estudios que reportan que las infecciones múltiples de VPH no se correlacionan con el incremento del riesgo de tener lesiones precancerosas [140]. A pesar de que el método de qPCR utilizado no puede detectar VPH-BR, no podemos descartar que las muestras podrían tener también una coinfección con un VPH-BR. El 62.5% de las muestras con LIEAG presentaron infecciones múltiples, lo cual fue estadísticamente significativo. Como ha sido reportado previamente, las infecciones múltiples de VPH, especialmente VPH 16, han sido asociadas a un incremento de riesgo de desarrollo de lesiones [141, 142]. La coinfección con múltiples tipos de VPH es más probable que participe en el desarrollo de lesiones, y, aparentemente, existe una sinergia entre el VPH más prevalente, por lo que debería identificarse algún patrón posible.

Encontramos una diferencia significativa entre los grupos analizados y la carga viral del VPH 16, que se encontró incrementada en las LIEBG, lo cual coincide con un reporte de una población en Dinamarca [4]. En otro estudio similar del VPH 16, se encontró una carga viral de VPH 16 aumentada en las LIEAG [143]. Mientras que la asociación de la lesión citológica y la carga viral puede diferir entre los diferentes estudios, la carga viral se ha identificado consistentemente entre las poblaciones como un factor de riesgo para el desarrollo de CC [54, 67, 144, 145]. Y además de que existen estudios que

reportan que el riesgo de las lesiones cervicales se asocian al tipo de VPH [146]. Por lo que la carga viral del VPH 16 podría ser un biomarcador indicativo de una infección activa con potencial riesgo de desarrollo de LIEBG. Encontramos en este estudio que las pacientes que tenían una citología normal con infección de VPH 16, tuvieron una carga viral menor que aquellas con una LIEBG ($p=0.012$). Lo que podría indicar que existe una replicación activa de VPH, lo cual es consistente con otros estudios donde la carga viral disminuye conforme aumenta el grado de la lesión cervical pero aumenta en los casos de CC [147].

Pocos estudios de VPH hacen un seguimiento adecuado de las pacientes, lo que limita los estudios epidemiológicos sobre la persistencia de la infección por VPH y los cambios en la carga viral durante la progresión de la enfermedad. Los estudios que emplean un esquema de seguimiento pueden analizar no solo la prevalencia y la distribución, sino también la persistencia del genotipo, la carga viral a lo largo del tiempo y el comportamiento de progresión tanto de las infecciones únicas por VPH como múltiples infecciones por VPH. Junto con los factores socioculturales, el origen étnico ha demostrado ser una influencia en la prevalencia del VPH. Por ejemplo, un estudio realizado en Estados Unidos que incluyó a 4080 mujeres, de las cuales el 29.7% eran afroamericanas, el 25.6% eran mexicoamericanas, el 8.9% eran hispanas y el 35.8% eran blancas, considerando los años previos a la vacuna de VPH (2003-2006), el tipo de vacuna de VPH y los años posteriores a la licencia (2011-2014), hubo una

disminución significativa en la prevalencia en los dos primeros grupos, pero no en las mexicanoamericanas [148].

La infección persistente del VPH es un factor de riesgo para el desarrollo de CaCU. La carga viral del VPH fue más alta en pacientes con una infección persistente. Esto ya ha sido reportado previamente como un factor de riesgo en otros estudios [149].

La detección y tratamiento de las infecciones del VPH ayudará a reducir la progresión del CaCU. Las neoplasias cervicales intraepiteliales son tratadas con conización cervical, procedimiento de escisión electroquirúrgica en bucle o crioterapia, para reducir el desarrollo de CaCU. Las pacientes incluidas en este estudio fueron referidas a la consulta por un resultado de citología anormal o alguna alteración cervical, que posteriormente, recibieron un tratamiento acorde a su estado clínico. Encontramos que el 38.27% de las pacientes VPH positivas tuvo una infección persistente de VPH. Otros estudios reportan un rango de 10% a 40.9% [5, 150-152] de infecciones persistentes en sus muestras. En estos estudios previos se detectó la infección de VPH un año después de la primera toma de muestra. Pirtea *et al.* encontraron un 41% de infecciones persistentes, similar a nuestros resultados encontrados. Sin embargo la toma de la muestra de seguimiento se realizó en un lapso de tiempo menor a 6 meses de la primera toma de muestra [5]. Esta persistencia se reduce en un 20% después de un año de seguimiento. En nuestro estudio, la muestra de seguimiento se recolectó en un lapso de 6 hasta 12 meses posteriores a la primera toma. Por lo que la

persistencia encontrada en este estudio no pareciera deberse al tiempo de toma muestra de seguimiento.

En un estudio realizado en el 2002 en el noreste de México [130] se encontró un 19.4% de persistencia de infección de VPH, a diferencia de nosotros, que encontramos un 38.27%. No obstante, este estudio realizado en el 2002 fue en población abierta, mientras que este trabajo fue un tamizaje en pacientes con alteraciones ginecológicas. En este mismo estudio, los VPH con mayor prevalencia en las muestras de seguimiento (3 años posteriores a la primer toma), fueron 16 y 18, mientras que en esta investigación los VPH mas prevalentes fueron 59 y 56.

Este estudio nos permitió analizar factores virales asociados con la persistencia, ya que llevamos a cabo un estudio de seguimiento en pacientes que asistieron a la clínica de colposcopia. Estos estudios de seguimiento permiten una evaluación más precisa de la resistencia viral. Evaluamos pacientes con alto riesgo de desarrollar CaCU en la consulta de colposcopia. Todos estos pacientes tenían antecedentes de enfermedades de transmisión sexual previas. El uso de la inspección visual con ácido acético (VIA) para identificar lesiones cancerosas, la detección de VPH de alto riesgo y la cuantificación de las cargas virales, combinadas con el uso de la colposcopia por un médico especializado, nos permitieron evaluar a los pacientes de forma integral y exhaustiva. Las pacientes con un resultado de VPH positivo y una citología anormal, tienen que confirmarse con VIA colposcópica, ya que esta técnica mejora la sensibilidad para la detección de CaCU. La VIA colposcópica tiene el potencial de ser una

herramienta de detección de CaCU, especialmente en países de bajos recursos [153].

