



Universidad de Oviedo

DEPARTAMENTO: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA: BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER DE CERVIX.

FACTORES VIRALES DE PROGRESIÓN



Susana Rojo Alba

Tesis doctoral, 2016

DEPARTAMENTO: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA: BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y
CÁNCER DE CERVIX.**

FACTORES VIRALES DE PROGRESIÓN



Susana Rojo Alba
Tesis doctoral, 2016



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

| | |
|--|--|
| 1.- Título de la Tesis | |
| Español/Otro Idioma: VPH y cáncer de cérvix. Factores virales de progresión. | Inglés: HPV and Cervical cancer. Progression viral factors. |
| 2.- Autor | |
| Nombre: Susana Rojo Alba | |
| Programa de Doctorado: Biología Celular y Molecular | |
| Órgano responsable: Dpto: Bioquímica y Biología molecular. Universidad de Oviedo | |

RESUMEN (en español)

La infección por el VPH es la infección de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial y es una condición necesaria pero insuficiente para que se produzca un cáncer de cuello de útero, detectándose este virus en casi la totalidad de los mismos y hasta en el 80% de las lesiones preneoplásicas (CIN III). La infección por este virus puede eliminarse en menos de dos años, siendo una condición indispensable para el desarrollo de cáncer, la persistencia del ADN del VPH en la célula infectada. Los VPH producen infecciones en regiones donde las células del sistema inmunitario son escasas, lo que favorece su multiplicación y progresión. El VPH 16 es el genotipo más frecuente en las mujeres con lesiones más graves y peor pronóstico. Sin embargo, el VPH 16 no es el único genotipo que provoca malignidad. Dentro del genotipo VPH 16 se han detectado distintos linajes y variantes que se relacionan con una peor evolución de las lesiones intraepiteliales. Factores virales como la integración de su genoma, la carga viral, las variantes genómicas o infecciones mixtas, los hacen comportarse de formas diferentes. En este trabajo se estudian estas características virales con el fin de intentar establecer unos biomarcadores que puedan predecir la evolución de las pacientes. Para ello, se seleccionaron 415 muestras de exudados endocervicales pertenecientes a 234 mujeres. De ellas, 177 tenían un seguimiento virológico de la infección por VPH de al menos 36 meses. Las 57 mujeres restantes infectadas con VPH 16 procedían de las consultas de cribado oportunista de VPH durante los años 2011 – 2012. Se revisaron las historias clínicas de las pacientes para conocer su evolución citológica. Se observó que el genotipo más frecuente fue el VPH 16 seguido de los genotipos de su familia $\alpha 9$ VPH, la mayoría incluidos en la nueva vacuna nonavalente. No se observan diferencias significativas entre los distintos genotipos y la edad de las pacientes. Respecto a las lesiones que presentaban las pacientes y su edad se



observó que las que tuvieron edades entre 31 y 35 años tuvieron significativamente más HSIL que las menores de 30 años ($p=0.02$). El 64.4% de las pacientes necesitaron al menos una intervención quirúrgica para eliminar la infección. Las pacientes que presentaban lesiones de alto grado evolucionaron peor que el resto ($p<0.0001$). Respecto al tiempo de regresión de las lesiones el 33.8% de las pacientes eliminan o reducen su lesión en un tiempo medio de 12.2 ± 9.6 meses. La carga viral de las pacientes que evolucionaron mal tuvieron una carga viral media de 5.12 ± 0.75 logaritmos de copias/1000 células frente a 4.07 ± 0.78 logaritmos de copias/1000 células de las 16 que evolucionaron bien ($p=0.0008$). La presencia de distintas variantes del VPH 16 se detectaron en pacientes con mala evolución aunque estos datos no fueron significativos. Sin embargo, lo que se constató fue que estas variantes perduran a lo largo del seguimiento. Según los resultados obtenidos, en los protocolos de seguimiento de las pacientes infectadas por VPH se deberían utilizar técnicas que permitan conocer el genotipo y la carga viral del mismo. El genotipo permite saber si es un genotipo con alto riesgo de producir lesiones de alto grado y la variación de la CV adelantaría el pronóstico de la infección. Además una detección de las variantes del VPH 16 puede indicar persistencia de la infección por la misma cepa viral, causa necesaria para el desarrollo del cáncer de cérvix.

RESUMEN (en Inglés)

HPV infection is the most common sexually transmitted disease in the world. Although HPV infection can be cleared in less than two years, HPV is detected in almost all of cervical cancer and up to 80% of preneoplastic lesions (CIN III). Both facts support its role as a necessary but not sufficient cause to develop a cervical cancer, being viral DNA persistence in the infected cell an indispensable condition for cancer development. HPV infection occurs in regions where immune system cells are limited, which allows its multiplication and progression. Although, HPV 16 is the most common genotype in women with more severe lesions and worse prognosis, is not the only one which causes malignancy. Furthermore, different variants of the genotype HPV-16, which are related to a worse outcome of intraepithelial lesions, have been reported. Several viral factors, such as viral genome integration, viral load, genotypes, variants or mixed infections, have been associated to different viral behavior. In this thesis, these viral characteristics have been studied in order to try to establish biomarkers that can predict patient evolution. Thus, 415 endocervical swabs belonging to 234 women were collected. Of



these, 177 had a viral monitoring of HPV infection of at least 36 months. HPV opportunistic screenings were performed in the remaining 57 HPV-16 infected women during the years 2011 to 2012. Patient's medical records were reviewed to know their cytological evolution. The most frequent genotype was HPV-16 followed by genotypes of HPV $\alpha 9$ family, which are mostly included in the new nine-valent vaccine. No significant differences between genotypes and patients age were observed. Regarding cervical lesions and patients age, it was observed that the rate of HSIL were lower in patients aged between 31 and 35 years than in those 30 years old ($p = 0.02$). At least one surgery to remove the infection was needed in 64.4% of patients. Patients with high-grade lesions evolved worse than the rest ($p < 0.0001$). Regarding the time of lesions regression, 33.8% of patients eliminate or reduce them in an average time of 12.2 ± 9.6 months. The average viral load of poor outcome patients was higher than in good outcome ones (5.12 ± 0.75 vs. 4.07 ± 0.78 log copies / 1000 cells; $p = 0.0008$). Different HPV-16 variants were detected in patients with worse outcome. Although these data were not significant, it was found that these variants remain along this study. According to the results obtained in this thesis, molecular techniques to identify genotypes and quantify viral loads should be included in routine screening protocols of HPV infected patients. Identification of genotypes, as well as variations of the viral load, would let to predict high risk of cancer development and infection outcome, respectively. Furthermore, the detection of HPV 16 variants could indicate persistent infection by the same virus strain, which is a necessary cause for cervical cancer development.

*Por muy larga que sea la tormenta,
El sol siempre vuelve a brillar entre las nubes.*

Khalil Gibran

Agradecimientos

A lo largo de la realización de esta tesis, siempre tuve claro que sin la ayuda de muchas de las personas que nombraré a continuación, no hubiera sido posible llegar a este momento.

En primer lugar, por supuesto muchísimas gracias a mis directoras de tesis, Marta y María, todo lo que escriba se quedará corto para agradeceros vuestras directrices, apoyo tanto profesional como personal y sobre todo y para mí lo más importante la cantidad de horas que habéis dedicado a esta tesis, en algunos momentos pienso que incluso más que yo. A Marta en particular gracias por cada whatsapp de ánimo y sobre todo gracias por estar ahí cada minuto a pesar de tu embarazo.

A Santi gracias por aportar tu punto de vista a esta tesis a pesar de no tener ningún tipo de obligación de hacerlo y por meternos presión para que llegará a su fin.

Muchas gracias a Jose Boga y Ana Palacio por vuestra enorme paciencia conmigo y por resolverme las mismas dudas una y otra vez.

Fran, no tengo palabras para agradecerte todas las clases de EXCEL y WORD avanzadas que me has dado para que esta tesis no quedara hecha un desastre y a Ana Verdugo por sus ánimos y ayuda.

Gracias a todo el personal del Servicio de Microbiología en general y de la Unidad de Virología en particular, por haberme acompañado y apoyado todo este tiempo, de todos y cada uno de vosotros he aprendido algo a lo largo de estos años. A los facultativos gracias por enseñarme a amar la Microbiología y a incitarme a mejorar en mi trabajo cada día. Al resto del personal gracias por hacerme ir feliz a trabajar cada día. A los servicios de Ginecología y Genética gracias por su colaboración.

A mis compañeros residentes Cande, Javi, Oscar Carlos, y Juan, gracias por vuestro apoyo incondicional, sinceridad y por animarme a seguir adelante en los momentos más complicados.

Gracias a mis padres, familia y amigas de la infancia que a pesar de la distancia se han llevado la peor parte, ya que este último año he sido una persona prácticamente ausente en sus vidas.

Y por último, quiero dar las gracias a mi otra gran familia, la asturiana, Bego, Telenti, Maite, Sandra, Zapi, a mis becarias favoritas Miriam y Zulema, Yaiza, Miguel, y muchos de los anteriormente citados por otras circunstancias gracias por soportarme durante este tiempo y sobre todo por hacerme sentir como en casa, así ha sido mucho más fácil realizar este trabajo y no perder la cabeza en el intento.

Para concluir reiterar mis agradecimientos a Marta y María porque esta tesis es más suya que mía. GRACIAS.

ABREVIATURAS

AC: Adenocarcinoma

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADV: Adenovirus

AGC(Atypical glandular cells): Células atípicas glandulares

AIS: Adenocarcinoma endocervical in situ

ARN: Ácido ribonucleico

ASC-H (atypical squamous cells - cannot exclude HSIL): Células escamosas atípicas, no puede descartarse HSIL

ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance): Células escamosas atípicas de significado incierto

ATP: Adenosin trifosfato

CES : Neoplasia de células escamosas

CIN (cervical intraepithelial neoplasia): Neoplasia intraepitelial cervical

CMV: Citomegalovirus

CV: Carga viral

HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesion): Lesión intraepitelial de alto grado

IQ: Intervención quirúrgica

ITS: Infección de transmisión sexual

LLETZ: *Large loop excision of the transformation zone*

LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesion): Lesión intraepitelial de bajo grado

NILM (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy): Negativo para lesión intraepitelial o neoplasia maligna

OMS: Organización mundial de la salud

PCR (Polymerase chain reaction): Reacción en cadena de la polimerasa

PNK: *Protein nucleotide kinasa*

RNC/LCR: Región no codificante

SDS: *Sodium dodecyl sulphate*

SEGO: Sociedad española de ginecología y obstetricia

SNP: *single nucleotide polymorphism* Polimorfismo de sitio único

STE: Tampón tris-clorhídrico -EDTA

TAE: Tampón tris-ácido acético -EDTA

UEC: Unión escamoso-columnar

VEB: Virus Epstein Barr

VHS: Virus Herpes simple

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLP: Virus like particules

VPH: Virus del papiloma humano

VPH-AR: Virus del papiloma humano de alto riesgo

VPH-BR: Virus del papiloma humano de bajo riesgo

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 20 |
| 1.1. Cáncer de cuello de útero | 22 |
| 1.1.1. Diagnóstico citológico y colposcópico | 23 |
| 1.1.2. Diagnóstico histológico | 25 |
| 1.1.3. Tratamiento..... | 26 |
| 1.2. VPH: características y patogenia..... | 27 |
| 1.2.1. Ciclo vital del VPH..... | 29 |
| 1.2.2. Desregulación del ciclo y desarrollo de cáncer | 30 |
| 1.2.3. Regresión de la lesión, latencia o aclaramiento | 31 |
| 1.3. Clasificación de los VPH | 32 |
| 1.4. Linajes y variantes del VPH | 36 |
| 1.5. Cofactores en la evolución de la neoplasia cervical..... | 37 |
| 1.6. Prevención del cáncer de cuello de útero..... | 41 |
| 1.6.1. Prevención primaria: Vacunas..... | 41 |
| 1.6.2. Prevención secundaria: Programas de cribado poblacional | 42 |
| 2. OBJETIVOS..... | 46 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 50 |
| 3.1. Población a estudio..... | 52 |
| 3.2. Técnicas de detección genómica | 52 |
| 3.2.1. Primer periodo: Técnicas manuales | 53 |
| 3.2.2. Segundo periodo: Técnica cobas® HPV Test de ROCHE Diagnostics | 56 |
| 3.3. Genotipado de las muestras por hibridación de oligonucleótidos | 57 |
| 3.3.1. Genotipado por secuenciación..... | 62 |
| 3.4. Cuantificación genómica..... | 63 |
| 3.5. Detección de la variante T350G del VPH 16 | 63 |
| 3.6. Secuenciación del gen E6 del VPH 16 y realización de la filogenia del mismo | 65 |
| 3.7. Detección de genoma de VPH integrado o episomal..... | 66 |
| 3.8. Detección genómica de los virus EBV, ADV y CMV | 67 |
| 3.9. Identificación de pacientes con infección por VIH..... | 68 |
| 3.10. Análisis estadístico..... | 69 |
| 3.11. ANEXO I..... | 70 |
| 4. RESULTADOS | 74 |
| 4.1. Análisis de la población a estudio y del grupo control..... | 76 |
| 4.2. Distribución de genotipos de VPH según la de edad | 77 |
| 4.3. Distribución de genotipos según la lesión epitelial y la evolución de las pacientes | 79 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.3.1. | Genotipo viral y lesión intraepitelial | 79 |
| 4.3.2. | Evolución de las lesiones intraepiteliales | 80 |
| 4.3.3. | Tiempo de progresión y aclaramiento de las lesiones y el virus | 82 |
| 4.3.4. | Infecciones mixtas | 84 |
| 4.4. | Influencia de otros virus en la evolución de las pacientes..... | 85 |
| 4.5. | Influencia de la carga viral en la evolución de las pacientes..... | 86 |
| 4.6. | Influencia de la integración del genoma del VPH 16 en la evolución de las pacientes..... | 89 |
| 4.7. | Linajes y polimorfismos del gen E6 del VPH16 | 91 |
| 4.8. | Influencia de la variante T350G del VPH16 en la evolución de las pacientes | 94 |
| 5. | DISCUSIÓN | 96 |
| 5.1. | Distribución de genotipos y su influencia en la evolución de la población estudiada y coinfeción | 100 |
| 5.2. | Cofactores virales y seguimiento de las pacientes | 105 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 110 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 114 |

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Correlación entre clasificación de lesiones citológicas e histológicas

Tabla 2. Genotipos de VPH y manifestación clínica que producen

Tabla 3. Linajes del VPH16

Tabla 4. Características de las vacunas actuales frente al VPH

Tabla 5. Cebadores del VPH para la región L1 y la β -globina humana

Tabla 6. Condiciones finales de la amplificación genómica del gen L1 y β -globina

Tabla 7. Secuencias de las sondas utilizadas en el genotipado del VPH

Tabla 8. Mezcla de reacción para la secuenciación

Tabla 9. Cebadores y sondas utilizados para detección de la variante

Tabla 10. Condiciones de la determinación de la variante T350G

Tabla 11. Cebadores utilizados para la secuenciación del gen E6

Tabla 12. Condiciones de la amplificación del gen E6

Tabla 13. Relación E2/E6 y estado del genoma VPH16

Tabla 14. Cebadores y sondas para determinación del estado del genoma del VPH16

Tabla 15. Condiciones de la amplificación del estado del genoma del VPH16

Tabla 16. Cebadores y sondas para las PCR a tiempo real

Tabla 17. Condiciones de la amplificación de EBV, CMV y ADV

Tabla 18. Características generales de la población

Tabla 19. Distribución de las lesiones intraepiteliales en función de la edad

Tabla 20. Distribución de genotipos detectados en función de la edad

Tabla 21. Distribución de genotipos de las distintas familias

Tabla 22. Distribución genotipos en relación a la lesión epitelial y edad

Tabla 23. Distribución de genotipos en relación con la edad y la evolución de la lesión epitelial

Tabla 24. Evolución de las pacientes según la lesión al inicio del estudio

Tabla 25. Tiempo de regresión de la lesión y de eliminación del VPH en las pacientes que evolucionan BIEN (meses)

Tabla 26. Distribución de genotipos en relación con la mala evolución de las pacientes

Tabla 27. Tiempo de aclaramiento del VPH en meses tras la intervención quirúrgica

Tabla 28. Distribución de genotipos en las infecciones mixtas (Edad/años)

Tabla 29. Características de las pacientes VIH positivas

Tabla 30. Relación entre la lesión y la carga viral

Tabla 31. Evolución de la carga viral en las pacientes infectadas por VPH 16 que resuelven la lesión

Tabla 32. Evolución de la carga viral en las pacientes que necesitan una intervención para resolver la lesión

Tabla 33: Resumen de la evolución de la carga viral en las pacientes con VPH 16

Tabla 34. Relación de la integración y la evolución de la lesión epitelial

Tabla 35: Distribución del estado del genoma del VPH 16 según la lesión

Tabla 36. Polimorfismos de los VPH 16 en el gen E6 según la evolución

Tabla 37. Distribución de la variante T350G según la lesión intraepitelial

Tabla 38. Relación de la variante y la evolución de la lesión epitelial

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Imágenes de la citología convencional A (10X), C (40X) y en base líquida B (40X), D (40X).
- Figura 2.** Imágenes de las lesiones citológicas y colposcópicas de los distintos estadios de la infección por VPH
- Figura 3.** Esquema del procedimiento de conización
- Figura 4.** Estructura del genoma del VPH
- Figura 5.** Imagen al microscopio electrónico del VPH
- Figura 6.** Actuación de las proteínas del HPV en la célula hospedadora.
- Figura 7.** Esquema de ciclo vital del VPH y expresión de sus proteínas
- Figura 8.** Desarrollo de lesiones de alto grado y expresión de genes en cada etapa
- Figura 9.** Esquema de regresión, latencia y reactivación tras una infección por el VPH
- Figura 10.** Relación evolutiva entre los distintos VPH
- Figura 11.** Relación evolutiva entre los Alfapapilomavirus
- Figura 12.** Prevalencia de los distintos genotipos de VPH en los distintos grados de lesiones precancerosas
- Figura 13.** Algoritmo de seguimiento en mujeres menores (A) y mayores de 35 años (B) en Asturias
- Figura 14.** Gel de agarosa con fragmento L1 del VPH (200 pb)
- Figura 15.** Sistema cobas®4800 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, California)
- Figura 16:** Membrana de revelado de genotipado con P³²
- Figura 17:** Secuencia del gen E6 obtenida mediante secuenciación.
- Figura 18.** Diagrama de resultados de la técnica de discriminación alélica para la detección de la variante T350G
- Figura 19.** Termociclador de amplificación a tiempo real y visualización de resultados
- Figura 20.** Distribución de las lesiones en función de la edad (en porcentaje)
- Figura 21.** Distribución de los genotipos de VPH en función de la edad
- Figura 22.** Distribución de los genotipos de VPH dentro de las distintas familias
- Figura 23.** Distribución de los genotipos en función de la edad y evolución de las pacientes
- Figura 24.** Evolución de las pacientes según la lesión.
- Figura 25.** Grafico del tiempo en meses de la regresión de las lesiones y del virus
- Figura 26.** Estado del genoma del VPH 16 según grado de la lesión donde se detecta.
- Figura 27.** Árbol filogenético de las muestras secuenciadas y secuencias patrón de cada linaje.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de cuello de útero

El cáncer de cuello de útero es el cuarto más común entre las mujeres, con una incidencia de 10,6%. Su distribución no es uniforme, teniendo tasas de incidencia más altas en países en vías de desarrollo. En África subsahariana la mortalidad llega hasta el 22,3%. En España, es la décima causa de cáncer entre las mujeres y la segunda entre las edades de 15 a los 44 años, siendo la tercera causa de muerte en estas últimas. En cifras, España tiene 20 millones de mujeres en riesgo de padecer un cáncer de cuello de útero, se diagnostican 2511 casos al año y 848 mujeres mueren cada año debido a esta patología (Forman, 2012).