En la población analizada, sólo el 3.4% de las mujeres recibieron alguna vacuna del VPH. En nuestro país, la vacunación de las niñas de 9 a 11 años de edad comenzó en el 2009, por lo que la mayoría de las pacientes que participaron en este estudio no fueron vacunadas. Las pacientes vacunadas presentaron infecciones con altas cargas virales por los VPH 39, 45, 51, 52, 56 y 58, además de presentar infecciones múltiples de más de un tipo de VPH. Sólo 3 pacientes vacunadas presentaron infección por VPH 16 o 18. Siete pacientes presentaban una lesión intraepitelial al momento de la consulta, y dos de ellas presentaban verrugas genitales, que son causadas generalmente por los VPH 6 y 11. Estas pacientes habían recibido la vacuna contra VPH 16 y 18.

Los estudios de detección de los tipos de VPH han ayudado a comprender la evolución del VPH en diferentes poblaciones, donde las vacunas no han alcanzado la completa cobertura de la población sexualmente activa. Nuestro estudio tiene la ventaja de que detectamos y cuantificamos 14 VPH-AR, lo cual es de gran utilidad para la detección de pacientes en riesgo de desarrollo de lesiones precancerosas. Nos enfocamos en identificar VPH-AR y su prevalencia, los cuales están asociados al riesgo de progresión a cáncer.

No encontramos diferencias significativas entre los otros tipos de VPH y su carga viral con los grupos analizados, lo cual podría deberse a la presencia de infecciones múltiples. No descartamos la posible sinergia entre las infecciones múltiples, lo cual podría incrementar el riesgo de desarrollar lesiones.

Determinamos también el rango de las cargas virales de los 14 VPH-AR detectados con el estuche de qPCR. En nuestra población fue mayor la carga viral al comparar el VPH 16 vs el VPH 18, mientras que el VPH 18 se encontró por debajo del 52, 56, 59 y 66, lo que podría estar asociado a su capacidad carcinogénica y al grado de lesión en el que fue encontrado. Es importante incrementar el número de muestras para encontrar una posible asociación.

El tamizaje de genotipificación mejorará el manejo del CaCU en la práctica clínica. Para desarrollar una vacuna eficaz, tienen que realizarse estudios epidemiológicos para determinar los tipos de VPH de poblaciones o áreas específicas. Y aunque este tipo de estudios se han realizado en nuestro país, la distribución de los genotipos varía entre las regiones de México. Se han reportado coinfecciones en CaCU y lesiones premalignas, lo cual es muy común en mujeres jóvenes [154, 155].

Con secuenciación de la región L1 de 34 muestras VPH positivas se construyó un árbol filogenético para determinar los subtipos de algunos VPH-AR. En las muestras VPH 16 positivas encontramos que eran cepas VPH A4 (asiáticas) (4/4). En reportes previos [124], las cepas no europeas se han asociado a un mayor riesgo de evolución a CaCU, lo cual pudimos observar en nuestra población, ya que estas lesiones se presentaron en pacientes a una edad muy temprana. Encontramos otras variantes de VPH-AR, de las cuales aún no se ha reportado asociación con el riesgo de evolución a CaCU.

La integración del VPH en el genoma humano es un paso crítico para la evolución a CaCU. Nosotros logramos secuenciar 22 muestras con lesiones

precancerosas. En estudios previos se ha analizado la integración del VPH en el genoma humano en muestras de tumores, mientras que el nuestro es el primer reporte de integración del VPH en lesiones precancerosas.

Se identificaron desde 1 hasta 63 integraciones por muestra, todas las muestras presentaron al menos un tipo de VPH-AR. Utilizamos la secuenciación masiva con el método reportado por Hu *et al*, ya que se enriquecen las secuencias blanco híbridas y por lo tanto podemos detectar un mayor número de integraciones en las muestras [75]. Las muestras que analizamos correspondían a células cervicales de pacientes con infecciones persistentes, por lo que este resultado es relevante, ya que estamos observando que la integración viral está presente en lesiones precursoras (desde ASCUS hasta LIEAG), lo cual no ha sido reportado previamente. Logramos identificar muestras con integración del VPH en LIEBG, lo cual nos indica que la integración del virus se puede dar en etapas tempranas y que esta integración puede ser un biomarcador asociado a persistencia.

Los genes afectados que encontramos en nuestro estudio concuerdan con reportes previos de integración del VPH en el genoma humano, por lo que estos podrían ser biomarcadores de predicción de riesgo y persistencia, para la probable evolución a CaCU [75, 83, 156, 157].

Las limitaciones de este estudio incluyen una selección no azarosa de las muestras y falta de datos epidemiológicos de algunas pacientes. A pesar de esta selección, la población representó distribuciones normales, lo cual nos permitió cumplir nuestros objetivos.

Para disminuir la tasa de mortalidad de CaCU en México, debemos expandir la cobertura de la prueba de Papanicolaou, mejorar los programas de control de calidad para los laboratorios de citopatología, integrar estrategias de detección (prueba de Papanicolaou combinada, pruebas de VPH y vacuna contra el VPH), mejorar la cobertura de la colposcopia e implementar nuevas estrategias educativas de salud sobre el CaCU.

VIII. CONCLUSIONES

8. Conclusiones

La persistencia de las lesiones por VPH se encuentra entre los factores de riesgo más importantes para la progresión de CaCU y quizás el primero para la progresión a lesiones. Identificamos los VPH 16, 18, y 39 como los tipos más prevalentes en muestras citológicas en mujeres Mexicanas con alteraciones ginecológicas. Los VPH 16, 18, 31, 35, 39, 45, 52, 56, y 59 se encontraron asociados a cargas virales altas, mientras que los VPH 16, 18, 51, 52, 59, y 68 se encontraron asociados a infecciones múltiples. La carga viral del VPH 16 se encontró aumentada en LIEBG. El 30% de las pacientes con citología normal presentaron infección por VPH. El 57% de las pacientes con infección múltiple de VPH no pudieron eliminar la infección viral. Este estudio provee mayor evidencia de que las infecciones múltiples son un potencial biomarcador para la persistencia de infección por el VPH. Esta información podría ser valiosa para identificar biomarcadores tempranos para la predicción de lesiones cervicales.