La infección por el VPH es la infección de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial (Ferlay et al., 2015) y es una condición necesaria pero insuficiente para que se produzca un cáncer de cuello de útero, detectándose este virus en casi la totalidad de los mismos y hasta en el 80% de las lesiones preneoplásicas (CIN III). La infección por este virus puede eliminarse en menos de dos años, siendo una condición indispensable para el desarrollo de cáncer, la persistencia del ADN del VPH en la célula infectada (Moscicki et al, 2006).

El endocérnix (porción fibromuscular que conecta el útero con la vagina) está rodeado por un epitelio columnar formado por una sola capa de células. Este epitelio no forma una superficie lisa en el canal cervical sino que se invagina dando lugar a la formación de criptas endocervicales (a veces llamadas glándulas endocervicales). El ectocérnix (parte distal que rodea al orificio cervical externo) está cubierto por un epitelio escamoso estratificado rosado formado por múltiples capas de células localizadas sobre el estroma. La unión escamoso-columnar (UEC) es la unión entre las células glandulares columnares del canal endocervical y las células escamosas del ectocérnix. Localizada en la UEC se encuentra la zona de transformación donde se reemplaza de forma fisiológica el epitelio columnar por un nuevo epitelio escamoso, esta zona es de gran importancia en la infección por VPH ya que se piensa que es ahí donde se van a originar los cánceres. Al proceso de reemplazamiento se le denomina metaplasia escamosa y es un proceso irreversible. El epitelio metaplásico inmaduro puede evolucionar de dos modos: en la gran mayoría de las mujeres, se convierte en epitelio metaplásico escamoso maduro; y en la minoría, puede evolucionar a epitelio atípico displásico (Sellors et al, 2003).

Algunos tipos de papillomavirus humanos (VPH) pueden infectar persistentemente las células metaplásicas basales inmaduras y transformarlas en células atípicas con anomalías nucleares y citoplasmáticas. La proliferación y la expansión de estas células pueden conducir a

la formación de un epitelio displásico que, a su vez, puede volver a su estado normal, persistir como displasia (también denominada neoplasia intraepitelial cervical o CIN) o evolucionar a cáncer invasivo al cabo de varios años (Bosch et al, 2013).

Aproximadamente, un 80-90% de los cánceres cervicales, son carcinomas de células escamosas y un 10-20% son adenocarcinomas (carcinoma de glándulas endocervicales), aunque el porcentaje de estos últimos se ha incrementado en los últimos años (Forman et al, 2012). En sus estadios tempranos, el cáncer de cérvix puede ser asintomático, pero en las fases tardías puede presentarse sangrado vaginal anormal, descarga, dolor pélvico o dolor durante las relaciones sexuales (www.seom.org)

1.1.1. Diagnóstico citológico y colposcópico

El diagnóstico citológico se realiza mediante el examen microscópico de las células escamosas obtenidas con una espátula de madera o por cepillado de la zona endocervical, tras ser fijadas y teñidas con la técnica de Papanicolaou. La presencia de células vacuoladas con núcleos agrandados hiper cromáticos denominadas coilocitos es patognomónico de infección productiva por VPH (figura 1). Las consecuencias de la infección persistente se reflejan en cambios nucleares de severidad creciente, formas mitóticas y acúmulos de células. La sensibilidad de esta técnica es de un 50% y tiene gran variabilidad interobservador (Boulet, 2008).

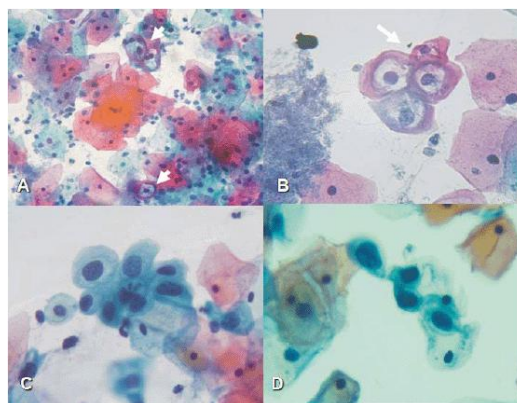


Figura 1. Imágenes de la citología convencional A (10X), C (40X) y en base líquida B (40X), D (40X). Caso 1. Lesión Intraepitelial Escamosa de bajo grado/infección por virus papiloma humano (LSIL/HPV): coilocitos (flecha). Caso 2. Lesión Intraepitelial Escamosa de alto grado (HSIL): células metaplásicas discarióticas. Tomado de: Toro de Méndez, 2011.

Las observaciones se clasifican según la nomenclatura Bethesda 2001 (Solomon et al. 2002) (Tabla 1):

- ❖ Negativo para lesión intraepitelial o neoplasia maligna (NILM).
- ❖ Anomalías de células epiteliales escamosas:
 - ✓ Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US).
 - ✓ Células escamosas atípicas, no puede descartarse HSIL (ASC-H).
 - ✓ Lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL), cuando se observan células con núcleos agrandados irregulares y más marcados de lo normal.
 - ✓ Lesión intraepitelial de alto grado (HSIL), cuando se observan células inmaduras, células pequeñas en láminas y agrupamientos sincitiales y con bordes citoplasmáticos diferenciados.
 - ✓ Carcinoma de células escamosas.
- ❖ Anomalías de células epiteliales glandulares:
 - ✓ Células glandulares atípicas (AGC) (endocervicales, endometriales o no especificadas).
 - ✓ Adenocarcinoma endocervical in situ (AIS).
 - ✓ Adenocarcinoma (AC).
- ❖ Otros: Hallazgos no neoplásicos (regeneración, atrofia, cambios por radiación, por DIU,...)

Clínicamente las lesiones precancerosas solo pueden visualizarse con la ayuda del colposcopio tras la aplicación de solución salina, ácido acético diluido al 3-5% y la solución yodoyodurada de lugol (prueba de Schiller) en pasos sucesivos. Esta técnica permite visualizar con detalle las regiones anómalas del cuello uterino y delimitar las áreas con lesión (figura 2).

Los hallazgos colposcópicos se anotan según la nomenclatura de la Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia (Quaas et al, 2013).

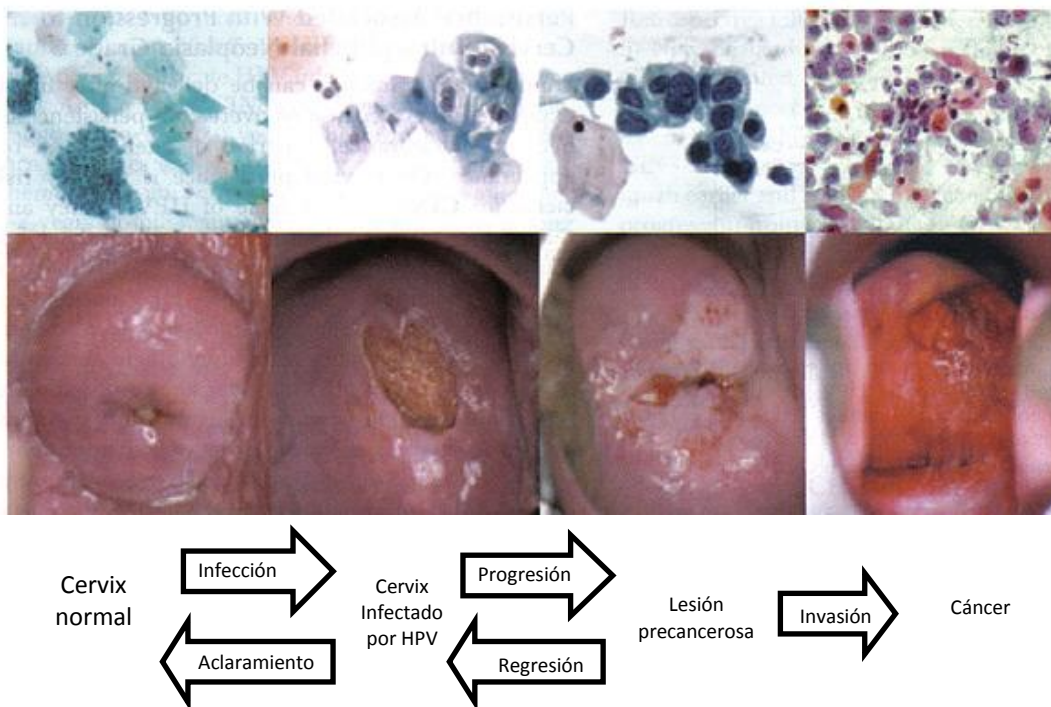


Figura 2. Imágenes de las lesiones citológicas y colposcópicas de los distintos estadios de la infección por VPH

1.1.2. Diagnóstico histológico

La existencia de neoplasia puede sospecharse por el resultado del examen colposcópico o citológico, pero el diagnóstico definitivo debe establecerse siempre por el examen histológico de una biopsia cervical dirigida según visualización colposcópica. Esto permite valorar si una muestra de tejido cervical presenta displasia (figura 2).

- ✓ CIN I: existe buena maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas. Las células indiferenciadas se encuentran en las capas epiteliales más profundas. Es muy poco probable que progrese a cáncer.
- ✓ CIN II: las células displásicas se restringen a la mitad o dos tercios inferiores del epitelio, con anomalías nucleares más marcadas que en el CIN I.
- ✓ CIN III-CIS células anormales en todas las capas del epitelio escamoso. Lesión escamosa pre-neoplásica que puede progresar a cáncer si no se trata.
- ✓ AIS: proliferación anormal no invasiva de células glandulares, que se cree que precede a la aparición del adenocarcinoma. Lesión glandular pre-neoplásica.
- ✓ CES: neoplasia de células escamosas, con infiltración de tejidos circundantes.

- ✓ AC: neoplasia de células glandulares (adenocarcinoma), con infiltración de tejidos circundantes.

La correlación entre la citología y la histología se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Correlación entre clasificación de lesiones citológicas e histológicas

| Bethesda 2001 | Clasificación histológica |
|--------------------|---------------------------|
| NILM | Negativo |
| ASC-US/AGUS/ASC-H | Atipia escamosa |
| LSIL | CIN I |
| HSIL | CIN II/CIN III-CIS |
| Carcinoma invasivo | Carcinoma invasivo |

1.1.3. Tratamiento

El tratamiento de las lesiones no invasivas se realiza generalmente por técnicas destructivas o técnicas de exéresis de la zona de transformación:

- ❖ Técnicas destructivas: utilizadas exclusivamente en caso de CIN I
 - ✓ Criocoagulación
 - ✓ Vaporización con láser
 - ✓ Cauterización fría
- ❖ Técnicas de exéresis (conización)(figura 3):
 - ✓ Asa electroquirúrgica (LLETZ) que emplea corriente eléctrica de radiofrecuencia para cortar tejidos por vaporización o coagulación por deshidratación
 - ✓ Bisturí, láser, electrocauterización diatérmica radical

El tratamiento del cáncer de cérvix invasivo puede incluir cirugía, radioterapia o una combinación de ambas. El tratamiento y pronóstico dependen del estadio. Varios estudios clínicos han demostrado una tasa de supervivencia a 5 años alta (>75%) para el estadio I, aunque declina rápidamente conforme avanzan los estadios (<10% en el estadio IV). (Biblio)

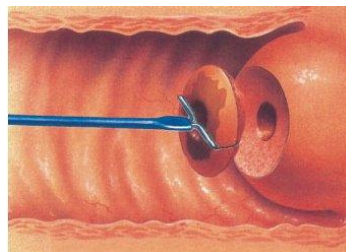


Figura 3. Esquema del procedimiento de conización.
Tomado de: centrodedisplasiasycancereologia.com

1.2. VPH: características y patogenia

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, son virus que infectan generalmente a la piel y a las mucosas. Son virus pequeños, de aproximadamente 50-55 nm de diámetro, sin envuelta y con una cápside icosaédrica. Su genoma está constituido por un ADN circular de doble cadena covalentemente cerrado, de un tamaño de 7500-8000 pb. Este genoma se divide en 3 regiones:

- ✓ E: Expresión temprana que codifica proteínas enzimáticas (E1-E7) y supone el 50% del genoma
- ✓ L: Expresión tardía que codifica para 2 proteínas estructurales (L1 y L2) que conforman la cápside del virus (40%)
- ✓ RNC/LCR: Región reguladora no codificante (10%)

La estructura del genoma del VPH se muestra en la figura 4.

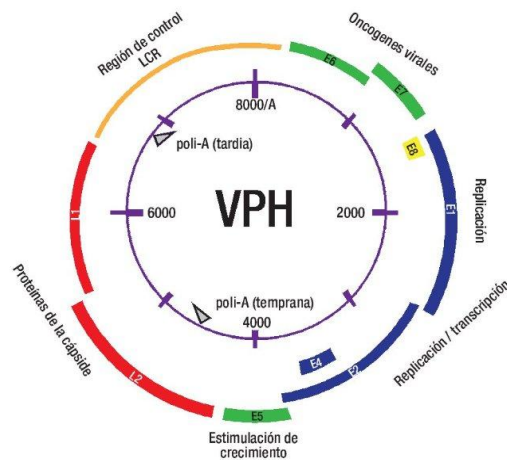


Figura 4. Estructura del genoma del VPH. Tomado de: Zaldívar Lelo de Larrea, G., Martín Molina, F., Sosa Ferreyra, C. F., Ávila Morales, J., Lloret Rivas, M., Román Lara, M., & Vega Malagón, G. (2012). Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 77(4), 315-321.

La cápside contiene 360 copias de la proteína mayor de la cápside (L1) y unas 12 copias de la proteína menor de la cápside (L2), organizadas en una cubierta icosaédrica de 72 capsómeros. La proteína L1 tiene un tamaño aproximado de 55 kD con la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en partículas tipo viral (VLP), que presentan una superficie exterior indistinguible del virión nativo (figura 5). Estas VLPs son inmunógenos

potentes, probablemente debido a la capacidad innata de las células B para reconocer sus epitopos de superficie. Este descubrimiento supuso el fundamento del desarrollo de las vacunas actuales (Markowitz et al, 2012).

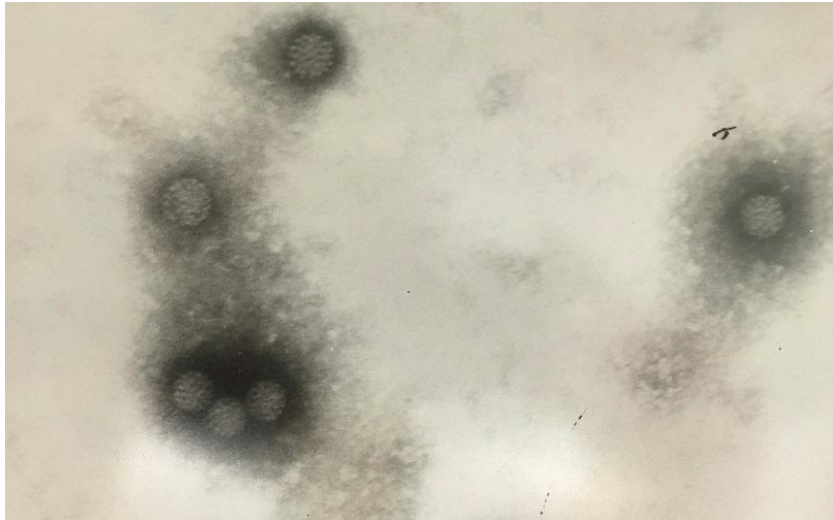


Figura 5. Imagen al microscopio electrónico del VPH. Tomado de la Unidad de Virología. HUCA

Las proteínas E1 y E2 están implicadas en la replicación vírica, formando un complejo de activación transcripcional del genoma vírico. La proteína E2 actúa como regulador de la transcripción y represor de la expresión de los oncogenes E6 y E7. Cuando se produce la integración del genoma vírico en el de la célula huésped se va a realizar fragmentando el gen E2 lo que provoca la transactivación sin control del promotor E6/E7.

La proteína E5 se encuentra unida a la membrana y participa en el proceso de tumorigénesis, interactuando con receptores de crecimiento celular e interfiriendo el proceso de endocitosis.

La proteína E6 se fija al ADN bicatenario y por diversos mecanismos (unión a p53, factores de transcripción como CBP/p300, unión a la proteína *c-Myc*) colabora en la transformación celular.

La proteína E7 tendría una función similar que el E6 aunque con otros patrones de actuación (figura 6). Estudios en ratones transgénicos han permitido conocer el efecto de estos dos oncogenes por separado: el gen E7 produce tumores benignos mientras que E6 provoca la transformación maligna de la célula.

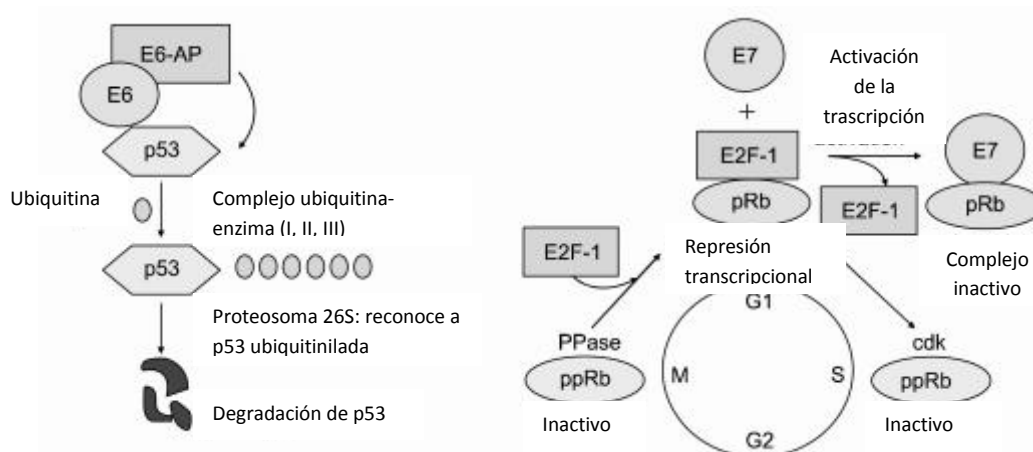


Figura 6. Actuación de las proteínas del HPV en la célula hospedadora. Tomado y adaptado de: Yim et al, 2005

1.2.1. Ciclo vital del VPH

Para que el VPH desarrolle su ciclo vital debe infectar las células de la lámina basal del epitelio endocervical e interactuar con su receptor. Cambios estructurales en la cápsida del virión van a permitir que la proteína L2 se una a un segundo receptor ($\alpha 6$ -integrina) para su posterior internalización en el queratinocito basal. Los viriones entran en la célula por vía endosómica y la proteína L2 es la encargada de transportar el genoma viral hasta el núcleo de la célula, mientras que la proteína L1 va a ser degradada por vía lisosomal.

En muchos casos, la entrada del virus requiere de lesiones en el epitelio que permitan a los viriones llegar hasta la lámina basal del mismo. Además se ha visto, que estas lesiones favorecen la división de estas células para reparar el epitelio, lo que contribuye a la infección del VPH en células mitóticamente activas, lo que favorece el desarrollo de lesiones. Por otro lado la zona de transformación del cuello uterino tiene una particular susceptibilidad a la progresión a cáncer debido a su accesibilidad y proliferación de las capas basales hacia un epitelio metaplásico durante la pubertad y al comienzo de la actividad sexual, cuando comienza la exposición al VPH.

Para la fase de amplificación del genoma viral se ha visto que son imprescindibles las proteínas virales E1 y E2. La proteína E2 durante la fase de replicación viral recluta a E1 (helicasa viral) que es distinta de las helicasas celulares lo que permite una desconexión de la replicación viral y la celular. Respecto a las proteínas E6 y E7, en el caso de los VPH-AR, estimulan la división celular de las capas de células parabasales.

Esta proliferación celular de las capas basales y parabasales infectadas por el VPH facilita la expansión del tamaño de la lesión (figura 7).

Además de E1 y E2, se ha visto que E4 y E5 contribuyen directamente en el éxito de la amplificación del ADN viral. E5 es una proteína transmembrana que se cree tiene capacidad de formar poros en la misma y por tanto interferir con la apoptosis y en el tráfico intracelular de vesículas endosómicas, y favorecer la replicación viral. E4 es una proteína que se acumula en células que están soportando gran cantidad de síntesis viral y se ha visto que está implicada en la liberación de viriones y transmisión del mismo.

El ciclo vital del VPH se completa con la expresión de L2 y de L1. La proteína L2 se va a dirigir a regiones de replicación vía E2 antes de la expresión de L1 y su ensamblaje. La maduración de los viriones ocurre en queratinocitos superficiales, que tienen un ambiente oxidativo que favorece la formación de uniones disulfato entre las proteínas L1 favoreciendo la formación de viriones estables. Una vez formado el virión con sus 72 capsómeros, el incremento de la proteína E4 en la célula, se cree que estimula la liberación de los viriones y la infección de las capas superficiales del epitelio.

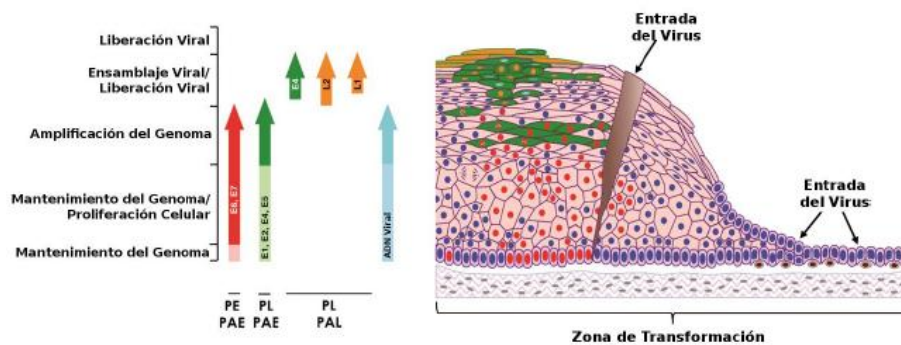


Figura 7. Esquema de ciclo vital del VPH y expresión de sus proteínas. Tomado y modificado de Doorbar, 2012.

1.2.2. Desregulación del ciclo y desarrollo de cáncer

En la enfermedad cervical los niveles de expresión de los oncogenes E6 y E7 aumentan desde las lesiones de bajo grado (CIN I) hasta las de alto grado (CIN III). Las lesiones CIN I mantienen la capacidad de mantener el ciclo completo del virus con liberación de viriones. El aumento de la expresión de E6 y E7 en las infecciones por HPV de alto riesgo lleva al desarrollo de lesiones de alto grado CIN II o superior y favorece la acumulación de mutaciones en el genoma celular favoreciendo la progresión a cáncer. La desregulación viral vista en las lesiones

de alto grado se ve facilitada por la integración del genoma viral en el celular que favorece la expresión de E6 y E7 (figura 8) (Doobar et al, 2012).

Por otro lado, la integración del genoma viral en la célula va a provocar la ruptura del gen E2 que actúa como regulador de la expresión de E6 y E7, favoreciendo la expresión incontrolada de los mismos. En ambos casos los cambios que favorecen el paso de CIN III a cáncer son acumulaciones de mutaciones a lo largo del tiempo asociados a la sobreexpresión de E6 y E7.

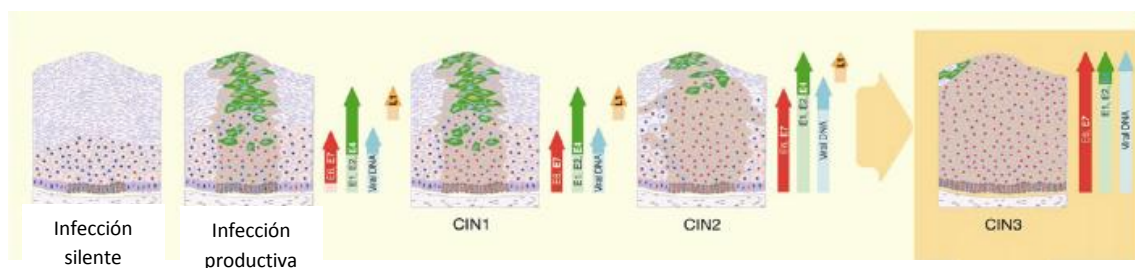


Figura 8. Desarrollo de lesiones de alto grado y expresión de genes en cada etapa. Tomado y modificado de: Doorbar, 2012.

1.2.3. Regresión de la lesión, latencia o aclaramiento

A pesar de que la infección por VPH-AR es común (hasta el 80% de las mujeres en muchos casos), el desarrollo de cáncer es raro (<1%). El VPH 16 tiene un tiempo de persistencia más largo que el resto de los genotipos de alto riesgo, lo que le hace tener un mayor carácter oncogénico (De Sanjosé et al, 2006). Se piensa que el tropismo de ciertos tipos de VPH como el 18 o el 45 hacia células que tienen una diferenciación glandular los hacen ser las principales causas de adenocarcinomas (Guan et al., 2012).

En general, la infección por VPH en mujeres jóvenes sexualmente activas (25 años) es frecuente y se aclara en el 80% de los casos por una respuesta inmune celular efectiva, mediada por una respuesta del tipo Th1 CD4+ (Goodman et al, 2008) El VPH tiene varios sistemas de evasión del sistema inmune ya que su ciclo vital es exclusivamente epitelial y no hay fases de viremia, no hay destrucción celular y la replicación viral y la liberación de viriones no está acompañada de procesos inflamatorios. Además las células productivas de viriones que expresan gran cantidad de antígenos virales se encuentran en la superficie del epitelio lejos de las células inmunes, que por otra parte, en la zona del cérvix son escasas. Aunque estos mecanismos favorecen la persistencia de la infección, en la mayoría de los casos las lesiones se

resuelven. La eliminación de la infección requiere la presentación de antígenos virales a células dendríticas y la infiltración de linfocitos T en el sitio de la infección (figura 9).

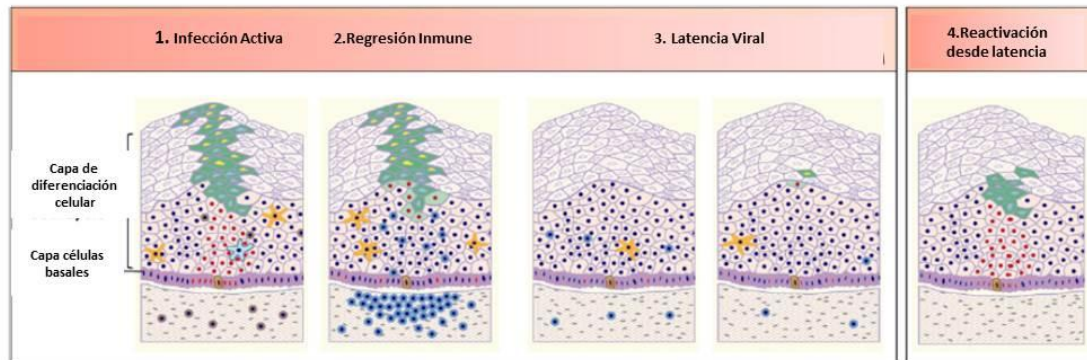


Figura 9. Esquema de regresión, latencia y reactivación tras una infección por el VPH. Tomado y modificado de Doorbar, 2012.

Las lesiones intraepiteliales (LSIL o HSIL) pueden regresar. La regresión de estas lesiones no ocurre por una apoptosis masiva de las células infectadas, sino por un reemplazamiento de las células infectadas por un epitelio aparentemente no infectado originado a partir de las células basales. Estas células pueden seguir conteniendo genoma viral sin expresión del mismo, lo que sugiere que el virus puede reactivarse en situaciones de inmunosupresión o de cambios hormonales. Estudios recientes han demostrado la presencia de cargas virales bajas en infecciones asintomáticas y situaciones de latencia. Se cree que la reactivación se produce en los sitios donde hubo una infección previa. Se ha visto que en pacientes con cáncer cervical no tienen linfocitos T frente al VPH causante del mismo, lo que sugiere que la persistencia más el fallo de la respuesta inmunitaria provoca el desarrollo del cáncer (Goodman et al, 2008; Rositch et al, 2013)

1.3. Clasificación de los VPH

Basándose en el análisis del su genoma, los papilomavirus humanos se dividen en 5 géneros mayores: *Alfapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mu papillomavirus* y *Nu papillomavirus* (figura 10). Estos géneros poseen distintas características tanto en su ciclo vital como en las enfermedades que causan. En los últimos años se ha demostrado que los VPH pertenecientes a los géneros Beta y Gamma causan infecciones asintomáticas en individuos inmunocompetentes, sin embargo en el género Alfa se encuentran los VPH que causan enfermedad en humanos.

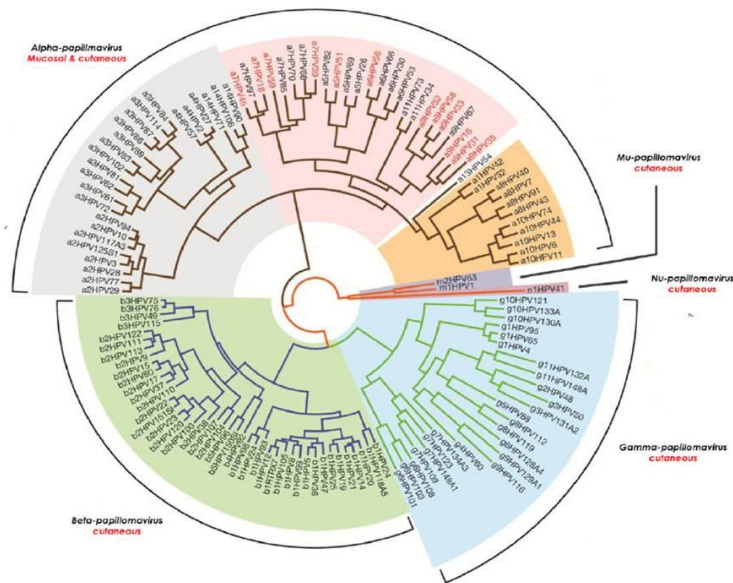


Figura 10. Relación evolutiva entre los distintos VPH. Tomada de Doobar, 2005.

El género *Alfapapillomavirus* está dividido a su vez en VPH cutáneos y mucosos, y posteriormente divididos en VPH de alto y bajo riesgo según su capacidad oncogénica (figura 11). El grupo de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) lo comprenden los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59. El genotipo 68 se considera de probable riesgo oncogénico. Los grupos de bajo riesgo (VPH-BR) ocasionan verrugas y condilomas genitales y otras patologías benignas como la papilomatosis respiratoria recurrente, estas últimas patologías están producidas en la mayoría de los casos por los VPH 6 y 11 (Forman et al, 2012).

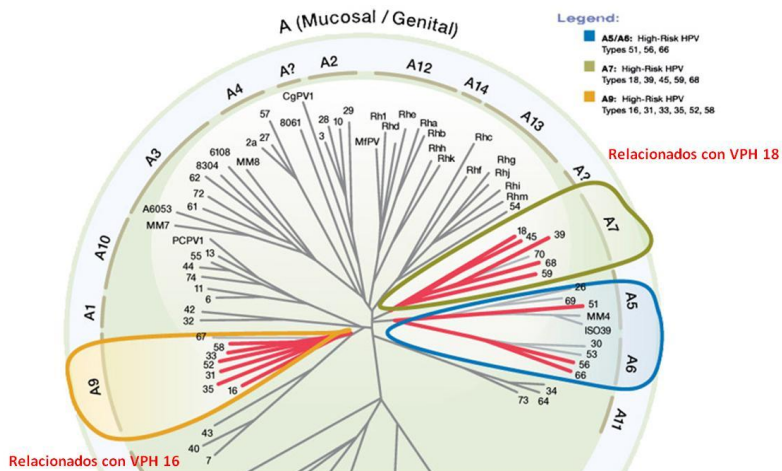


Figura 11. Relación evolutiva entre los Alfapapillomavirus.

La asociación de los distintos genotipos con sus patologías se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Genotipos de VPH y manifestación clínica que producen

| MANIFESTACIÓN CLÍNICA | | GENOTIPOS DE VPH ASOCIADOS |
|--|--|--|
| | Verrugas comunes | VPH 2, 4, 7; ocasionalmente VPH 75–77 |
| | Verrugas planas lisas | VPH 3, 10, ocasionalmente VPH 26–29 y 41 |
| | Verrugas plantares | VPH 1, 2, 4 |
| <i>Epidermodisplasia verruciformis</i> | Verrugas planas | VPH 3, 10 |
| | Placas similares a pitiriasis | VPH 5, 8; menos comúnmente 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21–25, 36–39, 47, 49 |
| | Carcinoma de células escamosas de piel expuesta al sol | VPH 5, 8, menos comúnmente 14, 17, 20 y 47 |
| Verrugas anogenitales | Verrugas externas | VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89 |
| | Tumor Buschke–Lowenstein | VPH 6 |
| | Papilosis Bowenoide | VPH 16, 55 |
| Neoplasia y preneoplasia anogenital | Grupo 1: Carcinógeno para humanos | VPH 16,18, 31, 33, 45, 51, 52 |
| | Grupo 2A: Probable carcinógeno para humanos | VPH 68 |
| | Grupo 2B: Posibles carcinógeno para humanos | VPH 26, 53, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 73, 82 |
| Lesiones orales | Papilomas orales | VPH 2, 6, 7, 11, 16, 18, 32, 57 |
| | Papilomas laríngeos | VPH 6,11 |
| | Hiperplasia focal (enfermedad de Heck's) | VPH 13, 32 |
| | Carcinoma orofaríngeo | VPH 16 predominantemente,18 |

Con respecto a la participación de los distintos tipos de VPH en el cáncer de cuello de útero en España así como en las distintas lesiones precancerosas se muestran en la figura 12.

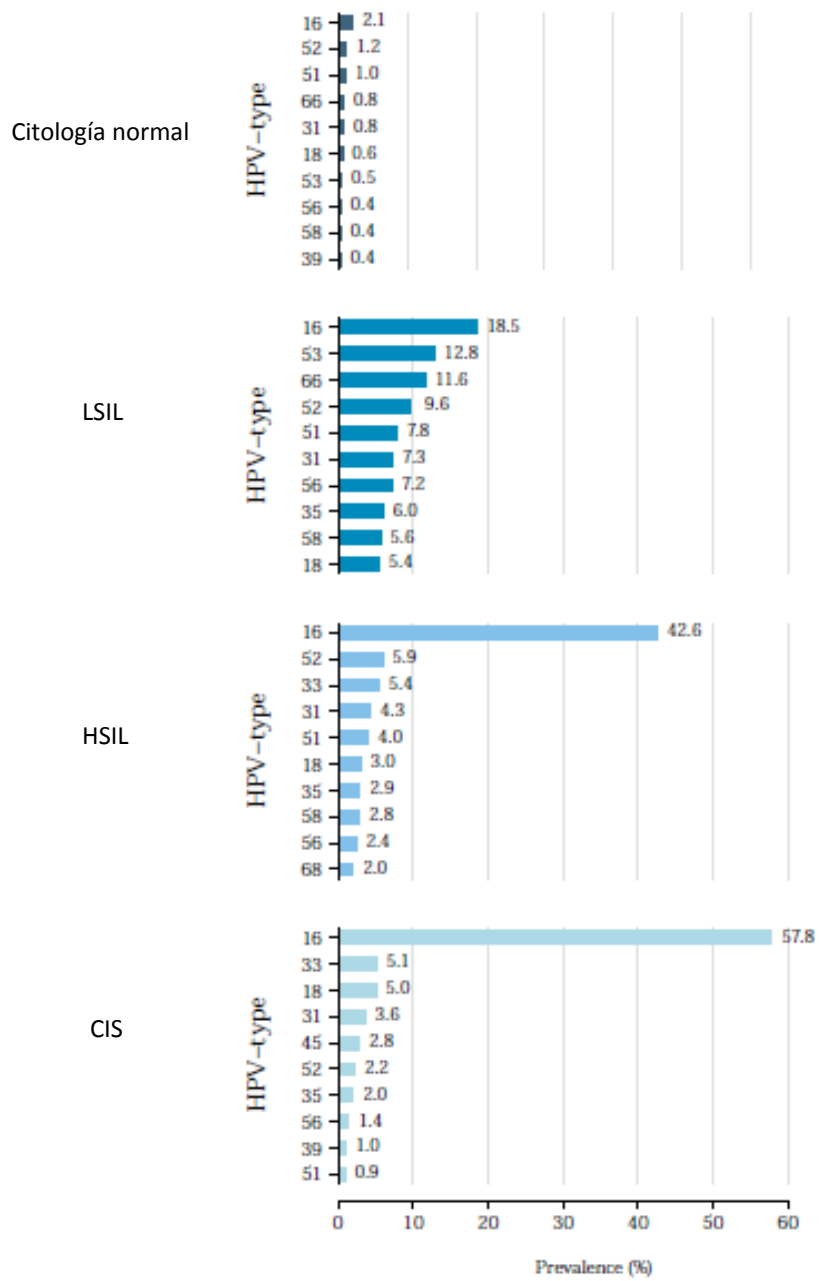


Figura 12. Prevalencia de los distintos genotipos de VPH en los distintos grados de lesiones precancerosas en España.