Se encontraron 4 muestras VPH 16 del linaje A, sublinaje A4; tres secuencias de VPH 51 del linaje A, sublinaje A1; una muestra de VPH 31 del linaje C y una muestra VPH 11 del linaje A.

Este es el primer reporte de hallazgos de integración viral en lesiones precursoras de bajo y alto grado con infección persistente, por lo que se propone a la integración del VPH en lesiones precursoras como un potencial biomarcador de evolución a cáncer.

IX. REFERENCIAS.

9. Referencias

1. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985;314(6006):111-4. Epub 1985/03/07. PubMed PMID: 2983228.
2. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. 1999;189(1):12-9. doi: 10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1<12::aid-path431>3.0.co;2-f. PubMed PMID: WOS:000082360300003.
3. Kuguyo O, Tsikai N, Thomford NE, Magwali T, Madziyire MG, Nhachi CFB, et al. Genetic Susceptibility for Cervical Cancer in African Populations: What Are the Host Genetic Drivers? *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 2018;22(7):468-83.
4. Manawapat-Klopfer A, Wang L, Haedicke-Jarboui J, Stubenrauch F, Munk C, Thomsen LT, et al. HPV16 viral load and physical state measurement as a potential immediate triage strategy for HR-HPV-infected women: a study in 644 women with single HPV16 infections. *American Journal of Cancer Research*. 2018;8(4):715-22.
5. Pirtea L, Grigoraş D, Matusz P, Pirtea M, Moleriu L, Tudor A, et al. Age and HPV type as risk factors for HPV persistence after loop excision in patients with high grade cervical lesions: an observational study. *BMC Surgery*. 2016;16:70.
6. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 24 November 2017. ICO/IARC Information Centre on Papillomavirus and Cancer (HPV Information Centre), 2017.
7. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M GmD, Muñoz J, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in Mexico. Summary Report 27 July 2017. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre), 2017.
8. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *PLoS One*. 2012;13(6):607-15.
9. Van Doorslaer K, Tan Q, Xirasagar S, Bandaru S, Gopalan V, Mohamoud Y, et al. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(Database issue):D571-D8.
10. de Villiers E-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Special Issue: The Papillomavirus Episteme*. 2013;445(1):2-10.
11. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30(Supplement 5):F55-F70.
12. Bansal A, Singh M, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J App Basic Med Res*. 2016;6(2):84-9.

13. Fact Sheets by Cancer 2014. Available from:
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
14. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. 2007;7(7):453-9.
15. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, Sanjosé Sd, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women
A meta-analysis from cervical infection to cancer, International Journal of Cancer Volume 131, Issue 10. International Journal of Cancer [Internet]. 2012 15; 131(10):[2349-59 pp.]. Available from:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.27485/abstract>.
16. Illades-Aguilar B, Alarcon-Romero Ldel C, Antonio-Vejar V, Zamudio-Lopez N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. Gynecologic oncology. 2010;117(2):291-6. Epub 2010/03/05. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.036. PubMed PMID: 20199804.
17. Peralta-Rodriguez R, Romero-Morelos P, Villegas-Ruiz V, Mendoza-Rodriguez M, Taniguchi-Ponciano K, Gonzalez-Yebra B, et al. Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. Infectious agents and cancer. 2012;7(1):34. doi: 10.1186/1750-9378-7-34. PubMed PMID: MEDLINE:23199368.
18. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature Reviews Cancer. 2007;7(1):11-22. doi: 10.1038/nrc2050. PubMed PMID: WOS:000243255000012.
19. Valentino K, Poronsky CB. Human Papillomavirus Infection and Vaccination. 2016;31(2):e155-e66.
20. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Chesson HW, Curtis CR, Gee J, et al. Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports. 2014;63(Rr-05):1-30. Epub 2014/08/29. PubMed PMID: 25167164.
21. Yoshida K, Furumoto H, Abe A, Kato T, Nishimura M, Kuwahara A, et al. The possibility of vertical transmission of human papillomavirus through maternal milk. Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2011;31(6):503-6.
22. Louvanto K, Sarkola M, Rintala M, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Breast Milk Is a Potential Vehicle for Human Papillomavirus Transmission to Oral Mucosa of the Spouse. The Pediatric Infectious Disease Journal. 2017;36(7). PubMed PMID: 00006454-201707000-00002.
23. Mant C, Kell B, Rice P, Best JM, Bible JM, Cason J. Buccal exposure to human papillomavirus type 16 is a common yet transitory event of childhood. Journal of medical virology. 2003;71(4):593-8. Epub 2003/10/14. doi: 10.1002/jmv.10529. PubMed PMID: 14556274.
24. Telesheva LF, Dolgushina VF, Abramovskikh OS, Zotova MA, Mezentseva EA, Orner I, et al. [Cytokine status of cervical mucus in women with transitory and