1.4. Linajes y variantes del VPH

Los VPH replican sus genomas utilizando la maquinaria enzimática del hospedador, asegurándose un alto grado de revisión de secuencias en la lectura con bajos porcentajes de mutaciones. Con la evolución de sus genomas, mutaciones, inserciones/delecciones, y reagrupamientos han sido seleccionados y/o fijados en tipos concretos, perdiéndose el genoma intermediario. Dado que la recombinación es un evento extremadamente raro en estos virus, las múltiples mutaciones/variaciones que han ocurrido en los genomas de VPH están relacionados con la acumulación secuencial de cambios genéticos. Este proceso de especiación se ha denominado fijación de linaje. Es decir, grupos de mutaciones puntuales (SNPs) (polimorfismos de un solo nucleótido) y/o inserciones/delecciones que tienden a fijarse dentro de linajes virales. A lo largo del tiempo, la cantidad de estas variaciones definitorias de linaje se incrementa llevando eventualmente a la especiación (genotipos) (Burk et al, 2013).

Se ha definido que los genotipos que pertenecen a diferentes géneros de papilomavirus tienen menos de un 60% de similitud en su secuencia de nucleótidos de la proteína de la cápside L1. Cada genotipo presenta menos de un 90% de similitud con cualquier otro genotipo (Burk et al, 2013).

Los parámetros para clasificar aislados relacionados de un determinado genotipo se basan actualmente en el análisis de una gran base de datos con los genomas completos de aislamientos de VPH de la especie $\alpha 9$ (VPH 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67). La comparación de estos genomas utilizando el método *pairwise* (por parejas) reveló al menos 3 categorías discretas de relación sugiriendo una taxonomía natural (linajes). El examen previo de filogenias para cada tipo $\alpha 9$ combinado con un umbral aproximado del 1% de diferencias en el genoma completo fue utilizado para definir linajes mayores. Las diferencias entre genomas en el rango del 0,5-1% se designaron como sublinajes. El análisis filogenético confirmó la descripción de 4 linajes mayores de VPH 16 y 9 sublinajes (tabla 3)(Burk et al, 2013; Harari et al, 2013; Chen et al, 2013).

Si sólo consideramos los VPH-AR y la contribución de una determinante variante viral en el desarrollo de cáncer, estas pueden influir a 4 niveles: adquisición de la infección (infectividad), tiempo de persistencia, desarrollo de lesiones precancerosas e invasión de células infectadas por el virus.

La mayoría de los estudios concluyen que los linajes no Europeos (B/C/D) son más agresivos que los Europeos(A).

Tabla 3. Linajes del VPH16

| LINAJE | SUBLINAJE | GENOMA DE REFERENCIA | DENOMINACIONES PREVIAS |
|--------|-----------|----------------------|--------------------------|
| A | A1 | Ref | Europeo (E) |
| | A2 | W0122 | Europeo (E) |
| | A3 | AS411 | Europeo (E) |
| | A4 | W0724 | Asiático (As) |
| B | B1 | W0236 | Africano 1a (Afr1a) |
| | B2 | Z109 | Africano 1b (Afr1b) |
| C | | R460 | Africano 2a (Afr2a) |
| D | D1 | QV00512 | Norte Americano (NA)1 |
| | D2 | QV15321 | Asiático-Americano (AA)2 |
| | D3 | QV00995 | Asiático-Americano (AA)1 |

Los linajes B/C/D comparados con el A incrementan de 2 a 4 veces el riesgo de desarrollar cáncer. Dentro del linaje A, el A4 aumenta el riesgo de desarrollar una lesión de alto grado hasta 10 veces sobre el resto de sublinajes (Zhang et al, 2015). También se ha establecido la relación entre el linaje D (VPH 16 AA) con el desarrollo de adenocarcinoma (Zhang et al, 2015).

Por otra parte, en el linaje A la presencia de la variante VPH 16 EUR-350G vs 350T aumenta hasta dos veces el riesgo de persistencia de la infección (Zhang et al, 2015).

1.5. Cofactores en la evolución de la neoplasia cervical

En la actualidad, se conoce que la infección por VPH es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo del cáncer de cuello uterino. El hecho de que sólo una minoría de infecciones persistentes por VPH progrese a cáncer, señala la coexistencia de otros cofactores que deben estar presentes para que se produzca la transformación.

Por lo tanto los cofactores de progresión que favorecen la persistencia y la infección por VPH, se pueden clasificar en:

➤ **Cofactores medioambientales:**

- ❖ *Paridad:* la precocidad en el inicio de las relaciones sexuales y la promiscuidad sexual aumenta el riesgo de cáncer de cuello de útero. Probablemente, en relación con la mayor frecuencia de infecciones (Wang et al, 2009; Rosa et al, 2009; Castelsague et al, 2006).
- ❖ *Edad:* la infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas entre 18 y 30 años, después de los 30 decrece la prevalencia. El cáncer cervical es más común en mujeres mayores de 35 años, lo que sugiere infección a edad temprana y progresión lenta a cáncer (Wang et al, 2009; Brinton et al, 1989; Kahn et al, 2002).
- ❖ *Inmunosupresión:* las pacientes inmunodeprimidas tiene un riesgo aumentado de cáncer genital respecto a las mujeres sanas. Se sabe que la respuesta inmunológica deficiente al VPH predispone a la persistencia de la infección aunque se desconoce el mecanismo exacto (Federica et al, 2005; Palefsky et al, 2009).
- ❖ *Infecciones asociadas:* las mujeres con coinfección por el VPH y otro agente de transmisión sexual especialmente con el virus del herpes genital tipo 2 o *Chlamydia trachomatis* parecen tener una mayor probabilidad de presentar cáncer de cuello uterino (Smith et al, 2002; Molano et al, 2003).
- ❖ *Tabaquismo:* las mujeres fumadoras poseen dos veces más riesgo de desarrollar CCU que las no fumadoras (La Vecchia et al, 1989; Rosa et al, 2009).
- ❖ *Anticoncepción:* diversos estudios documentan la relación entre el uso de anticonceptivos orales con el cáncer de cuello de útero sin resultados consistentes (Moreno et al, 2002).

➤ **Cofactores genéticos:**

Las variaciones genéticas individuales de los genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata, humoral y celular pueden influir en la persistencia de la infección por VPH y su progresión a cáncer (Wang et al, 2009).

➤ **Cofactores virales:**

El genotipo viral, y los linajes del VPH 16 han sido los primeros cofactores virales estudiados y se ha demostrado que el genotipo 16 es per se un factor de riesgo así como los linajes no europeos del resto de los factores virales de progresión a pesar de los muchos estudios que se han realizado no hay todavía unas conclusiones unánimemente aceptadas por todos los autores, estos son:

❖ **Carga viral**

Uno de los factores virales más estudiados en la actualidad para su uso como biomarcador de la infección del VPH es la carga viral. Numerosos estudios parecen haber demostrado la existencia de una correlación entre la carga viral encontrada en las muestras y la posterior evolución de las pacientes, sobre todo cuando se realizan determinaciones seriadas y no se toma como referencia una medida puntual.

Un estudio reciente observó que las cargas virales seriadas pueden seguir 5 distribuciones distintas y que éstas permiten predecir la progresión o regresión de la lesión según sigan un patrón u otro (Verhelst et al, 2016).

❖ **Variante VPH 16 EUR-350G**

Dentro de las mutaciones analizadas en diversos estudios de la región E6 del genoma del VPH 16, la presencia de la mutación T350G es el polimorfismo más frecuente (Zhang et al, 2015; Pande et al, 2008). Este cambio se traduce en un cambio aminoacídico en la proteína E6 (L83V). Este aminoácido está rodeado de otros altamente conservados S-L/V-Y-G, los cuales son idénticos en los tipos VPH-AR pero diferentes en los tipos de bajo riesgo VPH 6 y 11. Este hecho hace pensar que podría ser un sitio con capacidad de influir en la transformación de la proteína viral E6 en los VPH-AR.

❖ **Integración del genoma viral**

La integración del genoma del VPH en el DNA de la célula huésped representa un paso clave en el fenómeno de progresión en las lesiones, permitiendo ésta la continua sobreexpresión de los oncogenes E6/E7. Cuando el VPH infecta una célula epitelial, su genoma

puede permanecer de forma episomal, integrarse en el genoma celular, o tener ambas, siendo formas mixtas. Muchos autores proponen que la integración del genoma se produce en fases tempranas de la infección y que es lo que va a marcar una peor evolución de las lesiones (Vinokurova, 2008; Das, 2010). Sin embargo, otros autores no demuestran este hecho (Boulet et al, 2009; Cheung et al, 2006, Kulmala et al, 2006).

Recientemente, con el desarrollo de protocolos de amplificación genómica a tiempo real en los que se busca la amplificación de los genes E6 y E2 del VPH, se ha podido estudiar de forma fiable el estado físico (integrado o episomal) de estos virus y más concretamente en el caso del VPH 16 debido a su gran impacto en los carcinomas de cérvix (Andersson et al, 2005; Arias-Pulido et al, 2006; Fujii et al, 2005).

❖ **Coinfecciones**

El carcinoma invasivo de cérvix es uno de los tumores malignos más frecuentes del tracto genital femenino. En torno a su etiología ha surgido numerosa controversia, como los posibles agentes asociados al VPH para el desarrollo del carcinoma.

Entre dichos agentes se baraja el posible papel como cofactor de CMV, EBV y ADV en la oncogénesis. Numerosos autores, han estudiado la asociación VPH-EBV en el desarrollo o progresión de las lesiones preneoplásicas en cérvix (Afonso et al 2012; Szostek et al, 2009; Santos et al, 2009; Almeida et al 2004, Abudoukadeer et al 2015), sin embargo no se ha podido establecer una correlación estrecha entre la coinfección VPH-EBV, mientras que unos autores lo avalan (Kim et al, 2005; Szkaradkiewicz et al, 2004; Szostek et al, 2009, otros lo rechazan (Ammatuna et al, 2000, Afonso et al, 2012).

En otros trabajos se estudia el papel que pueden ejercer otros virus de la familia herpesviridae, como el CMV, valorando la posibilidad de que su presencia incremente el fenómeno de integración del VPH y por lo tanto la coinfección pueda contribuir en la progresión a carcinoma y comprobaron que llega a aumentar el riesgo hasta 6 veces (Szostek et al, 2009).

1.6. Prevención del cáncer de cuello de útero

1.6.1. Prevención primaria: Vacunas

Actualmente en Europa existen dos vacunas frente al VPH comercializadas: la tetravalente Gardasil® (Sanofi Pasteur MSD)/Silgard® (Merck Sharp & Dohme) que incluye los genotipos de alto riesgo 16 y 18 y de bajo riesgo 6 y 11, y la bivalente Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals) que sólo incluye los genotipos de alto riesgo 16 y 18. Ambas vacunas han demostrado amplios perfiles de seguridad y han demostrado en diversos ensayos clínicos su efectividad en la prevención del cáncer cervical, vulvar, vaginal, así como en la aparición de lesiones premalignas cervicales causados por los genotipos VPH 16 y 18. La vacuna tetravalente también ha demostrado proteger frente al cáncer anal y frente a las verrugas genitales.

La vacuna frente al VPH se ha desarrollado por técnicas de ingeniería genética que pueden utilizarse para expresar las proteínas estructurales L1 y, en menor grado, L2 del virus que se autoensamblan para formar cápsides virales vacías, (*"virus like particles"* VLP) que recuerdan los auténticos viriones (Christensen et al, 1994; Hagensee et al, 1994; Rose et al, 1994). Estas VLP expuestas al sistema inmune han demostrado su capacidad de inducir títulos elevados de anticuerpos.

Debido a que el tiempo hasta desarrollar un cáncer puede ser de varias décadas (Van de Velde N et al, 2012) el efecto de las vacunas se comprobará con el paso del tiempo. A pesar de esto, en países como Australia donde la cobertura vacunal es alta (cerca del 83%), se ha visto una reducción del 77% en la prevalencia de infecciones por VPH vacunales en mujeres jóvenes, así como un 92,6% en la reducción de las verrugas genitales. Además la incidencia de lesiones de alto grado (HSIL) en mujeres menores de 18 años descendió de un 0,85% en 2006 a un 0,22% en 2009. También se observó el efecto de la inmunidad de grupo, disminuyendo significativamente la presencia de verrugas genitales en los hombres jóvenes (Hartwig et al, 2015)

En vista del éxito de estas vacunas se están desarrollando otras nuevas. Actualmente está aprobada por la FDA (Food and Drugs Administration) y la EMA (European Medicines Agency), una vacuna de segunda generación, Gardasil®9 (Sanofi Pasteur MSD) que actúa frente

a los cuatro genotipos incluidos en la vacuna tetravalente y además los VPH 31, 33, 45, 52 y 58, otros genotipos de alto riesgo que sumados a los genotipos 16 y 18 causarían el 90% de todos lo cáncer de cérvix.

En la tabla 4 se pueden observar las principales características de las vacunas frente al VPH actualmente comercializadas, así como las de la nueva vacuna nonavalente.

Tabla 4. Características de las vacunas actuales frente al VPH

| | Cervarix® | Gardasil® | Gardasil 9® |
|----------------------------|---|---|--|
| Fabricante | GlaxoSmithKline | Merck | Merck |
| Tipos de VLP | 16/18 | 6/11/16/18 | 6/11/16/18/31/33/45/52/58 |
| Dosis de L1 | 20/20µg | 20/40/40/20 µg | 30/40/60/40/20/20/20/20 µg |
| Células productoras | Linea celular de insecto baculovirus recombinante | Saccharomyces cerevisae | Saccharomyces cerevisae |
| Adyuvante | 500 µg hidróxido de aluminio, 50 µg lípido A | 225µg de hidroxifosfato sulfato de aluminio | 0.5 mg de hidroxifosfato sulfato de aluminio |
| Calendario vacunal | 0, 1, 6 meses | 0, 2, 6 meses | |

La vacunación ha mostrado efectividad en la protección frente a la infección por VPH en niñas y adolescentes antes de comenzar las relaciones sexuales. Se ha estimado que las vacunas actualmente comercializadas cubren hasta el 70% de los cánceres de cuello de útero y se cree que la implementación de la nueva vacuna nonavalente protegerá frente al 90% de los VPH causantes de cáncer como se comentó anteriormente.

En las últimas recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se propone un régimen de 2 dosis de vacuna con un incremento en la flexibilidad del intervalo entre las mismas: un intervalo de 6 meses en niñas de entre 9 y 14 años, y en mujeres adultas, se recomienda un régimen de 3 dosis, aunque algunos países de la Unión Europea solo administran dos.

1.6.2. Prevención secundaria: Programas de cribado poblacional

La infección por el VPH causó en 2008, 610.000 casos de cáncer a nivel mundial, de estos la mayoría tuvieron lugar en países en vías de desarrollo dónde no tiene programas de cribado estandarizados, a pesar de esto, entorno a 120.000 casos tuvieron lugar en países desarrollados (Bruni et al, 2015).

A pesar de la introducción de la vacuna, incluso de las vacunas de nueva generación (nonavalente), existe un gran número de mujeres que ya han estado expuestas al VPH y por tanto son susceptibles de desarrollar un cáncer cervical, por lo que deben de implementarse unos buenos programas de cribado frente a esta patología.

En la Unión Europea se producen anualmente 34.000 nuevos casos de cáncer cervical y 13.000 muertes. En las últimas guías Europeas de cribado frente al VPH, así como en las guías de la OMS y la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) muestran evidencias de una mejora en el cribado usando una prueba de detección genómica de VPH frente a la clásica citología.

Respecto a los programas de cribado de cáncer de cuello de útero las últimas guías tanto de la SEGO como de la OMS proponen los mismos puntos básicos, entre los más importantes destacan:

- ✓ Comienzo a partir de los 35 años
- ✓ Comienzo nunca antes de los 30 años
- ✓ Finalización del cribado en mujeres mayores de 60 años con la última detección de VPH negativa.
- ✓ El intervalo entre las visitas de cribado en una mujer cuya primera prueba de detección genómica de VPH ha sido negativa debe ser de al menos 5 años.
- ✓ Mujeres con una prueba de VPH positiva deben realizarse una citología. Dependiendo del resultado, las pacientes se derivarán al programa de cribado de nuevo o a colposcopia.

En Estados Unidos tras la realización de un estudio a nivel estatal para evaluar la validez de la detección genómica de VPH como técnica de cribado primario, propusieron un algoritmo distinto al propuesto por la OMS. Ellos sugieren que el cribado comience a los 25 años con una detección genómica cada 3 años, siempre que sea negativa. Mujeres con el test HPV positivo para el VPH 16 o VPH 18 se mandarían a colposcopia, mientras que aquellas que son positivas para otro genotipo de alto riesgo se les realizarían una citología. Si ésta es negativa, volverían al cribado cada 3 años, si el resultado de esta es ASCUS o una lesión de mayor grado se les haría una colposcopia (Cox et al, 2013).

El algoritmo del programa de cribado que se aplica actualmente en nuestra comunidad, atendiendo a la edad de la paciente, se muestra a continuación en la figura 13 A y B:



Figura 13. Algoritmo de seguimiento en mujeres menores (A) y mayores de 35 años (B) en Asturias

La infección por el VPH es muy frecuente en nuestra sociedad y a pesar de contar con programas de cribado (oportunistas y no poblacionales) para la prevención del cáncer de cuello de útero, esta enfermedad sigue siendo la segunda causa de cáncer entre las mujeres de 15 a 44 años en nuestro país.

2.OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como ya se comentaba en el apartado de introducción el virus del papiloma humano (VPH) es el agente principal y necesario para desarrollar cáncer de cuello uterino. Existen distintos genotipos que están relacionados en mayor o menor medida con pronósticos distintos.

El VPH 16 es el genotipo más frecuente en las mujeres con lesiones más graves y peor pronóstico. Dentro del genotipo VPH 16 se han detectado distintos linajes y variantes que se relacionan con una peor evolución de las lesiones intraepiteliales. Sin embargo, el VPH 16 no es el único genotipo que provoca malignidad. Desde la introducción de la vacuna, cada vez se encuentran más infecciones persistentes por otros genotipos denominados de alto riesgo para el carcinoma de cérvix como el VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.

Los VPH producen infecciones en regiones donde las células del sistema inmunitario son escasas, lo que favorece su multiplicación y progresión. Estas infecciones provocan consecuencias graves no en el momento de la infección, sino en un periodo de tiempo más o menos largo (hasta en 20-30 años). Factores virales como son la integración de su genoma, la carga viral, variantes genómicas o infecciones mixtas, los hacen comportarse de formas diferentes en cada caso, variando así su pronóstico. Estudiar estas características virales con el fin de intentar establecer unos biomarcadores que puedan predecir la evolución de las pacientes infectadas con el virus es un reto de los laboratorios de Microbiología.

Por todo esto, en este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Conocer la prevalencia de los genotipos de VPH durante el periodo de estudio.
2. Estudiar la influencia del genotipo en la evolución de las lesiones.
3. Valorar la importancia de la coinfección con otros virus (EBV, ADV, CMV y VIH) como factor de progresión
4. Evaluar la relación de la carga viral del VPH 16 con la progresión de las lesiones.
5. Analizar la integración del genoma del VPH 16 en el genoma celular humano.
6. Conocer los linajes y caracterizar los polimorfismos del gen E6 del VPH 16 y determinar su importancia como biomarcadores pronósticos.
7. Comprobar la presencia de la variante T350G del VPH 16 y su implicación en el pronóstico de la infección.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Población a estudio

Para llevar a cabo los objetivos planteados en este trabajo la población de estudio la constituyó mujeres que acudieron a la consulta de Patología Cervical del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Central de Asturias (HUCA), durante los años 2006-2012, para la detección precoz de cáncer de cérvix con controles periódicos.

Así, se seleccionaron 415 muestras de exudados endocervicales pertenecientes a 234 mujeres. De ellas, 177 mujeres se seleccionaron a partir de la base de datos de la Unidad de Virología del HUCA, con un seguimiento virológico de la infección por VPH de al menos 36 meses (3 años). Posteriormente se procedió a la revisión de las historias clínicas de las mismas para conocer su evolución citológica a lo largo de estos años y si se les había realizado una intervención quirúrgica para resolver la infección. La edad media de estas mujeres al comienzo del estudio fue de 37.4 ± 9.2 años (19-76 años).

Las 57 mujeres restantes infectadas con VPH 16 procedían de las consultas de cribado oportunista de VPH durante los años 2011 – 2012 y en las que se comprobó mediante la revisión de las historias clínicas que estas mujeres no tuvieron lesiones intraepiteliales. La edad media de estas fue de 35.3 ± 4.9 años (20-64 años).

3.2. Técnicas de detección genómica

A lo largo de los años 2006 a 2012 los métodos de detección genómica del VPH se modificaron por motivos de trabajo de la Unidad de Virología del HUCA, por lo que esta técnica se subdividió en dos periodos. Entre los años 2006 - 2010 se realizó una amplificación genómica (PCR) empleando de una polimerasa termoestable con protocolos estándar de amplificación genómica. A partir del año 2010 las muestras se procesaron por el sistema automatizado cobas® HPV Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, California).

En todos los ensayos de amplificación genómica se tomaron las precauciones y medidas habituales para evitar contaminaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la detección de VPH se recogieron exudados cervicales en tampón STE (durante el primer periodo el volumen fue de 2 ml y durante el segundo periodo de 20 ml) (Anexo I) y se enviaron a la Unidad de Virología, donde se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

3.2.1. Primer periodo: Técnicas manuales

En este periodo las técnicas de detección genómica se llevaron a cabo en tres pasos de forma independiente: preparación o extracción genómica, amplificación genómica y revelado del producto de amplificación.

3.2.1.1. Técnicas de extracción genómica

En la fase de extracción se obtuvieron altas concentraciones del ADN libre y se eliminaron inhibidores que pudiesen afectar a la reacción de amplificación posterior. Para ello, se llevó a cabo una extracción del genoma por medio del COBAS AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit TNAI (Roche diagnostics, Suiza).

En todos los casos se partió de 2 ml de muestra.

El proceso de extracción consistió en los siguientes 5 pasos:

1. Adición de proteasa que digiere las proteínas para facilitar la liberación del genoma viral (ADN ó ARN).
2. Adición del reactivo de lisis a la muestra que produce una lisis total de las proteínas por desnaturalización. El material genético es liberado y simultáneamente estabilizado.
3. Adhesión del material genético liberado a una superficie de sílice que recubre partículas magnéticas de cristal debido a las condiciones salinas caotrópicas y a la elevada fuerza iónica del reactivo de lisis.
4. Lavados que retiran las proteínas desnaturalizadas, restos celulares e inhibidores potenciales de la PCR como la hemoglobina, etc., y reducen la concentración de sales.
5. Elución del ácido nucleico a elevada temperatura.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1.2. Técnicas de amplificación genómica: PCR convencional

La amplificación genómica (PCR) es un método enzimático que por medio de una polimerasa termoestable duplica de forma cíclica una secuencia específica de ADN de doble cadena pudiéndose obtener millones de copias de esa región del genoma. Cada ciclo consta de tres fases térmicas: desnaturalización, momento en el que se separan las dos hebras del ADN; anillamiento, momento en el que se unen los cebadores; y polimerización o elongación, síntesis de la hebra complementaria.

Para la detección del VPH mediante amplificación genómica se desarrolló un protocolo de PCR simple, utilizando la combinación de dos parejas de cebadores consenso MY11/ GP6+ frente a la región L1, una zona del genoma del virus altamente conservada en todos los genotipos (Manos, 1989).

Para comprobar la idoneidad de la muestra se incluyó un protocolo de detección de amplificación del gen de la β -globina humana.

La composición oligonucleotídica de los cebadores se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Cebadores del VPH para la región L1 y la β -globina humana

| Región | Cebador | Secuencia |
|-------------------------|---------|--|
| L1 | MY11 | 5'-GC(A/C)CAGGG(A/T)CATAA(C/T)AATGG-3' |
| | GP6+ | 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3' |
| β -globina humana | HBBF | 5'-ACACAACCTTGTGTGTTCACTAGC-3' |
| | HBBR | 5'-CAAACCTACTGTAAATCATATTC-3' |

Con cada una de estas parejas de cebadores se procedió a realizar una mezcla de reacción de amplificación para cada una de las dianas buscadas. Para evitar trabajar con cantidades mínimas de los reactivos, se preparó una mezcla con todos los componentes de la reacción, y se alicuotó a razón de 20 μ l en tubos Eppendorf® con capacidad para 200 μ l. La tabla 6 muestra los reactivos y los perfiles térmicos aplicados en cada caso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 6. Condiciones finales de la amplificación genómica del gen L1 y β -globina

| Mezcla | L1 | β -globina humana |
|------------------------------|------------------|-------------------------|
| Volumen (μ l) | 25 | 25 |
| Taq (5U/ μ l) | 0.5 U/reacción | 0.5 U/reacción |
| dNTPs (1mM c/u) | 50 μ M c/u | 50 μ M c/u |
| Buffer (10X) | 1X | 1X |
| Mg ²⁺ (50mM) | 1.5mM | 1.5mM |
| Cebadores (12.5 μ M c/u) | 0.5 μ M c/u | 0.5 μ M c/u |
| Agua | Hasta 20 μ l | Hasta 20 μ l |
| Muestra | 5 μ l | 5 μ l |

| Perfil térmico | Ciclos | Tª | Tiempo | Ciclos | Tª | Tiempo |
|-------------------|--------|-----|--------|--------|-----|--------|
| Preciclo | 1 | 94° | 4' | 1 | 94° | 5' |
| Ciclos | 35 | | | 35 | | |
| Desnaturalización | | 95° | 30'' | | 95° | 30'' |
| Anillamiento | | 52° | 50'' | | 50° | 50'' |
| Elongación | | 72° | 1' | | 72° | 1' |
| Postciclo | 1 | 72° | 10' | | 72° | 10' |

La preparación de las mezclas de reacción se hizo en una cámara de flujo laminar en un cuarto del laboratorio separado del lugar donde se lleva a cabo la extracción de las muestras, la amplificación y la detección de los productos amplificados según las normas de seguridad aplicadas en el laboratorio (Persin et al, 1989).

Estas reacciones se realizaron en diversos tipos de amplificadores: Veriti 96 well thermal cycler, Gene AMP PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA), iCycler (Bio-Rad, USA).

3.2.1.3. Identificación del producto amplificado

El producto final de la amplificación genómica se puso de manifiesto mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para la preparación del gel, se mezcló agarosa al 2% con tampón TAE (Anexo I). A continuación se calentó en microondas hasta la total disolución de la agarosa. Una vez disuelto, se añadió 5 μ l de bromuro de etidio por cada 100 ml de mezcla y se puso en el molde, con un peine de un grosor de 3 mm. Cuando el gel obtuvo consistencia se procedió a realizar la electroforesis.

Se preparó una mezcla de 10 μ l del producto amplificado con 2 μ l del tampón de carga (Anexo I) y se transfirió al gel de agarosa al 2% sumergido en una cubeta de electroforesis con tampón TAE y se sometió a un campo eléctrico continuo con una diferencia de potencial de 100 voltios durante 30 - 45 minutos. El producto de la PCR se monitorizó mediante transiluminación con luz ultravioleta. Se comparó el producto amplificado con el marcador de

MATERIAL Y MÉTODOS

control pesos moleculares 50 pb Ladder (Life-Tecnology). La reacción se consideró positiva cuando se observaron las siguientes bandas:

- 200 pb el fragmento L1
- 100 pb para la β -globina humana

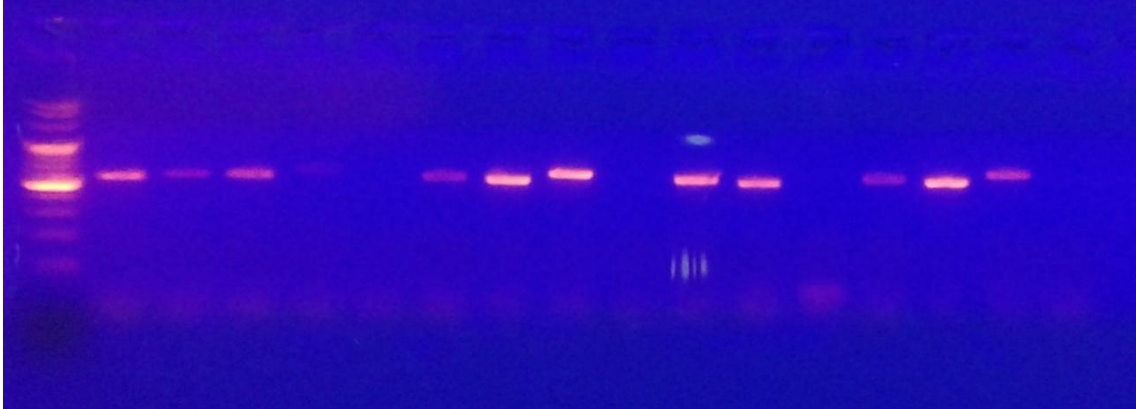


Figura 14. Gel de agarosa con fragmento L1 del VPH (200 pb)

3.2.2. Segundo periodo: Técnica cobas® HPV Test de ROCHE Diagnostics

A partir del año 2011, la detección de VPH se realizó mediante el sistema automatizado cobas® HPV Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, California). Para esta técnica las muestras se recogieron también mediante cepillado endocervical, diluidas en 20 ml del tampón STE en un contenedor específico para este equipo. En cada ensayo se procesaron 24 muestras, dos de las cuales fueron controles. Obteniéndose 150 μ l de eluido de ADN purificado de cada muestra y de los que se utilizó 25 μ l para la PCR de detección de VPH.

La técnica de detección es una PCR a tiempo real que diferencia, de manera individual, los genotipos VPH 16, 18 y un grupo de genotipos de VPH de alto riesgo en los que se incluyen los VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, mediante la utilización de sondas marcadas con 4 fluoróforos distintos. Este test está aprobado por la FDA para el cribado primario de infección por HPV.

La técnica se basa en la detección de una región del gen L1 de los distintos genotipos incluidos en el test. Para ellos utiliza 4 sondas diferentes, de ellas 3 son utilizadas para la detección de VPH

MATERIAL Y MÉTODOS

- CH1: detecta el pool de los 12 genotipos de alto riesgo
- CH2: detecta el VPH 16
- CH3: detecta el VPH 18

Por otra parte, esta técnica a diferencia de otras que existen en el mercado, incluye una sonda específica que detecta el gen de la β -globina humana lo que permite valorar la calidad de la muestra detectando la celularidad de la misma:

- CH4: detecta el gen de la β -globina humana

Además de identificar los genotipos VPH 16, 18, o AR y el software del equipo permite conocer el ciclo de amplificación de los mismos (Ct) que es el límite de fluorescencia dónde la amplificación de ADN de las dianas empieza a multiplicarse exponencialmente, así como el Ct de la β -globina que posteriormente se utilizó para el cálculo de la carga viral (apartado 3.4).



Figura 15. Sistema cobas[®]4800 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, California)

3.3. Genotipado de las muestras por hibridación de oligonucleótidos

Para el genotipado del VPH de las muestras, se llevó a cabo una técnica desarrollada en el laboratorio de “spot-blot”.

Los productos amplificados, y positivos para el fragmento L1, se hibridaron con sondas marcadas con P³² específicas para los VPH de bajo riesgo 6, 11 y alto riesgo 16, 18, 31, 33, 45 y 58.

En el caso de las muestras del segundo período se utilizó el eluido sobrante del cobas[®] HPV Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, California) para realizar una PCR

MATERIAL Y MÉTODOS

convencional con los cebadores MY11/GP6+ y se utilizaron los productos amplificados para su posterior hibridación.

Las sondas utilizadas se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de las sondas utilizadas en el genotipado del VPH

| Genotipo | | Secuencia |
|-------------|--------|------------------------------|
| Bajo Riesgo | VPH 6 | 5'-CATCCGTA ACTACATCTTCCA-3' |
| | VPH 11 | 5'-TCTGTGTCTAAATCTGCTACA-3' |
| Alto Riesgo | VPH 16 | 5'-CATA CACCTCCAGCACCTAA-3' |
| | VPH 18 | 5'-GGATGCTGCACCGGCTGA-3' |
| | VPH 31 | 5'-TTGCAAACAGTGATACTACATT-3' |
| | VPH 33 | 5'-CACACAAGTAACTAGTGACAG-3' |
| | VPH 45 | 5'-ATACTACACCTCCAGAAAAGC-3' |
| | VPH 58 | 5'-TGAAGTAACTAAGGAAGGTACA-3' |
| | VPH 39 | 5'ATAGAGTCTTCCATACCTTC-3' |
| | VPH 51 | 5'TGCTGCGGTTTCCCAA-3' |
| | VPH 52 | 5'GAATACCTTCGTCATGGC-3' |
| | VPH 53 | 5'TGTCTACATATAATTCAAAGC-3' |
| | VPH 56 | 5'CCAGAACAGTTAAGTAAATATG-3' |
| | VPH 59 | 5'TCTACTACTGCTTCTATTCC-3' |
| | VPH 66 | 5'AGCTAAAAGCACATTA ACTAA-3' |
| | VPH 68 | 5'CTGAATCAGCTGTACCAAT-3' |

❖ Preparación de las muestras en la membrana.

Una vez se obtuvieron los amplicones, se pusieron en una membrana para realizar la hibridación.

- Para la desnaturalización del ADN, a 10 µl del producto amplificado se añadieron 150µl de NaOH/EDTA, y se mantuvo 15 minutos mínimo a temperatura ambiente
- Se hidrató la membrana (de un tamaño que cubriese el “manifold”), en agua destilada durante unos minutos
- Se colocó en un “manifold” (Minibloter modelo MN 100-45, Isogen, Immunetics) para el spot-blot (“manifold” con capilares), primero la almohadilla y encima la membrana
- Se pasaron 150 µl de NaOH/EDTA por cada capilar de la membrana para adaptarla al pH. Se hizo vacío en cada capilar con una punta de pipeta, para retirar el NaOH/EDTA

MATERIAL Y MÉTODOS

- En el primer capilar se añadieron 150 μl de una dilución de tinta china 1: 100 en NaOH/EDTA, lo cual nos sirvió para saber la posición de las muestras, a continuación se añadieron 150 μl de la muestra desnaturalizada en el capilar correspondiente
- Se dejó incubar a temperatura ambiente el “manifold” con las muestras un mínimo de 1,5 horas
- Se hizo vacío en cada capilar con una punta de pipeta, para retirar la muestra
- Se pasaron 150 μl de NaOH/EDTA por la membrana para que no quedase muestra en las paredes y se aplicó nuevamente vacío
- Se retiró la membrana del “manifold” y se lavó 2 veces durante 5 minutos en agitación con SSC 2X para neutralizar el pH
- Se secó la membrana sobre papel de filtro y se colocó en el transiluminador durante 30 minutos para que el ADN se fijase a la membrana
- La membrana se guardó envuelta en papel de filtro a 4°C hasta su uso

❖ *Marcaje de la sonda con P^{32}*

El marcaje de la sonda se realizó en el carbono y del extremo 3' por medio de una PNK (Protein Nucleotido Kinasa).

Para tres sondas se empleó:

- 8-10 pmoles de la sonda (4 μl de una sonda a 2 μM)
- 0.5 μl de la PNK
- 1 μl del Buffer de PNK 10X
- 3 μl de r-ATP-32P
- 0.5 μl de ditioeritritol 0.1 M (estabiliza la enzima cuando se congela y descongela varias veces)
- 1 μl de agua

Para evitar trabajar con cantidades muy pequeñas se marcaron más de un oligonucleótido, realizando una solución stock con el fósforo, la PNK, el buffer, el agua, y el dTT.

El marcaje se realizó a 37° durante 40 minutos como mínimo.

❖ *Prehibridación*

Durante el marcaje de la sonda se realizó la prehibridación de la membrana con PBS 2X, SDS 2%, 1mM EDTA, Denhardt's 5X (Anexo I) y 15 μl esperma de salmón de una

MATERIAL Y MÉTODOS

concentración de 1g/100ml (este esperma debe cubrir toda la membrana para evitar el marcaje inespecífico). La mezcla se preparó sin el esperma de salmón y ambos se guardaron a 4°C.

La prehibridación se llevó a cabo poniendo 40 ml de la mezcla anterior en una batea añadiendo el esperma de salmón a razón de 10 µl/ml de solución (600 µl del esperma).

La prehibridación se llevó a cabo a 65°C durante 30 minutos como mínimo y en agitación. En el caso de reutilizar una membrana previamente hibridada con el fin de llevar a cabo una nueva hibridación con otras sondas, previo a este punto se procedió a la deshibridación de las sondas utilizadas con anterioridad, dejando así la muestra unida a la membrana, para ello:

- Se hirvió una mezcla (500ml) de SDS 0,5% y SSC 0,1X. Se almacena a 10X (ANEXO I)
- Se introdujeron las membranas y se pusieron en un agitador con calor durante 15 minutos, removiendo cada poco tiempo la mezcla con las membranas.

Una vez deshibridada la membrana se comenzaría de nuevo la prehibridación, sobre la misma membrana y a continuación la hibridación utilizando unas sondas diferentes, de no utilizarse en este momento se puede conservar envuelta en papel de filtro a 4°C hasta su uso.

❖ *Hibridación*

Una vez prehibridada se volvió a poner la membrana en el “manifold”, colocando debajo otra almohadilla.

En este paso es muy importante la posición de la membrana que se debe rotar 90° en dirección de las agujas de reloj de tal manera que ahora la tinta china quede en la parte superior del “manifold” coincidiendo con los agujeros de los capilares.

Preparación de la solución de trabajo de las sondas:

- Se añadieron 1,5 µl de la sonda marcada correspondiente a 150 µl de la solución de prehibridación.
- Posteriormente 130 µl de la solución anterior se añadieron en el capilar correspondiente.
- Se incubó durante un mínimo de 1,5 horas a una temperatura de 53°C.

Una vez hibridadas las sondas se procedió a los lavados:

MATERIAL Y MÉTODOS

Primer lavado:

- 10 minutos en agitación con la solución lavado 1 (Anexo I) a temperatura ambiente.

Segundo lavado:

- 10 minutos en agitación con la solución de lavado 2 (Anexo I) a la temperatura de hibridación

Tercer lavado:

- Igual al anterior, sustituyendo la mezcla. Estos 2 lavados son críticos y determinan la especificidad de la reacción. Si la membrana saliese poco específica, se irían subiendo de dos en dos grados la temperatura de lavado hasta conseguir el punto óptimo.

Cuarto lavado

- 5 minutos PBS a temperatura ambiente en agitación.

Posteriormente se pasó la membrana por papel de filtro sin llegar a secarla totalmente.