- persistent course of papillomavirus infection]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii. 2012;(4):118-21. Epub 2012/09/04. PubMed PMID: 22937720.
25. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of hpv infection among females in the united states. 2007;297(8):813-9.
 26. Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 2012;18(6):807-15. Epub 2012/11/03. doi: 10.1007/s10156-012-0485-5. PubMed PMID: 23117294.
 27. Trottier H, Ferreira S, Thomann P, Costa MC, Sobrinho JS, Prado JC, et al. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. Cancer research. 2010;70(21):8569-77. Epub 2010/10/28. doi: 10.1158/0008-5472.can-10-0621. PubMed PMID: 20978200.
 28. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. International journal of cancer Journal international du cancer. 2013;133(6):1271-85. Epub 2012/09/11. doi: 10.1002/ijc.27828. PubMed PMID: 22961444; PubMed Central PMCID: PMC3707974.
 29. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. Trends Microbiol. 2011;19(1):33-9. Epub 2010/11/01. doi: 10.1016/j.tim.2010.10.002. PubMed PMID: 21050765.
 30. Matkins PP. Sexually transmitted infections in adolescents. North Carolina medical journal. 2013;74(1):48-52. Epub 2013/03/28. PubMed PMID: 23530381.
 31. Zheng Z-M, Baker CC. PAPILOMAVIRUS GENOME STRUCTURE, EXPRESSION, AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 2006;11:2286-302.
 32. Li Y, Xu C. Human Papillomavirus-Related Cancers. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 23-34.
 33. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. Viruses. 2015;7(7):3863-90.
 34. Yang EJ, Quick MC, Hanamornroongruang S, Lai K, Doyle L, McKeon FD, et al. Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2015;28(7):994-1000.
 35. Kranjec C, Holleywood C, Libert D, Griffin H, Mahmood R, Isaacson E, et al. Modulation of basal cell fate during productive and transforming HPV - 16 infection is mediated by progressive E6 - driven depletion of Notch. The Journal of pathology. 2017;242(4):448-62.
 36. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. 2016;2:16086.
 37. Shreya K, Laura MFaWMK. Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response. 2007;7(1):79-89.

38. Fausch SC, Fahey LM, Da Silva DM, Kast WM. Human Papillomavirus Can Escape Immune Recognition through Langerhans Cell Phosphoinositide 3-Kinase Activation. *J Immunol.* 2005;174(11):7172.
39. Tummers B, Goedemans R, Pelascini LPL, Jordanova ES, van Esch EMG, Meyers C, et al. The interferon-related developmental regulator 1 is used by human papillomavirus to suppress NFκB activation. *Nature communications.* 2015;6:6537-40.
40. Choo KB, Pan CC, Han SH. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology.* 1987;161(1):259-61. Epub 1987/11/01. PubMed PMID: 2823467.
41. Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *Journal of virological methods.* 2009;158(1-2):180-3. Epub 2009/02/04. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.01.005. PubMed PMID: 19187786.
42. Kahla S, Kochbati L, Chanoufi MB, Maalej M, Oueslati R. HPV-16 E2 physical status and molecular evolution in vivo in cervical carcinomas. *The International journal of biological markers.* 2014;29(1):e78-85. Epub 2013/10/31. doi: 10.5301/jbm.5000051. PubMed PMID: 24170557.
43. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. 2014;383(9916):524-32.
44. Xi LF, Schiffman M, Koutsky LA, Hughes JP, Hulbert A, Shen Z, et al. Variant-Specific Persistence of Infections with Human Papillomavirus Types 31, 33, 45, 56 and 58 and Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *International journal of cancer.* 2016;139(5):1098-105.
45. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. 2005;97(14):1072-9.
46. Kim M-J, Kim JJ, Kim S. Type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus by cervical cytology and age: Data from the health check-ups of 7,014 Korean women. *Obstetrics & Gynecology Science.* 2013;56(2):110-20.
47. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. 2017.
48. Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, Lalaoui N, Mougin C, Prétet JL. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. 2006;35(3):270-7.
49. Shukla S, Mahata S, Shishodia G, Pande S, Verma G, Hedau S, et al. Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. *The Indian journal of medical research.* 2014;139(4):531-43. Epub 2014/06/14. PubMed PMID: 24927339; PubMed Central PMCID: PMC4078491.
50. Botezatu A, Socolov D, Goia CD, Iancu IV, Ungureanu C, Huica I, et al. The relationship between HPV16 and HPV18 viral load and cervical lesions progression. *Roumanian archives of microbiology and immunology.* 2009;68(3):175-82. Epub 2010/04/07. PubMed PMID: 20361539.

51. Kahla S, Kochbati L, Sarraj S, Ben Daya I, Maalej M, Oueslati R. Molecular detection of human papillomavirus and viral DNA load after radiotherapy for cervical carcinomas. *Tumori Journal*. 2016;102(5):521-6.
52. Song YJ, Kim J-Y, Lee S-K, Lim H-S, Lim MC, Seo S-S, et al. Persistent human papillomavirus DNA is associated with local recurrence after radiotherapy of uterine cervical cancer. 2011;129(4):896-902.
53. Bencomo-Alvarez AE, Limones-Perches I, Suarez-Rincon AE, Ramirez-Jirano LJ, Borrayo-Carbajal E, Sanchez-Corona J, et al. Human papillomavirus viral load in cervical intraepithelial neoplasia as a prognostic factor in a Mexican population. *Genetics and molecular research : GMR*. 2012;11(4):4720-7. Epub 2012/10/26. doi: 10.4238/2012.October.4.2. PubMed PMID: 23096904.
54. Huang C-G, Lee L-A, Tsao K-C, Liao C-T, Yang L-Y, Kang C-J, et al. Human papillomavirus 16/18 E7 viral loads predict distant metastasis in oral cavity squamous cell carcinoma. 2014;61(2):230-6.
55. Kim J-Y, Park S, Nam B-H, Roh J-W, Lee CH, Kim Y-H, et al. Low Initial Human Papilloma Viral Load Implicates Worse Prognosis in Patients With Uterine Cervical Cancer Treated With Radiotherapy. *JCO*. 2009;27(30):5088-93.
56. Cao M, Shah W, Qi J, Zhou Y, Wang Y, Chen H. Prognostic significance of human papillomavirus viral load in correlation with different therapeutic modalities in cervical cancer patients. 2016;212(9):804-10.
57. Kang WD, Kim CH, Cho MK, Kim JW, Cho HY, Kim YH, et al. HPV-18 is a poor prognostic factor, unlike the HPV viral load, in patients with stage IB–IIA cervical cancer undergoing radical hysterectomy. 2011;121(3):546-50.
58. Song JS, Kim EJ, Choi J, Gong G, Sung CO. Significance of HPV-58 Infection in Women Who Are HPV-Positive, Cytology-Negative and Living in a Country with a High Prevalence of HPV-58 Infection. *PloS one*. 2013;8(3):e58678.
59. Quddus MR, Manna P, Sung CJ, Kerley S, Steinhoff MM, Lawrence WD. Prevalence, distribution, and viral burden of all 15 high-risk human papillomavirus types in adenosquamous carcinoma of the uterine cervix: a multiplex real-time polymerase chain reaction-based study. *Human pathology*. 2013. Epub 2013/12/21. doi: 10.1016/j.humpath.2013.07.048. PubMed PMID: 24355194.
60. Vargas H, Sánchez JP, Guerrero ML, Ortiz LT, Rodríguez DM, Amaya J, et al. Type-Specific Identification of Genital Human Papillomavirus Infection in Women with Cytological Abnormality. 2016;60(3):211-6.
61. Han KT, Sin JI. DNA vaccines targeting human papillomavirus-associated diseases: progresses in animal and clinical studies. *Clinical and experimental vaccine research*. 2013;2(2):106-14. Epub 2013/07/17. doi: 10.7774/cevr.2013.2.2.106. PubMed PMID: 23858401; PubMed Central PMCID: PMC3710918.
62. Harper D, Franco E, Wheeler C, Moscicki A, Romanowski B, Roteli-Martins C, et al. HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet*. 2006;367(9518):55 - 1247.
63. Group FIS. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med*. 2007;356(19):27 - 1915.