❖ *Revelado*

La membrana una vez pasada por el papel de filtro, se introdujo en una bolsa para evitar la desecación y pudiendo ser reutilizada nuevamente y se colocó en un chasis con una película fotográfica (3000 ASA) después de mantenerla durante 18-24 horas a -70° . Se reveló como una placa de rayos obteniendo las imágenes de la figura 14.

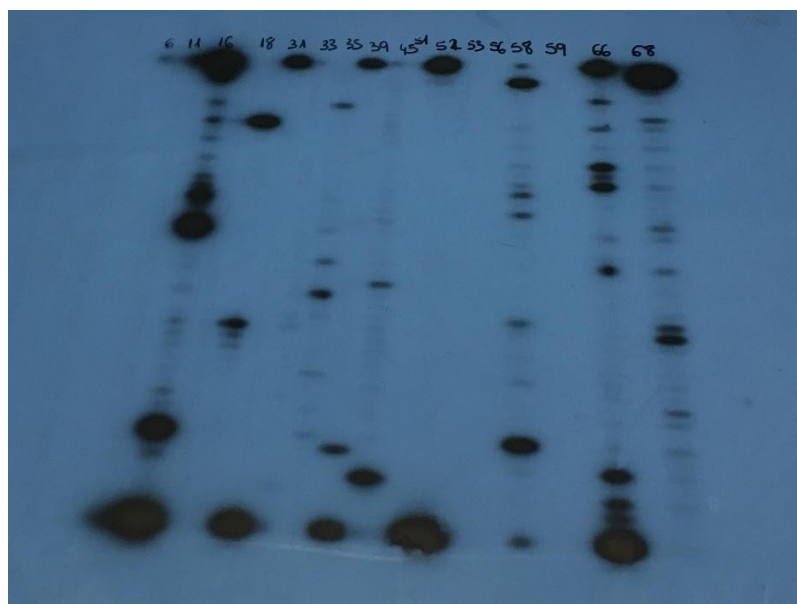


Figura 16: Membrana de revelado de genotipado con P^{32}

MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1. Genotipado por secuenciación

Para la identificación del resto de genotipos no incluidos en la técnica de hibridación se procedió a la secuenciación del fragmento amplificado por los mismos cebadores MY11/GP6+. En el caso de las muestras del segundo periodo, fue necesario como se comentó con anterioridad, realizar una PCR con esta misma pareja de cebadores (MY11/GP6+).

Existen diferentes métodos de secuenciación genómica, unos utilizan los dideoxynucleotidos marcados y otros los cebadores marcados que son empleados para determinar la secuencia de bases, pero todas ellas tienen en común la generación de una nueva hebra de ADN que comienza en un punto específico, que viene determinado por el cebador y acaba con la incorporación a la cadena en síntesis de un terminador dideoxynucleotido trifosfato, obteniéndose así secuencias de distinta longitud que difieren en una sola base y que pueden ser separadas electroforéticamente por tamaños de menor a mayor al aplicar una corriente eléctrica.

❖ *Protocolo de secuenciación Kit Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing.*

La técnica se desarrolló a partir del material genómico amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa realizada para determinar la presencia del VPH. Los productos de la PCR fueron purificados a partir del gel de agarosa mediante columnas de extracción (Montage DNA Gel Extraction Kit, Millipore) y secuenciados usando el preparado comercial “BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit” (Applied Biosystems, USA). Los cebadores utilizados son los mismos que los de la reacción de amplificación del gen L1. La mezcla de reacción se recoge en la tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción para la secuenciación

| Reactivo | Volumen/muestra | Concentración final | |
|------------------------------|-----------------|---------------------|--------|
| Tampón (5X) | 2 µl | 1x | |
| Mezcla de secuenciación (5X) | 2 µl | 1x | |
| DMSO (5%) | 0.5 µl | 0.25% | |
| Cebador (5mM) | 0.5 µl | 0.25 µl | |
| Muestra | 3 µl | - | |
| Agua | Hasta 10 µl | - | |
| Perfil térmico | Ciclos | Tª | Tiempo |
| Preciclo | 1 | 94°C | 5' |
| Ciclos | 30 | | |
| Desnaturalización | | 94°C | 30'' |
| Anillamiento | | 50°C | 20'' |
| Elongación | | 60°C | 4' |

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la secuenciación se purificó el producto de la PCR añadiendo al producto de la amplificación 40 µl de BigDye®Xterminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, USA) preparado según instrucciones del fabricante.

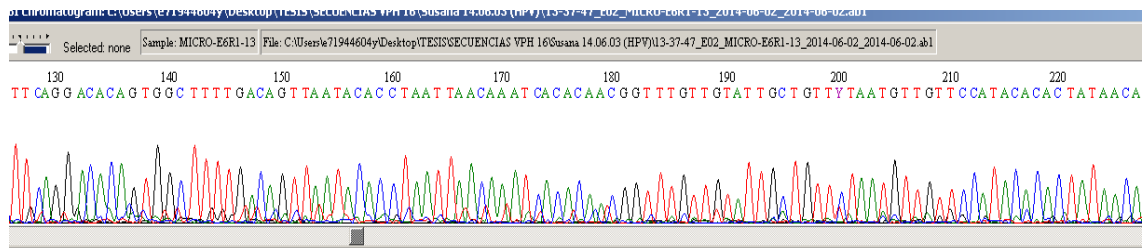


Figura 17: Secuencia del gen E6 obtenida mediante secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron trabajadas con el programa CROMAS Pro y la identificación del genotipo se realizó mediante el análisis de homología de las secuencias obtenidas con las depositadas en las bases de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

3.4. Cuantificación genómica

En las muestras del segundo periodo que se procesaron por el cobas® HPV Test de ROCHE Diagnostics para realizar la cuantificación del genoma del VPH se tuvieron en cuenta los ciclos de amplificación (Ct) de la betaglobina que indicaría el número de células y los Ct de la detección del VPH que indicaría la cantidad de virus basándose en la comparación de estos Cts con los de unas curvas estándar previamente descritas (Alvarez Argüelles ME, 2015), pudiendo expresar así el número de copias de VPH por 1000 células. Esto explica el número reducido de muestras (n: 76) con determinación de carga viral.

3.5. Detección de la variante T350G del VPH 16

La detección de la variante genómica T350G de los genotipos VPH 16 se realizó mediante una técnica de discriminación alélica (Pérez S et al, 2011). En esta técnica se utilizaron unos cebadores específicos para esta secuencia del genoma y dos sondas alelos específicas TaqMan MGB, con diferente fluoróforo en el extremo 5' y un extintor. En el

MATERIAL Y MÉTODOS

extremo 3'. La sonda marcada con VIC detectaba el alelo 1 (T350T o prototipo), y la marcada con FAM el alelo 2 (T350G o variante).

La reacción se llevó a cabo usando 5µl de extraído de las muestras y 5 µl de mezcla reacción de GTXpress Master MIX (Applied Biosystems, Life technologies Corporation, Foster City, CA, USA) en un Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems, Life technologies Corporation, Foster City, CA, USA). Las secuencias de los cebadores, las sondas así como las condiciones de la amplificación genómica se muestran en las tablas 9 y 10.

Tabla 9 .Cebadores y sondas utilizados para detección de la variante

| Cebador/Sonda | Secuencias |
|------------------|---------------------------------|
| HPV16T350G_F | 5'AGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATT3' |
| HPV16T350G_R | 5'CAACGGTTTGTGTATTGCTGTCT3' |
| HPV16-350T-sonda | 5'TGTTGTTCCATACAACTATAA-VIC3' |
| HPV16-350G-sonda | 5'TTGTTCATACACTATAA-FAM3' |

Tabla 10. Condiciones de la determinación de la variante T350G

| Mezcla | Volumen | | |
|----------------------|---------|-----|--------|
| GTXpress Master Mix® | 2.5 µl | | |
| Mix de primers/sonda | 0.12 µl | | |
| Agua desionizada | 1.38 µl | | |
| Muestra | 1 µl | | |
| Perfil térmico | Ciclos | Tª | Tiempo |
| Preciclo | 1 | 95° | 4' |
| Ciclos | 45 | | |
| Desnaturalización | | 95° | 15'' |
| Anillamiento | | 60° | 1' |
| Amplificación | | | |

Previo al proceso de amplificación se realizó una prelectura a 25°C durante 1 minuto, midiendo así la fluorescencia de base en la reacción. Una vez que el proceso de amplificación finalizó, se realizó la post-lectura a 25°C durante 1 minuto, midiéndose así la fluorescencia, tomando como base los datos de fluorescencia obtenidos en el proceso de pre-lectura que nos permite interpretar los resultados, en función de la presencia o no de la variante. Para ello el software realiza una discriminación T350G representando en diagrama de dispersión de puntos las muestras que presentaban la variante 350G frente a las que no la presentaban La lectura se hizo en FAM y VIC en cada una de las muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

En cada ensayo se testaron dos controles negativos en los que se añadieron 5 µl de agua como muestra y cuatro controles positivos; dos prototipos y dos variantes de cepas de referencia.

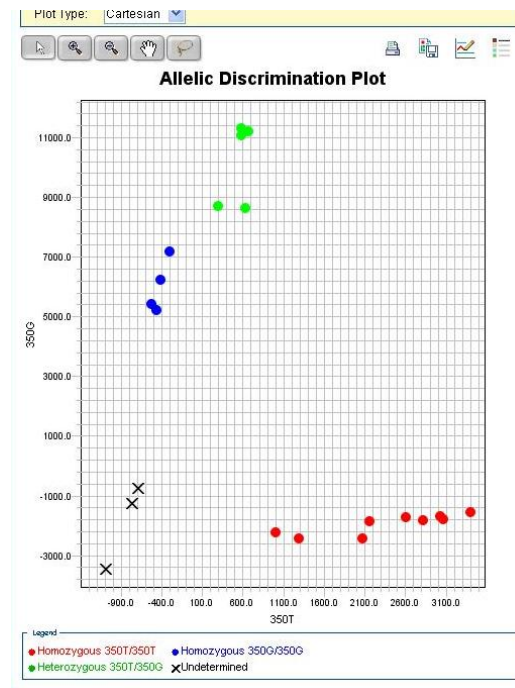


Figura 18. Diagrama de resultados de la técnica de discriminación alélica para la detección de la variante T350G

3.6. Secuenciación del gen E6 del VPH 16 y realización de la filogenia del mismo

Para estudiar si existía alguna característica especial en el oncogen E6 de las muestras de estas pacientes se procedió a su secuenciación completa.

Se realizó una amplificación genómica del gen E6 del VPH 16 de las muestras mediante una PCR convencional. Los cebadores, reactivos y perfil térmico de esta PCR se muestran en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Cebadores utilizados para la secuenciación del gen E6

| Cebador/Sonda | Secuencias |
|---------------|--------------------------------|
| HPV16 E6F | 5' AGGCACATATTTTGGCTTGTT 3' |
| HPV16 E6R | 5' TTCATGCAATGTAGGTGTATCTCC 3' |

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 12. Condiciones de la amplificación del gen E6

| Mezcla | | Volumen | | |
|------------------------|-------------------|----------|-----|--------|
| Cebadores 0.5mM | | 1 | µl | |
| dNTPs 0.2mM c/u | | 2.5 | µl | |
| Buffer 1X | | 5 | µl | |
| Cl ₂ Mg 2mM | | 2 | µl | |
| Taq 1IU | | 0.1 | µl | |
| Agua | | Hasta 20 | µl | |
| Muestra | | 5 | µl | |
| Perfil térmico | | Ciclos | Tª | Tiempo |
| Preciclo | | 1 | 95° | 5' |
| Ciclos | | 45 | | |
| | Desnaturalización | | 94° | 30'' |
| | Anillamiento | | 55° | 45'' |
| | Elongación | | 72° | 3' |
| Postciclo | | 1 | 72° | 10' |

Tras obtener el producto amplificado se procedió a realizar la secuenciación del fragmento siguiendo el mismo protocolo que el explicado anteriormente el apartado 3.3.2, utilizando en este caso los cebadores HPV16 E6F y HPV16 E6R.

Las secuencias sentido y antisentido de cada una de las muestras obtenidas por el secuenciador procesaron con el programa Bioedit (versión 7.0.5.3).

3.7. Detección de genoma de VPH integrado o episomal

Se realizó la detección del estado del genoma del VPH16 en las pacientes mediante una técnica de amplificación a tiempo real que tenían como diana el gen E2 y E6. Posteriormente se realizó el cociente E2/E6 con los Ct correspondientes y según el resultado de esta proporción se consideraría el genoma integrado, episomal o mixtos (tabla 13).

Tabla 13. Relación E2/E6 y estado del genoma VPH16

| E2/E6 | Genoma |
|-----------|-----------|
| 0.93-1.08 | Episomal |
| 0 | Integrado |
| 0.10-0.92 | Mixto |

Los cebadores, las sondas y condiciones de la PCR utilizados se muestran en las tablas 14 y 15.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 14. Cebadores y sondas para determinación del estado del genoma del VPH16

| Cebador/Sonda | Secuencia |
|----------------|-------------------------------|
| VPH16 E2_F | 5'TTAGCAGCAACGAACTATCCTCTCC3' |
| VPH16 E2_R | 5'CCAAGGCGACGGCTTTG3' |
| VPH16 E2 sonda | 5'CAGCACTTGGCCAACCA-VIC 3' |
| VPH16 E6_F | 5'AAGAGAAGTCAATGTTTCAGGAC3' |
| VPH16 E6_R | 5'AGTTGTTTGCAGCTCTGTGCAT3' |
| VPH16 E6 sonda | 5'CAGGAGCGACCCAGAA-FAM 3' |

Tabla 15. Condiciones de la amplificación del estado del genoma del VPH16

| Mezcla | Volumen | | |
|--------------------------------------|---------|-----|--------|
| Taq Man Fast Virus 1-Step Master Mix | 2.50 µl | | |
| Mezcla cebadores y sonda | 0.50 µl | | |
| Agua | 2.00 µl | | |
| Muestra | 5.00 µl | | |
| Perfil térmico | Ciclos | Tª | Tiempo |
| Preciclo | 1 | 95° | 5' |
| Ciclos | 40 | | |
| Desnaturalización | | 95° | 5'' |
| Anillamiento | | 55° | 10'' |
| Elongación | | 60° | 30'' |

3.8. Detección genómica de los virus EBV, ADV y CMV

Se estudió la posible implicación en la progresión de la infección de la coinfección del VPH con otros virus oncogénicos y con fenómeno de latencia como son el EBV, CMV y el ADV. La detección y la cuantificación del ADN viral se realizaron por el método de amplificación genómica y análisis en tiempo real (PCR en tiempo real).

Se realizaron dos PCR distintas: una para la detección simultánea de los virus CMV y EBV; y otra para la detección del ADV.

La PCR en tiempo real se realizó en el termociclador Versan KPCR (Siemens healthcare diagnostics, Suecia) que va a utilizar la mezcla de reacción comercial "Taq Man Fast virus 1-Step Master Mix" (Applied Biosystems), una mezcla de cebadores (primers) y una sonda fluorescente marcada con FAM, VIC o NED dependiendo del virus del que se trate. Los cebadores, sondas y la mezcla de reacción se muestran en las tablas 16 y 17.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 16. Cebadores y sondas para las PCR a tiempo real

| Virus | Cebador | Tamaño | Sonda |
|-------|-----------|----------------------------|----------|
| CMV | CMV-TR-S | GACTTCAGGGTACTGGAACCTTACT | CMV-FAM |
| | CMV-TR-A | ATTCGCGCATGATCTCTTCGA | |
| EBV | EBV-TR-S | GGCTAGGAGTCACGTAGAAAGG | EBV-VIC |
| | EBV-TR-A | CTCCATATACGAACACACCG | |
| ADV | ADV2-TR-S | CCAGGACGCCTCGGAGTA | ADV2-NED |
| | ADV2-TR-A | AAACTGTTATTCAGGCTGAAGTACGT | |
| | ADV4-TR-S | GGACAGGACGCTTCGGAGTA | ADV4-NED |
| | ADV4-TR-A | CTTGTTCCCCAGACTGAAGTAGGT | |

Tabla 17. Condiciones de la amplificación de EBV, CMV y ADV

| Mezcla | Volumen |
|--------------------------------------|--------------|
| Taq Man Fast Virus 1-Step Master Mix | 2.50 μ l |
| Mezcla cebadores y sonda | 0.50 μ l |
| Agua | 2.00 μ l |
| Muestra | 5.00 μ l |

| Perfil térmico | Ciclos | Tª | Tiempo |
|-------------------|--------|-----|--------|
| Preciclo | 1 | 95° | 5' |
| Ciclos | 40 | | |
| Desnaturalización | | 95° | 5'' |
| Anillamiento | | 55° | 10'' |
| Elongación | | 60° | 30'' |

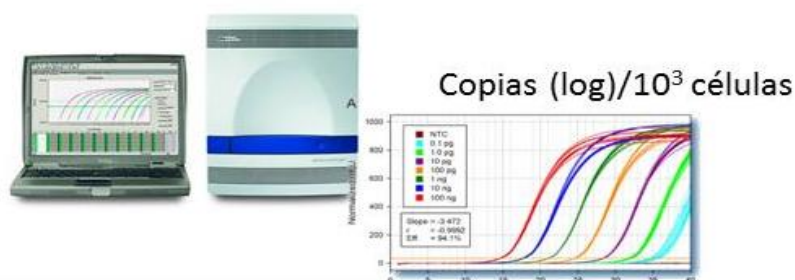


Figura 19. Termociclador de amplificación a tiempo real y visualización de resultados

3.9. Identificación de pacientes con infección por VIH

Para la identificación de las pacientes que eran VIH positivas se procedió a revisar sus historias clínicas para comprobar que tuvieran realizada una serología frente al virus.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.10. Análisis estadístico

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con un programa estadístico para ordenador, GraphPad InStat V2.04a.

El significado estadístico de la diferencia entre las proporciones se determinó usando la prueba χ^2 con corrección de Yates o el test exacto de Fisher para variables cualitativas en celdas 2x2 cuando en la tabla teórica existía un dato menor de 5, o el global de los datos no llegaba a 50. Se aplicó el test t-Student para datos no apareados cuando se compararon medias aritméticas, aplicándose la corrección de Welch cuando las diferencias entre las varianzas eran estadísticamente significativas.

Se utilizaron test de dos colas para todas las determinaciones. El nivel de significación requerido en todos los casos fue de $p < 0.05$, así como para el cálculo de los intervalos de confianza.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.11. ANEXO I

3.11.1. Reactivos utilizados en las técnicas de amplificación genómica (PCR)

Tampón STE:

- ❖ 10 mM de Tris-HCl (pH: 8)
- ❖ 0,1M de NaCl
- ❖ 1 mM de EDTA

Tampón PCR 10X:

- 200 mM de Tris-HCl (pH: 8,3)
- 250 mM de KCl
- 20 mM de MgCl₂
- 0,5% de Tween 20
- 0,5% de NP-40

Proteínasa K (Roche®, USA):

Reconstituir con Tris-HCl a 10 mM, dejándola a una concentración final de 10 mg/ml. Se realizaron alícuotas que se conservaron a -20°C

Tampón con proteínasa K:

- Tampón PCR 1X, al que se añade:
 - Tween 20 al 0,5%
 - NP-40 al 0,5%
 - 0,1 μ g de proteínasa-K/ μ l

Tampón TAE :

- 20 ml de Modified Tris-Acetate EDTA buffer Concentrate (50X) (Millipore, USA)
- 80 ml de agua destilada

Tampón de carga 6X:

- 0,25% de azul de bromofenol
- 40% (p/V) de sucrosa en agua

Agarosa al 2%:

- 2 g de Agarosa NuSieve® uGTG®T, de BioWhittaker Molecular Applications
- 100 ml de Tampón TAE

MATERIAL Y MÉTODOS

3.11.2. Reactivos utilizados en las técnicas de hibridación

NaOH/EDTA (NaOH 1 N EDTA 0.5mM):

- NaOH 4 N.....10ml
- EDTA 500 mM.....2ml
- Agua.....100ml

Tampón 20 X SSC

- NaCl.....17,53 g
- Citrato sódico.....8,82g
- Agua.....100ml
- Ajustar a pH = 7 con NaOH 10N

Solución Denhardt's 50X

- Ficoll5 gr
- PVP.....5 gr
- Albumina Bovina (Fracción V).....5 gr
- Agua.....500 ml
- Filtrar y alicuotar en crioviales (25 µl) y guardar a -20°C

PBS 2X, SDS 2%, 1mM EDTA, Denhardt's 5X

- PBS.....20 gr (2 frascos)
- SDS.....20 gr
- EDTA 0,5 M..... 2 ml
- Denhardt's 50X.....100 ml (5X)
- Agua.....c.s.p 1 l

Solución de lavado 1(PBS 2X, EDTA 1mM)

- Agua.....1 l
- PBS.....20 gr
- EDTA 0.5 M.....2 ml

Solución de lavado 2 (PBS 2X, EDTA 1mM, 1% SDS)

- Agua.....1 l
- PBS.....20gr
- EDTA 0.5 M.....2ml
- SDS10gr

MATERIAL Y MÉTODOS

Mezcla de deshibridación: SDS 5% y SSC 1X

- SDS.....25 gr
- SSC 20X..... 25 ml
- Agua.....c.s.p 500ml

MATERIAL Y MÉTODOS

4. RESULTADOS

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

4.1. Análisis de la población a estudio y del grupo control

Se incluyeron en este estudio un total de 234 mujeres con VPH detectable. De ellas, 177 acudieron a una consulta de patología cervical y estaban en seguimiento durante al menos 3 años por atipia o displasia cervical asociada a la infección del VPH. Se consideró grupo control a las 57 mujeres restantes que acudieron a una cita de cribado oportunista de cáncer de cérvix, con citología normal e infección por VPH 16 y sin seguimiento posterior.

Las características generales de la población estudiada se resumen en la tabla 18.

Tabla 18. Características generales de la población

| | n | Edad (años) | Tiempo de seguimiento (meses) |
|-----------------------------------|-----|------------------------------------|-------------------------------|
| Pacientes con patología | 177 | 37.4 ± 9.2 (19-76) | 65.6±42.8 |
| ASCUS | 14 | 41.4 ± 4.2 (22-76) | 77.5±12.4 |
| LSIL | 71 | 35.7 ± 2.8 (19-61) ^(a) | 47.8±34.4 |
| HSIL | 92 | 38.1 ± 9.17 (19-71) ^(b) | 79.2±77.1 |
| Controles | 57 | 35.3 ± 4.9 (20-64) ^(c) | Control puntual |
| Total pacientes estudiados | 234 | 36.4± 7.1 (19-76) | |

*p<0.05 entre a y b, y b y c.

La edad media de las pacientes estudiadas fue de 36.4±7.1 años con un rango que osciló entre los 19 y los 76 años. Como se puede observar, la edad media de las mujeres con HSIL fue significativamente mayor que la de las que tenían LSIL y las pertenecientes al grupo control (p=0.01). También destaca que el 51.9% (92/177) de las pacientes con patología presentaron una lesión epitelial de alto grado (HSIL) al inicio del estudio.

Por otro lado, se observa que el tiempo de seguimiento fue menor de forma significativa en las pacientes con LSIL cuando se comparan con las que tuvieron HSIL (p=0.006).

El grupo de pacientes con ASCUS no se consideró en las comparaciones anteriores por ser pequeño (n=14).

Debido al rango de edad tan grande la población se estratificó de acuerdo a su edad en menores de 30, de 31 a 35 y mayores de 35 años. Se tomaron estos grupos de edad de acuerdo con las actuales edades de comienzo del cribado del cáncer de cuello de útero según se explica en el apartado de material y métodos.

La tabla 19 y la figura 20 muestran la distribución de las lesiones que tuvieron las pacientes al comienzo del estudio estratificadas según la edad.

RESULTADOS

Tabla 19. Distribución de las lesiones intraepiteliales en función de la edad

| | ASCUS | LSIL | HSIL |
|------------|-------|------|------|
| ≤30 años | 5 | 27 | 21 |
| 31-35 años | 1 | 10 | 21 |
| >35 años | 8 | 34 | 50 |

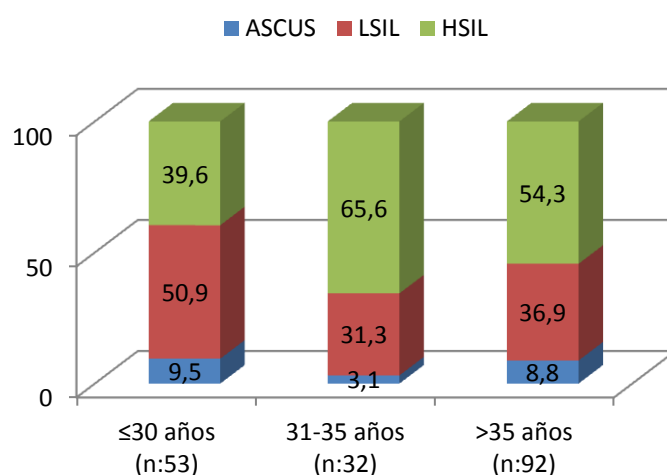


Figura 20. Distribución de las lesiones en función de la edad (en porcentaje)

Se observa que las pacientes con edades entre 31 y 35 años tuvieron significativamente más HSIL que las menores de 30 años ($p=0.02$).

4.2. Distribución de genotipos de VPH según la de edad

La distribución de los distintos genotipos de VPH y su relación en las pacientes con seguimiento con la edad estratificada se detallan en la tabla 20. En la tabla se consignan los resultados de VPH16, VPH 18 y de las familias $\alpha 6$ VPH, $\alpha 7$ VPH y $\alpha 9$ VPH, los genotipos de alto riesgo que no se genotiparon a pesar de realizar la hibridación o secuenciación del producto amplificado se agruparon en VPH AR y en las pacientes en que se detectó al menos dos genotipos diferentes en la misma muestra se reflejan en la tabla como VPH mixtos (tabla 20 y figura 21).

RESULTADOS

Tabla 20. Distribución de genotipos detectados en función de la edad (30 años)

| | VPH 16 | VPH 18 | $\alpha 6$ VPH | $\alpha 7$ VPH | $\alpha 9$ VPH | VPH AR | VPH mixtos | TOTAL |
|----------------------------------|------------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------|------------|------------|
| ≤ 30 años | 27 (50.9%) | 4 | 4 | 0 | 15 (28.3%) | 2 | 1 | 53 (29.9%) |
| 31-35 años | 15 (46.8%) | 1 | 1 | 4 | 7 (21.8%) | 2 | 2 | 32 (18.2%) |
| >35 años | 44 (47.8%) | 5 | 5 | 2 | 27 (29.3%) | 5 | 4 | 92 (51.9%) |
| Total | 86(48.6%) | 10 (5.6%) | 10 (5.6%) | 6 (3.3%) | 49(27.7%) | 9 (5.1%) | 7 (3.9%) | 177 |

$\alpha 6$: VPH 53, 56 y 66; $\alpha 7$: VPH 45 y 68; $\alpha 9$: VPH 31, 33, 35, 52 y 58

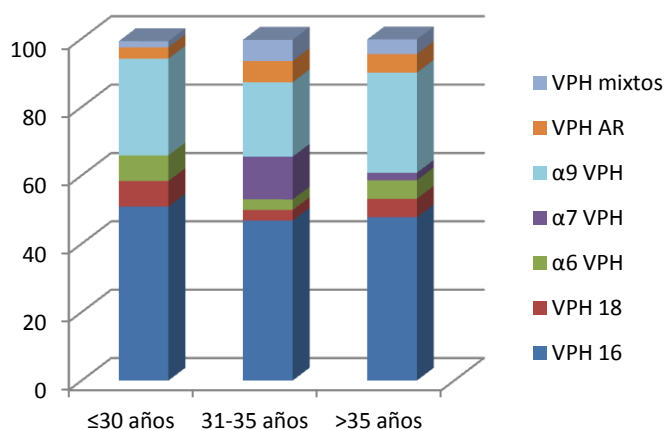


Figura 21. Distribución de los genotipos de VPH en función de la edad

Se observa que el genotipo más frecuente fue el VPH 16 (48.6%) seguido de los genotipos de su familia $\alpha 9$ VPH (27.7%). No se observan diferencias significativas entre los distintos genotipos con los límites de edad establecidos.

La distribución de los genotipos dentro de las familias $\alpha 6$ VPH, $\alpha 7$ VPH y $\alpha 9$ VPH se muestran en la tabla 21. Los genotipos que aparecen sombreados en gris corresponden a los genotipos de alto riesgo incluidos en la nueva vacuna nonavalente.

Tabla 21. Distribución de genotipos de las distintas familias

| | $\alpha 6$ VPH | | | $\alpha 7$ VPH | | $\alpha 9$ VPH | | | | | TOTAL |
|----------------------------------|----------------|--------|--------|----------------|--------|----------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | VPH 53 | VPH 56 | VPH 66 | VPH 45 | VPH 68 | VPH 31 | VPH 33 | VPH 35 | VPH 52 | VPH 58 | |
| ≤ 30 años | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 6 | 2 | 1 | 2 | 4 | 19 |
| 31-35 años | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 12 |
| >35 años | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 7 | 5 | 5 | 4 | 6 | 35 |
| Total | 4 | 3 | 4 | 5 | 1 | 14 | 9 | 7 | 7 | 12 | 66 |

RESULTADOS

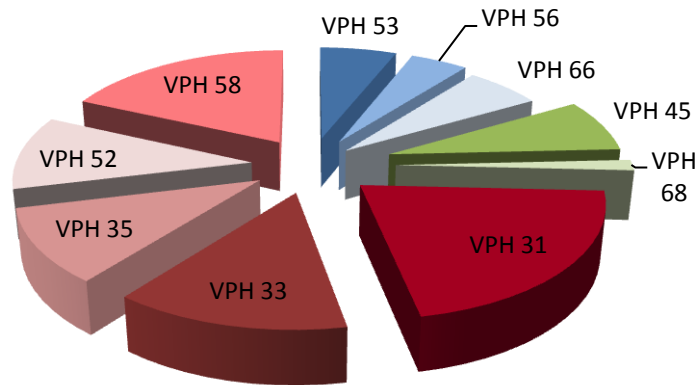


Figura 22. Distribución de los genotipos de VPH dentro de las distintas familias

Dentro de los genotipos de la familia $\alpha 9$ VPH, los más frecuentes fueron el VPH 31 (28.5%) y el VPH 58 (24.5%). Destaca que 4 de los 5 VPH 45 se detectaron en mujeres con edades comprendida entre 31 y 35 años.

Se observa que de las 66 mujeres con genotipos conocidos no 16/18, 47 (71.2%) mujeres tuvieron genotipos incluidos en la vacuna nonavalente, de ellas 24 (51%) tuvieron edades iguales o inferiores a 35 años.

4.3. Distribución de genotipos según la lesión epitelial y la evolución de las pacientes

4.3.1. Genotipo viral y lesión intraepitelial

La distribución de los genotipos detectados y su relación con las atipias y lesiones intraepiteliales estratificando a las mujeres según la edad anteriormente establecida se muestra en la tabla 22.

RESULTADOS

Tabla 22. Distribución genotipos en relación a la lesión epitelial y edad

| | VPH 16 | VPH 18 | α6 VPH | α7 VPH | α9 VPH | VPH AR | VPH mixtos | TOTAL |
|--------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| ASCUS | 5 (35.7%) | 2 (14.2%) | 1(7.1%) | 1 (7.1%) | 5 (35.7%) | 0 | 0 | 14 (7.9%) |
| ≤30 años | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 5 |
| 31-35 años | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| >35 años | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 | 8 |
| LSIL | 32 (45.1%) | 5 (7.0%) | 6 (8.4%) | 1 (1.4%) | 18 (25.3%) | 3 (4.2%) | 6 (8.4%) | 71 (40.1%) |
| ≤30 años | 11 | 3 | 3 | 0 | 8 | 1 | 1 | 27 |
| 31-35 años | 4 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 10 |
| >35 años | 17 | 2 | 3 | 0 | 8 | 1 | 3 | 34 |
| HSIL | 49 (53.3%) | 3 (3.3%) | 3 (3.3%) | 4 (4.3%) | 26 (28.3%) | 6 (6.5%) | 1 (1.1%) | 92 (52.0%) |
| ≤30 años | 14 | 0 | 1 | 0 | 5 | 1 | 0 | 21 |
| 31-35 años | 10 | 1 | 1 | 3 | 5 | 1 | 0 | 21 |
| >35 años | 25 | 2 | 1 | 1 | 16 | 4 | 1 | 50 |
| TOTAL | 86 | 10 | 10 | 6 | 49 | 9 | 7 | 177 |

El VPH 16 y los miembros de su familia se encontraron en el 81.5% (75/92) de los HSIL, en 70.4% (50/71) de los LSIL y en 71.4% (10/14) de los ASCUS. Centrándose únicamente en el VPH 16, éste se encuentra en 53.3% (49/92) de los HSIL, en 45.1% (32/71) de LSIL y en 35.7% (5/14) de los ASCUS (ns).

4.3.2. Evolución de las lesiones intraepiteliales

Como se comentó en el apartado de Material y Métodos se definió una progresión como BIEN cuando la lesión epitelial se redujo o se resolvió y MAL cuando se precisó al menos una intervención quirúrgica para eliminar la lesión. La relación entre genotipos y evolución de las lesiones de las pacientes se muestra en la tabla 23 y la figura 23.

Tabla 23. Distribución de genotipos en relación con la edad y la evolución de la lesión epitelial

| | VPH 16 | VPH 18 | α6 VPH | α7 VPH | α9 VPH | VPH AR | VPH mixtos | TOTAL |
|-------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| BIEN | 26 (41.2%) | 8 (12.7%) | 5 (7.9%) | 3 (4.3%) | 16 (25.4%) | 2 (3.2%) | 3 (4.3%) | 63 (35.5%) |
| ≤30 años | 10 | 4 | 3 | 0 | 7 | 0 | 1 | 25 |
| 31-35 años | 4 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 1 | 10 |
| >35 años | 12 | 4 | 2 | 1 | 6 | 2 | 1 | 28 |
| MAL | 60 (52.6%) | 2 (1.7%) | 5 (4.4%) | 3 (2.6%) | 33 (28.9%) | 7 (6.1%) | 4 (3.5%) | 114 (64.5%) |
| ≤30 años | 17 | 0 | 1 | 0 | 8 | 2 | 0 | 28 |
| 31-35 años | 11 | 1 | 1 | 2 | 4 | 2 | 1 | 22 |
| >35 años | 32 | 1 | 3 | 1 | 21 | 3 | 3 | 64 |

RESULTADOS

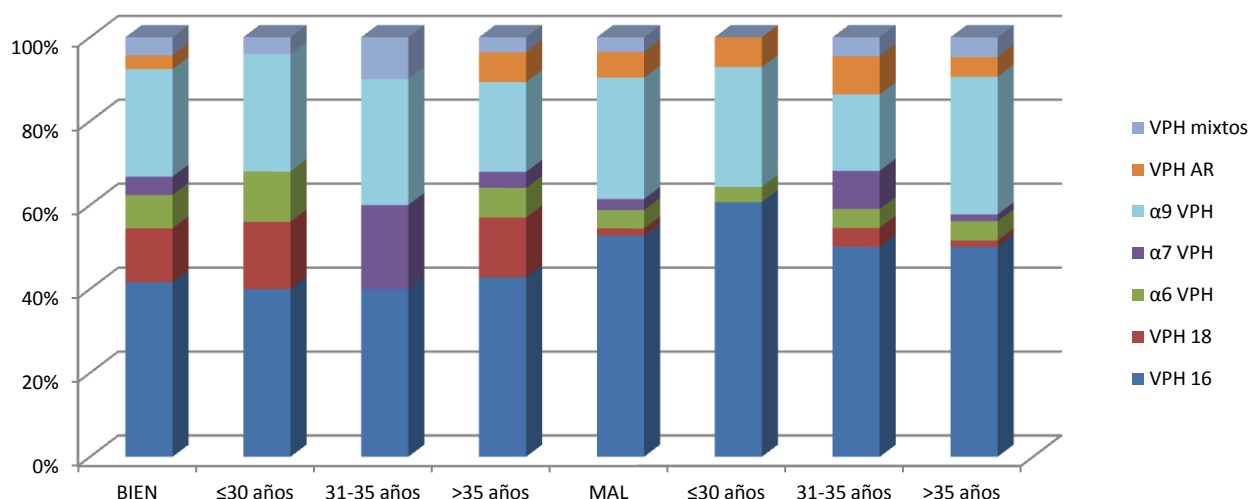


Figura 23. Distribución de los genotipos en función de la edad y evolución de las pacientes

El 64.4% (114) de las pacientes evolucionaron mal. De ellas, 93 (81.6%) estaban infectadas por el VPH 16 u otros genotipos de la familia $\alpha 9$ de ellas, 33 (35.5%) no tenían VPH 16. En las mujeres que tuvieron una buena evolución, el 66.6% (42/63) estaban infectadas por un VPH 16 o de su familia ($p=0.02$).

Atendiendo a la edad y la evolución de las lesiones, de las 53 mujeres menores de 30 años 28 (52.8%) evolucionaron mal, de las 32 con edades entre 31 y 35 fueron 22 (68.7%) y de las mayores de 35 años 64 (69.5%). Destaca que la mayoría de mujeres menores de 30 años que evolucionaron mal estaban infectadas por el genotipo VPH 16 o su familia (25 de 28).

La evolución de las pacientes según el tipo de lesión que tenían se muestra en la tabla 24 y en la figura 24.

Tabla 24. Evolución de las pacientes según la lesión al inicio del estudio

| | ASCUS (n:14) | LSIL (n:71) | HSIL (n:92) |
|------|-----------------|----------------|----------------|
| BIEN | 8 | 38 | 17 |
| MAL | 6 | 33 | 75* |

P=0.0001

RESULTADOS

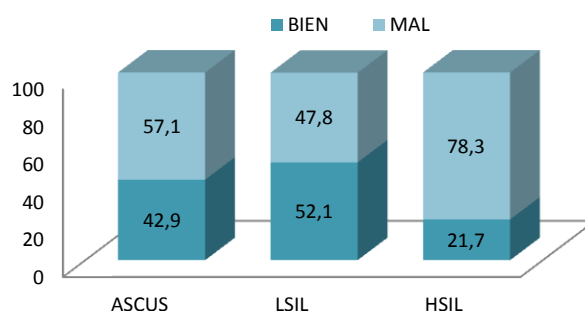


Figura 24. Evolución de las pacientes según la lesión.