64. Pils S, Joura EA. From the monovalent to the nine-valent HPV vaccine. 2015;21(9):827-33.
65. Chang MS, Oh S, Jung E-J, Park JH, Jeon H-W, Lee TS, et al. High-risk human papillomavirus load and biomarkers in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. 2014;122(5):427-36.
66. Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Pretet JL, et al. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;121(10):2198-204. Epub 2007/07/28. doi: 10.1002/ijc.22959. PubMed PMID: 17657742.
67. Sundström K, Ploner A, Dahlström LA, Palmgren J, Dillner J, Adami H-O, et al. PROSPECTIVE STUDY OF HPV16 VIRAL LOAD AND RISK OF IN SITU AND INVASIVE SQUAMOUS CERVICAL CANCER. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2013;22(1):150-8.
68. Deng T, Feng Y, Zheng J, Huang Q, Liu J. Low initial human papillomavirus viral load may indicate worse prognosis in patients with cervical carcinoma treated with surgery. *Journal of Gynecologic Oncology*. 2015;26(2):111-7.
69. Argyri E, Papaspyridakos S, Tsimplaki E, Michala L, Myriokefalitaki E, Papassideri I, et al. A cross sectional study of HPV type prevalence according to age and cytology. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13(1):53. PubMed PMID: doi:10.1186/1471-2334-13-53.
70. Duvlis S, Popovska-Jankovic K, Arsova ZS, Memeti S, Popeska Z, Plaseska-Karanfilska D. HPV E6/E7 mRNA versus HPV DNA biomarker in cervical cancer screening of a group of Macedonian women. 2015;87(9):1578-86.
71. Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2008;8(4):405-15.
72. Liu T-Y, Xie R, Luo L, Reilly KH, He C, Lin Y-Z, et al. Diagnostic validity of human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples. 2014;196(Supplement C):120-5.
73. Wei WF, Su GD, Wu LF, He LN, Lu L, Zhou J, et al. [Study of integrated state of HPV-16 infection in cervical cancer and precancerous tissues]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2015;35(1):47-50. Epub 2015/01/24. PubMed PMID: 25613608.
74. Kahla S, Kochbati L, Maalej M, Oueslati R. Situation of HPV16 E2 gene status during radiotherapy treatment of cervical carcinoma. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(6):2869-73. Epub 2014/04/26. PubMed PMID: 24761916.
75. Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet*. 2015;47(2):158-63. Epub 2015/01/13. doi: 10.1038/ng.3178. PubMed PMID: 25581428.
76. Hsu Y-W, Huang R-L, Su P-H, Chen Y-C, Wang H-C, Liao C-C, et al. Genotype-specific methylation of HPV in cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of Gynecologic Oncology*. 2017;28(4):e56.

77. Lai H-C, Ou Y-C, Chen T-C, Huang H-J, Cheng Y-M, Chen C-H, et al. PAX1/SOX1 DNA methylation and cervical neoplasia detection: a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study. *Cancer Medicine*. 2014;3(4):1062-74.
78. Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *Journal of medical virology*. 2002;67(4):574-82. Epub 2002/07/13. doi: 10.1002/jmv.10141. PubMed PMID: 12116007.
79. Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *The Journal of pathology*. 2004;202(1):23-33. Epub 2003/12/25. doi: 10.1002/path.1490. PubMed PMID: 14694518.
80. Kiseleva VI, Krikunova LI, Mkrtchian LS, Liubina LV, Beziaeva GP, Panarina LV, et al. [The significance of physical status of human papillomavirus type 16 for predicting the effectiveness of invasive cervical cancer treatment]. *Voprosy onkologii*. 2013;59(6):756-60. Epub 2013/01/01. PubMed PMID: 24624787.
81. Li Y, Xiang Y, Zhang RF, Cai YP, Yang Y, Cheng XM, et al. [Viral load, genomic integration frequency of human papillomavirus 16 in cervical cancer and precancerous lesions]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2011;91(13):906-10. Epub 2011/05/24. PubMed PMID: 21600119.
82. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(5):1755-62. Epub 2006/05/05. doi: 10.1128/jcm.44.5.1755-1762.2006. PubMed PMID: 16672403; PubMed Central PMCID: PMCPMC1479176.
83. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Peadamallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 2013. Epub 2014/01/07. doi: 10.1038/nature12881. PubMed PMID: 24390348.
84. Parfenov M, Peadamallu CS, Gehlenborg N, Freeman SS, Danilova L, Bristow CA, et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(43):15544-9. Epub 2014/10/15. doi: 10.1073/pnas.1416074111. PubMed PMID: 25313082; PubMed Central PMCID: PMCPMC4217452.
85. Khoury JD, Tannir NM, Williams MD, Chen Y, Yao H, Zhang J, et al. Landscape of DNA virus associations across human malignant cancers: analysis of 3,775 cases using RNA-Seq. *Journal of virology*. 2013;87(16):8916-26. Epub 2013/06/07. doi: 10.1128/jvi.00340-13. PubMed PMID: 23740984; PubMed Central PMCID: PMCPMC3754044.
86. Rusan M, Li YY, Hammerman PS. Genomic landscape of human papillomavirus-associated cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(9):2009-19. Epub 2015/03/18. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-14-1101. PubMed PMID: 25779941; PubMed Central PMCID: PMCPMC4417456.
87. Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of

- individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118(6):1481-95. Epub 2005/10/06. doi: 10.1002/ijc.21493. PubMed PMID: 16206285.
88. Vesco KK, Whitlock EP, Eder M, Burda BU, Senger CA, Lutz K. Risk Factors and Other Epidemiologic Considerations for Cervical Cancer Screening: A Narrative Review for the U.S. Preventive Services Task Force. 2011;155(10):698-705.
 89. Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST, Gold MA, et al. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2013;128(2):265-70. Epub 2012/11/14. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.11.003. PubMed PMID: 23146688.
 90. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. 2002;89(2):191-9.
 91. Ramachandran B. Functional association of oestrogen receptors with HPV infection in cervical carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer*. 2017;24(4):R99-R108.
 92. Zhu Y-P, Jia Z-W, Dai B, Ye D-W, Kong Y-Y, Chang K, et al. Relationship between circumcision and human papillomavirus infection: a systematic review and meta-analysis. *Asian Journal of Andrology*. 2017;19(1):125-31.
 93. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. 2002;359(9312):1093-101.
 94. Chelimo C, Woulides TA, Cameron LD, Elwood JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. 2013;66(3):207-17.
 95. Castaneda-Iniguez MS, Toledo-Cisneros R, Aguilera-Delgadillo M. [Risk factors for cervico-uterine cancer in women in Zacatecas]. *Salud publica de Mexico*. 1998;40(4):330-8. Epub 1998/10/17. PubMed PMID: 9774902.
 96. McCloskey JC, Martin Kast W, Flexman JP, McCallum D, French MA, Phillips M. Syndemic synergy of HPV and other sexually transmitted pathogens in the development of high-grade anal squamous intraepithelial lesions. 2017;4:90-8.
 97. Cho C-Y, Lo Y-C, Hung M-C, Lai C-C, Chen C-J, Wu K-G. Risk of cancer in patients with genital warts: A nationwide, population-based cohort study in Taiwan. *PloS one*. 2017;12(8):e0183183.
 98. Lopes RdVC, Teixeira JA, Marchioni D, Villa LL, Giuliano AR, Luiza Baggio M, et al. Dietary intake of selected nutrients and persistence of HPV infection in men. 2017;141(4):757-65.
 99. Lei X, Chen W, Yu L, Wu Z, Qin Y, Gao G, et al. [Association between life style, diet intake and high risk-human papillomavirus persistent infection among rural women in Xinmi City, Henan Province]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*. 2016;45(1):45-50. Epub 2016/03/19. PubMed PMID: 26987195.
 100. Blumenthal MJ, Ujma S, Katz AA, Schäfer G. The Role of Type 2 Diabetes for the Development of Pathogen-Associated Cancers in the Face of the HIV/AIDS Epidemic. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(2368). doi: 10.3389/fmicb.2017.02368.

101. Lee M, Park EC, Chang HS, Kwon JA, Yoo KB, Kim TH. Socioeconomic disparity in cervical cancer screening among Korean women: 1998-2010. *BMC public health*. 2013;13:553. Epub 2013/06/08. doi: 10.1186/1471-2458-13-553. PubMed PMID: 23742100; PubMed Central PMCID: PMC3682861.
102. Mayrand M-H, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screening Tests for Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(16):1579-88. doi: 10.1056/NEJMoa071430. PubMed PMID: 17942871.
103. Kurman RJ, Malkasian GD, Jr., Sedlis A, Solomon D. From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new cervical cytologic classification. *Obstet Gynecol*. 1991;77(5):779-82. Epub 1991/05/11. PubMed PMID: 1849626.
104. Ricci A P, Perucca P E, Koljanin V J, Baeriswyl T E. CITOLOGÍA DE BASE LÍQUIDA: REVISIÓN DE LA HISTORIA Y LOS ESTUDIOS AL RESPECTO. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 2004;69:256-62.
105. Mills A, Balasubramaniam R, Longacre TA, Kong CS, Pinsky BA. Laboratory-developed L1 sequencing and type-specific, real-time polymerase chain reaction for the detection and typing of human papillomaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2013;137(1):50-4. Epub 2013/01/02. doi: 10.5858/arpa.2011-0392-OA. PubMed PMID: 23276174.
106. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R, for the European CCSG. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. 2011;119(3):158-66.
107. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, et al. Triage of Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. 2011;121(3):505-9.
108. Vargas-Hernández VM, Vargas-Aguilar VM, Tovar-Rodríguez JM. Detección primaria del cáncer cervicouterino. 2015;83(5):448-53.
109. Torres-Ibarra L, leticia.torres@insp.mx, Lazcano-Ponce E, Franco EL, Cuzick J, Hernández-Ávila M, et al. Estrategias de triage en la detección de cáncer cervical: métodos del estudio FRIDA. *Salud publica de Mexico*. 2018;58(2):197-210.
110. PAHO. Experiencia de México Introducción de vacuna preventiva y prueba de detección del Virus del Papiloma Humano (VPH) Programa de Cáncer Cérvico Uterino. In: México CNdEdGnySRSadS, editor.: Pan American Health Organization; 2010.
111. Hurtado-Salgado E, Ortiz-Panozo E, Salmerón J, Saavedra-Lara N, Kuri-Morales P, Pesqueira-Villegas E, et al. Use of HPV testing in cervical cancer screening services in Mexico, 2008-2018: a nationwide database study. *Salud publica de Mexico*. 2018;60(6):722-33. Epub 2019/01/31. doi: 10.21149/9891. PubMed PMID: 30699277.
112. Ikenberg H. Laboratory diagnosis of human papillomavirus infection. *Current problems in dermatology*. 2014;45:166-74. Epub 2014/03/20. doi: 10.1159/000356515. PubMed PMID: 24643185.
113. Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE, Kendall H, Fishman S, Dong H, et al. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. 2002;68(3):417-23.

114. Lillsunde Larsson G, Helenius G. Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45 - a short report. *Cellular Oncology (Dordrecht)*. 2017;40(5):521-7.
115. Asiaf A, Ahmad ST, Mohammad SO, Zargar MA. Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2013. Epub 2013/10/17. doi: 10.1097/CEJ.0b013e328364f273. PubMed PMID: 24129107.
116. Robles C, Hernández ML, Almonte M. Alternative HPV vaccination schedules in Latin America. *Salud publica de Mexico*. 2018;60(6):693-702. Epub 2019/01/31. doi: 10.21149/9810. PubMed PMID: 30699274.
117. Torres-Poveda KJ, Cuadra-Hernández SM, Castro-Romero JI, Madrid-Marina V. La política focalizada en el programa de vacunación contra el Virus del Papiloma Humano en México: aspectos éticos. *Acta bioethica*. 2011;17:85-94.
118. Flores YN, Salmerón J, Glenn BA, Lang CM, Chang LC, Bastani R. Clinician offering is a key factor associated with HPV vaccine uptake among Mexican mothers in the USA and Mexico: a cross-sectional study. *Int J Public Health*. 2019;64(3):323-32. Epub 2018/12/07. doi: 10.1007/s00038-018-1176-5. PubMed PMID: 30506364; PubMed Central PMCID: PMC6451874.
119. Saitoh T, Kuramochi K, Imai T, Takata K, Takehara M, Kobayashi S, et al. Podophyllotoxin directly binds a hinge domain in E2 of HPV and inhibits an E2/E7 interaction in vitro. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2008;16(10):5815-25. Epub 2008/04/09. doi: 10.1016/j.bmc.2008.03.053. PubMed PMID: 18396405.
120. Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander A, Lacey CJ, et al. Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine*. 2012;30, Supplement 5(0):F71-F82.
121. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2012;5(7):887-900. Epub 2012/05/24. doi: 10.1158/1940-6207.capr-11-0432. PubMed PMID: 22617168.
122. Hert DG, Fredlake CP, Barron AE. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*. 2008;29(23):4618-26. Epub 2008/12/05. doi: 10.1002/elps.200800456. PubMed PMID: 19053153.
123. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*. 2012;21(8):1794-805. Epub 2012/04/11. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x. PubMed PMID: 22486820.
124. Mirabello L, Yeager M, Yu K, Clifford GM, Xiao Y, Zhu B, et al. HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis. *Cell*. 2017;170(6):1164-74.e6. Epub 2017/09/09. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.001. PubMed PMID: 28886384.
125. Cullen M, Boland JF, Schiffman M, Zhang X, Wentzensen N, Yang Q, et al. Deep sequencing of HPV16 genomes: A new high-throughput tool for exploring the carcinogenicity and natural history of HPV16 infection. *Papillomavirus Research*. 2015;1:3-11.

126. Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero LdC, Jiménez-López MA, Garzón-Barrientos VH, Calleja-Macías I, Barrera-Saldaña HA, et al. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal*. 2015;12:29.
127. Baldur-Felskov B, Dehlendorff C, Junge J, Munk C, Kjaer SK. Incidence of cervical lesions in Danish women before and after implementation of a national HPV vaccination program. 2014;25(7):915-22. PubMed PMID: Baldur-Felskov2014.
128. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(1):357-61. Epub 2000/01/05. PubMed PMID: 10618116; PubMed Central PMCID: PMCPMC88724.
129. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, et al. Use of PGMV Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(3):902-7.
130. Fajardo - Ramírez Oscar R, Barboza - Cerda María C, Ortiz - López R, Rojas - Martínez A, Garza - Rodríguez María L, Sepúlveda - Flores A, et al. Prevalence and 3 - year persistence of human papillomavirus serotypes in asymptomatic patients in Northern Mexico. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2016;136(1):40-6.
131. Flores-Miramontes MG, Torres-Reyes LA, Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Pina-Sanchez P, Cortes-Gutierrez E, et al. [HPV genotypes prevalence in Mexico and worldwide detected by Linear Array]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2015;53 Suppl 2:S122-30. Epub 2015/10/16. PubMed PMID: 26462507.
132. Campos RG, Malacara Rosas A, Gutiérrez Santillán E, Delgado Gutiérrez M, Torres Orozco RE, García Martínez ED, et al. Unusual prevalence of high-risk genotypes of human papillomavirus in a group of women with neoplastic lesions and cervical cancer from Central Mexico. *PloS one*. 2019;14(4):e0215222. Epub 2019/04/19. doi: 10.1371/journal.pone.0215222. PubMed PMID: 30998701; PubMed Central PMCID: PMCPMC6474327.
133. Rudolph SE, Lorincz A, Wheeler CM, Gravitt P, Lazcano-Ponce E, Torres-Ibarra L, et al. Population-based prevalence of cervical infection with human papillomavirus genotypes 16 and 18 and other high risk types in Tlaxcala, Mexico. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):461. Epub 2016/09/03. doi: 10.1186/s12879-016-1782-x. PubMed PMID: 27585544; PubMed Central PMCID: PMCPMC5008001.
134. Lu S, Cong X, Li M, Chang F, Ma L, Cao Yong T. Distribution of high - risk human papillomavirus genotypes in HPV - infected women in Beijing, China. *Journal of medical virology*. 2015;87(3):504-7.
135. Jamdar F, Farzaneh F, Navidpour F, Younesi S, Balvayeh P, Hosseini M, et al. Prevalence of human papillomavirus infection among Iranian women using COBAS HPV DNA testing. *Infectious Agents and Cancer*. 2018;13:6.
136. Resende LSdA, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Alves RRF, Ribeiro AA, Zeferino LC, et al. A portrait of single and multiple HPV type infections in Brazilian women of

- different age strata with squamous or glandular cervical lesions. *BMC Infectious Diseases*. 2014;14:214-.
137. Mittal S, Basu P, Muwonge R, Banerjee D, Ghosh I, Sengupta Mitali M, et al. Risk of high - grade precancerous lesions and invasive cancers in high - risk HPV - positive women with normal cervix or CIN 1 at baseline—A population - based cohort study. *International Journal of Cancer*. 2017;140(8):1850-9.
 138. Lazcano - Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah Keerti V, Alonso P, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *International Journal of Cancer*. 2001;91(3):412-20.
 139. Mastutik G, Alia R, Rahniayu A, Rahaju AS, Kurniasari N, Putra ST. GENOTYPING OF HUMAN PAPPILOMAVIRUS IN CERVICAL PRECANCEROUS LESION AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA AT DR. SOETOMO HOSPITAL, SURABAYA, INDONESIA. *African Journal of Infectious Diseases*. 2018;12(1 Suppl):7-12.
 140. Salazar KL, Zhou HS, Xu J, Peterson LE, Schwartz MR, Mody DR, et al. Multiple Human Papilloma Virus Infections and Their Impact on the Development of High-Risk Cervical Lesions. 2015;59(5):391-8.
 141. Hajia M, Sohrabi A. Possible Synergistic Interactions Among Multiple HPV Genotypes in Women Suffering from Genital Neoplasia. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2018;19(3):785-9. Epub 2018/03/28. doi: 10.22034/apjcp.2018.19.3.785. PubMed PMID: 29582635.
 142. Rovelli C, Poli A, Galli L, Cernuschi M, Tamburini AM, Racca S, et al. 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*. 2017;12(10):e0186367.
 143. Carcopino X, Henry M, Mancini J, Giusiano S, Boubli L, Olive D, et al. Significance of HPV 16 and 18 viral load quantitation in women referred for colposcopy. *Journal of medical virology*. 2011;84(2):306-13.
 144. Long W, Yang Z, Li X, Chen M, Liu J, Zhang Y, et al. HPV-16, HPV-58, and HPV-33 are the most carcinogenic HPV genotypes in Southwestern China and their viral loads are associated with severity of premalignant lesions in the cervix. *Virology Journal*. 2018;15:94.
 145. Chang L, He X, Yu G, Wu Y. Effectiveness of HPV 16 viral load and the E2/E6 ratio for the prediction of cervical cancer risk among Chinese women. *Journal of medical virology*. 2013;85(4):646-54.
 146. Fu Xi L, Schiffman M, Ke Y, Hughes JP, Galloway DA, He Z, et al. Type-dependent association between risk of cervical intraepithelial neoplasia and viral load of oncogenic human papillomavirus types other than types 16 and 18. *International Journal of Cancer*. 2017;140(8):1747-56.
 147. Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*. 2006;59(5):513-7. Epub 2006/02/18. doi: 10.1136/jcp.2004.024570. PubMed PMID: 16484445; PubMed Central PMCID: PMC1860285.
 148. Hirth J, McGrath CJ, Kuo YF, Rupp RE, Starkey JM, Berenson AB. Impact of human papillomavirus vaccination on racial/ethnic disparities in vaccine-type

- human papillomavirus prevalence among 14-26 year old females in the U.S. *Vaccine*. 2018;36(50):7682-8. Epub 2018/11/01. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.10.075. PubMed PMID: 30377066; PubMed Central PMCID: PMC6289515.
149. Oh HY, Seo S-S, Kim MK, Lee DO, Chung YK, Lim MC, et al. Synergistic Effect of Viral Load and Alcohol Consumption on the Risk of Persistent High-Risk Human Papillomavirus Infection. *PloS one*. 2014;9(8):e104374.
150. Zhang H, Zhang T, You Z, Zhang Y. Positive Surgical Margin, HPV Persistence, and Expression of Both TPX2 and PD-L1 Are Associated with Persistence/Recurrence of Cervical Intraepithelial Neoplasia after Cervical Conization. *PloS one*. 2015;10(12):e0142868.
151. Bennett R, Cerigo H, Coutlée F, Roger M, Franco EL, Brassard P. Incidence, Persistence, and Determinants of Human Papillomavirus Infection in a Population of Inuit Women in Northern Quebec. *Sexually Transmitted Diseases*. 2015;42(5). PubMed PMID: 00007435-201505000-00008.
152. Stensen S, Kjaer Susanne K, Jensen Signe M, Frederiksen K, Junge J, Iftner T, et al. Factors associated with type - specific persistence of high - risk human papillomavirus infection: A population - based study. *International Journal of Cancer*. 2015;138(2):361-8.
153. Gaffikin L, Lauterbach M, Blumenthal PD. Performance of visual inspection with acetic acid for cervical cancer screening: a qualitative summary of evidence to date. *Obstet Gynecol Surv*. 2003;58(8):543-50. Epub 2003/07/30. doi: 10.1097/01.ogx.0000079632.98372.26. PubMed PMID: 12886165.
154. Chaturvedi AK, Myers L, Hammons AF, Clark RA, Dunlap K, Kissinger PJ, et al. Prevalence and Clustering Patterns of Human Papillomavirus Genotypes in Multiple Infections. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005;14(10):2439.
155. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M, et al. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(7):910-20.
156. Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome research*. 2014;24(2):185-99. Epub 2013/11/10. doi: 10.1101/gr.164806.113. PubMed PMID: 24201445; PubMed Central PMCID: PMC3912410.
157. Zhang R, Shen C, Zhao L, Wang J, McCrae M, Chen X, et al. Dysregulation of host cellular genes targeted by human papillomavirus (HPV) integration contributes to HPV-related cervical carcinogenesis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015. Epub 2015/09/30. doi: 10.1002/ijc.29872. PubMed PMID: 26417997.