Se puede apreciar que las que tuvieron lesiones de alto grado evolucionaron peor que el resto de las pacientes ($p=0.0001$).

4.3.3. Tiempo de progresión y aclaramiento de las lesiones y el virus

a) Regresión

En las 63 mujeres con buena progresión se analizaron los datos del tiempo de regresión de la misma y del aclaramiento del VPH en las 60 que presentaban una infección por un único genotipo (tabla 25 y figura 25). Estos tiempos están condicionados por los protocolos existentes para el seguimiento de estas mujeres por las consultas de patología cervical de los Servicios de Ginecología y Obstetricia.

Tabla 25. Tiempo de regresión de la lesión y de eliminación del VPH en las pacientes que evolucionan BIEN (meses)

| | Tº regresión lesión/Tº aclaramiento VPH | | | | | | Media |
|--------------------------------|--|--|-----------------|--|--|----------------------------------|--|
| | VPH16 (n:26) | VPH 18 (n:8) | α6 VPH (n:5) | α7 VPH (n:3) | α9 VPH (n:16) | VPH AR (n:2) | |
| ASCUS-Normal (n:6) | 11 (4-18) ¹ 13 (8-18) ² | 8 ¹ 18 ² | 0 | 3 ¹ 0 ² | 0 | 8 ¹ 6 ² | 8.2±5.9 (3-18) ¹ 14.6±5.7 (8-18)(4) ² |
| LSIL- Normal (n:34) | 15.2 (3-40) ¹ 13.3 (4-39) ² | 20.5 (3-40) ¹ 11 (3-19) ² | 7.4 (8-10) 8 | 0 | 12.1 (7-30) ¹ 16.4 (3-58) ² | 8 ¹ 6 ² | 13.6±10.4 (2-40) ¹ 12.9±11.9 (3-58)(28) ² |
| HSIL- Normal (n:20) | 15.8 (6-38) ¹ 13.7 (6-32) ² 14.7±10.1 (3-40) ¹ 13.7±10 (4-39) ² | 10.5 (6-15) ¹ 16 (10-22) ² 14.8±9.5 (3-40) ¹ 13.4±11 (3-22) ² | 0 | 10.5 (4-17) ¹ 12 (4-17) ² | 6.8 (6-11) ¹ 18.2 (6-54) ² 10±8.7 (4-30) ¹ 16.4±14.7 (3-58) ² | 0 | 12.5±8.8 (4-38) ¹ 14.9±12.7 (4-54)(17) ² 12.2±9.6 (2-40) ¹ 13.7±11.8 (3-54)(49) ² |

1: Tiempo de regresión de la lesión

2: Tiempo de eliminación del virus

RESULTADOS

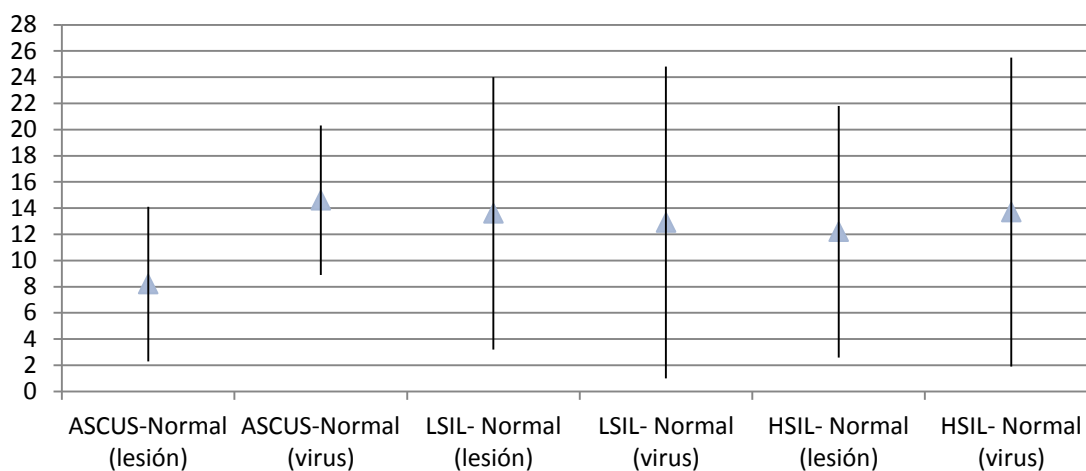


Figura 24. Gráfico del tiempo en meses de la regresión de las lesiones y del virus

El tiempo medio de regresión de todas las lesiones fue entorno a los 12 meses, siendo ligeramente inferior en los ASCUS. De las pacientes con un HSIL 20 (21.7%) aclararon la misma espontáneamente, así como 34 (47.8%) de los LSIL y 6 (42.8%) de los ASCUS ($p=0.0017$).

Únicamente 11 (18.3%) pacientes no fueron capaces de eliminar el virus a pesar de haber eliminado la lesión. En general el tiempo de eliminación del virus es ligeramente superior al de eliminación de la lesión.

b) Conización

La evolución y distribución de genotipos de las 114 pacientes que fueron intervenidas quirúrgicamente se muestra en la tabla 26.

Tabla 26. Distribución de genotipos en relación con la mala evolución de las pacientes

| | VPH 16 | VPH 18 | $\alpha 6$ VPH | $\alpha 7$ VPH | $\alpha 9$ VPH | VPH AR | VPH mixtos | TOTAL |
|---------------------|--------|--------|----------------|----------------|----------------|--------|------------|-------|
| IQ bien* | 52 | 1 | 5 | 2 | 29 | 7 | 3 | 99 |
| IQ reducen** | 4 | 1 | 0 | 1 | 4 | 0 | 1 | 11 |
| IQ HSIL*** | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| TOTAL | 60 | 2 | 5 | 3 | 33 | 7 | 4 | 114 |

*Tras una intervención quirúrgica (IQ) resuelven la lesión. ** Tras una IQ reducen la gravedad de la lesión inicial.

*** Tras una IQ se mantiene la lesión HSIL.

RESULTADOS

El 86.8% (99/114) de las pacientes necesitaron solo una intervención quirúrgica para eliminar la lesión. El VPH 16 fue de nuevo el genotipo más frecuente (52.6%). En 11 (11.1%) de las 99 mujeres que resuelven la lesión tras la conización se detecta VPH en el seguimiento. También se encontró en 9 de las 11 pacientes que redujeron la lesión. Hubo cuatro mujeres que a pesar de sufrir varias conizaciones no fueron capaces de resolver la lesión epitelial. Todas tuvieron una infección causada por el genotipo VPH 16.

El tiempo de aclaramiento del virus tras la intervención quirúrgica para eliminar la lesión se muestra en la tabla 27. En este caso no se incluyeron las infecciones mixtas.

Tabla 27. Tiempo de aclaramiento del VPH en meses tras la intervención quirúrgica

| | VPH16 (n:60) | VPH 18 (n:2) | α6 VPH (n:5) | α7 VPH (n:3) | α9 VPH (n:33) | VPH AR (n:7) | Media |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------------------|
| IQ/Bien (n:96) | 12,9 (3-53) | 6,5 (6-7) | 11 (7-23) | 13,5 (6-25) | 8,4 (4-22) | 12,1 | 11.1±9.3 (3-53) (85/96) |
| IQ/Reducen (n:10) | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 6(2/10) |
| IQ/HSIL (n:4) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0(0/4) |

De las 94 pacientes que tras la intervención quirúrgica aclaran la lesión, 85 (90.4%) eliminan también el virus en los controles posteriores a la conización, realizados en un tiempo medio de 11 meses. Sin embargo de las 11 pacientes que redujeron su lesión pero no la eliminaron tras la intervención quirúrgica únicamente 2 (18.1%) eliminaron el virus. Tampoco aclararon el virus las 4 pacientes que mantuvieron la lesión tras la conización, todas ellas infectadas por un VPH 16.

4.3.4. Infecciones mixtas

En la tabla 28 se puede observar los genotipos, el grado de lesión y la edad de las pacientes que presentaron infecciones mixtas. Estas se detectaron en 7 (3.95%) de las mujeres con seguimiento por lesiones intraepiteliales.

Tabla 28. Distribución de genotipos en las infecciones mixtas (Edad/años)

| | VPH 16/66 | VPH 16/31 | VPH 16/33 | VPH 16/35 | VPH 18/52/68 | VPH 31/68 | VPH 35/53 |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| LSIL | 1 (26a)* | 1 (36a)* | 1 (35a)* | 1 (41a)** | 1 (41a)** | | 1 (35a)** |
| HSIL | | | | | | 1 (53a)** | |

*Pacientes que evolucionan BIEN

**Pacientes que necesitan una IQ para resolver la infección

RESULTADOS

En todas las infecciones mixtas se detectó el VPH 16 o algún genotipo de su familia.

Seis de las 7 las infecciones mixtas se detectaron en mujeres seguidas con lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL). Respecto a su evolución 3 de ellas resolvieron la lesión y 4 necesitaron una intervención quirúrgica para eliminarla.

4.4. Influencia de otros virus en la evolución de las pacientes

Se estudió la existencia de coinfección del VPH con los virus Epstein-Bar (EBV), Adenovirus (ADV), Citomegalovirus (CMV) por sus características de latencia y oncogenicidad. Esta posible coinfección se estudió en 132 muestras pertenecientes a 71 pacientes del grupo con patología cervical y en 42 pacientes del grupo control, no encontrándose coinfección en ninguna de las mujeres.

Por otra parte se revisaron las historias clínicas de las mujeres para comprobar su posible coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la influencia de éste en la evolución de éstas pacientes.

Así de las 177 pacientes con patología únicamente 77 tenían una determinación serológica frente al VIH. De éstas, tan sólo 8 fueron VIH positivas. El resumen de la situación de estas pacientes y su evolución se muestra en la tabla 29.

Tabla 29. Características de las pacientes VIH positivas

| Paciente | Procedencia | Edad | Estadio VIH | Genotipo | Variante T350G | Lesión | Tº persistencia (meses) | Intervención quirúrgica | Resolución | |
|----------|-------------|------|-------------|-------------|----------------|--------|-------------------------|-------------------------|------------|------------|
| | | | | | | | | | Citologica | Virologica |
| 1 | Guinea | 40 | C3 | VPH16 | No | HSIL | 34 | Si | Si | No |
| 2 | Brasil | 40 | C3 | VPH18/52/68 | | HSIL | 29 | Si | No | No |
| 3 | España | 45 | B3-C3 | VPH56 | | LSIL | 43 | Si | Si | Si |
| 4 | Guinea | 42 | | VPH35/VPH52 | | HSIL | 23 | Si | Si | No |
| 5 | España | 39 | C2 | VPH33 | | HSIL | 48 | Si(2) | No | No |
| 6 | Guinea | 40 | C3 | VPH16 | No | HSIL | 20 | Si(2) | No | No |
| 7 | España | 31 | C3 | VPH58 | | HSIL | 41 | Si | Si | No |
| 8 | España | 35 | B3 | VPH16 | No | HSIL | 65 | No | No | No |

La distribución de genotipos fue muy heterogénea. El 87.5% de la pacientes presentaron una lesión de alto grado. La única paciente que presentó un LSIL fue la única capaz de eliminar la lesión y negativizar la detección de VPH.

RESULTADOS

4.5. Influencia de la carga viral en la evolución de las pacientes

Por motivos relacionados con la fecha de inicio y final del estudio se dispuso de los resultados de la carga viral (CV) en 104 muestras pertenecientes a 76 mujeres seguidas y en 35 del grupo control. Se estratificó la CV según los logaritmos de copias/1000 células en <4 log (10^4 copias/1000 células), 4-6 log (10^4 - 10^6 copias/1000 células) y >6 log (10^6 copias/1000 células), de acuerdo con un trabajo realizado en el laboratorio (Álvarez Argüelles et al, 2015). La relación de la carga viral máxima de cada paciente con las lesiones intraepiteliales se muestra en la tabla 30.

Tabla 30. Relación entre la lesión y la carga viral

| | < 4 log | 4 - 6 log | >6log | |
|-------------------------|---------|-----------|-------|----------|
| ASCUS (n: 6) | 6 | 0 | 0 | |
| LSIL (n: 32) | 10 | 17 | 5 | p=0.0009 |
| HSIL (n:37) | 9 | 18 | 10 | p=0.01 |
| CONTROLES (n:35) | 3 | 12 | 19 | p=0.01 |

En el grupo control 19 (54.2%) mujeres presentaban CV superior a 6 logaritmos frente a 15 (21.7%) de las mujeres con patología (p=0.01) con CV mayores de 6 log. La mayoría de las pacientes con lesiones tuvieron CV entre 4-6 log. No hubo diferencias significativas en la carga viral entre aquellas que presentaban lesiones más graves (HSIL) y las que no (LSIL).

Se analizó el valor de la carga viral como marcador de evolución. Para ello se incluyeron 30 de las 56 mujeres infectadas por VPH 16 ya que era necesario disponer de dos o más CV realizadas en su seguimiento. Estas pacientes se muestran coloreadas en amarillo en las tablas 31 y 32 que resumen las características más relevantes de la evolución de las pacientes con determinaciones de carga viral infectadas por un VPH 16 según la resolución de sus lesiones.

RESULTADOS

Tabla 31. Evolución de la carga viral en las pacientes infectadas por VPH 16 que resuelven la lesión

| PACIENTE | EDAD | LESION | T350G | CARGA VIRAL/muestra (logaritmos) | | | | | Persistencia* | Aclaramiento [#] | |
|----------|------|--------|-------|----------------------------------|------|------|------|-----|---------------|---------------------------|-----|
| 1 | 35 | ASCUS | G | POS | 4.37 | 1.87 | | | 19 | | |
| 2 | 36 | HSIL | G | 6.25 | 4 | NEG | | | 17 | | |
| 3 | 39 | HSIL | G | 5.81 | POS | NEG | NEG | | 38 | 13 | |
| 4 | 27 | HSIL | G | POS | POS | 4.15 | 3.93 | | 27 | | |
| 5 | 29 | HSIL | T | 4.04 | NEG | NEG | NEG | NEG | 7 | 7 | |
| 6 | 74 | HSIL | T | POS | POS | 3.44 | | | 27 | | |
| 7 | 35 | HSIL | T | POS | POS | NEG | NEG | POS | 5.27 | 3.7 | NEG |
| 8 | 28 | LSIL | G | NEG | NEG | NEG | 1.43 | | | | |
| 9 | 34 | LSIL | G | 7.22 | POS | NEG | NEG | NEG | 18 | 9 | |
| 10 | 26 | LSIL | G | NEG | POS | 6.08 | NEG | | 17 | 12 | |
| 11 | 35 | LSIL | G | 4.51 | POS | | | | 22 | | |
| 12 | 36 | LSIL | G | 5.78 | POS | NEG | | | 29 | 23 | |
| 13 | 19 | LSIL | G | NEG | 5.29 | NEG | NEG | | 8 | 8 | |
| 14 | 52 | LSIL | G | NEG | NEG | 3.61 | 2.95 | 2.9 | 14 | | |
| 15 | 26 | LSIL | G | 4.97 | 1.65 | POS | POS | | 24 | | |
| 16 | 29 | LSIL | G | NEG | NEG | 1.65 | NEG | | 3 | 3 | |
| 17 | 36 | LSIL | T | 5,32 | 4,83 | | | | 19 | | |
| 18 | 41 | LSIL | T | 6.62 | POS | NEG | | | 21 | 14 | |
| 19 | 24 | LSIL | T | POS | POS | POS | 2.85 | | 27 | | |
| 20 | 23 | LSIL | T | 5.05 | POS | NEG | NEG | | 12 | 9 | |

LSIL: Pacientes que evolucionan hasta HSIL a lo largo del sseguimiento.

*Persistencia: Tº en meses que persiste el VPH.

[#]Aclaramiento: Tº en meses que tarda en que se negativiza la determinación de VPH.

RESULTADOS

Tabla 32. Evolución de la carga viral en las pacientes que necesitan una intervención para resolver la lesión

| PACIENTE | EDAD | LESION | T350G | CARGA VIRAL/muestra | | | | | Persistencia* | Aclaramiento# | |
|----------|------|--------|-------|---------------------|-------|-------|------|-------|---------------|---------------|-----|
| 1 | 23 | HSIL | G | 5.69 | NEG | POS* | 4,56 | | | 8 | |
| 2 | 40 | HSIL | G | NEG | POS* | NEG | 5.84 | 5.27* | POS | 15 | |
| 3 | 28 | HSIL | G | 3.68 | 5.2 | *POS | NEG | | | 30 | 6 |
| 4 | 24 | HSIL | G | POS | POS | 5.0* | | | | 12 | |
| 5 | 42 | HSIL | G | POS | 5.64 | 5.54 | * | | | 25 | |
| 6 | 30 | HSIL | G | POS | POS* | 6.52 | 5.91 | *NEG | | 40 | 9 |
| 7 | 37 | HSIL | G | POS | POS | POS | 4.02 | *NEG | | 16 | 7 |
| 8 | 23 | HSIL | G | NEG | POS | NEG* | 5.22 | | | | |
| 9 | 28 | HSIL | G | 4.75 | 6.25 | *4.54 | | | | 53 | |
| 10 | 47 | HSIL | G | 5.78 | *5.1 | POS | 5.1 | 4.73 | | 56 | |
| 11 | 25 | HSIL | G | POS | 6.98* | NEG | NEG | | | 22 | 11 |
| 12 | 49 | HSIL | G | *NEG | POS | POS | 3.66 | 4.24* | | 18 | |
| 13 | 36 | HSIL | G | POS | POS* | NEG | POS | POS | 6.1 | | |
| 14 | 24 | HSIL | G | POS | 6.66 | *NEG | NEG | NEG | 6 | 15 | 10 |
| 15 | 53 | HSIL | G | 4.36 | *NEG | NEG | NEG | NEG | | 15 | 15 |
| 16 | 41 | HSIL | T | POS | POS | POS | 3.88 | | | 24 | |
| 17 | 40 | HSIL | T | **4.97 | POS | 2.14 | 4.86 | | | 31 | |
| 18 | 57 | HSIL | T | POS | 4.97* | NEG | NEG | | | 43 | 35 |
| 19 | 52 | HSIL | T | *NEG | *NEG | NEG | NEG | NEG | 3.7 | 6 | |
| 20 | 40 | HSIL | T | 4.31 | POS | *4.78 | NEG | | | 24 | 8 |
| 21 | 48 | HSIL | T | NEG | NEG | POS | 6.47 | | | 25 | |
| 22 | 40 | HSIL | T | **POS | POS | 5.02 | 6.27 | | | 22 | |
| 23 | 20 | HSIL | T | POS | NEG | POS | 4.64 | 4.56* | | 16 | |
| 24 | 33 | LSIL | G | 4.44 | POS | POS* | NEG | | | 27 | 13 |
| 25 | 23 | LSIL | G | 6.44 | POS* | POS | NEG | NEG | NEG | 15 | 5 |
| 26 | 47 | LSIL | G | NEG | 6.27 | *NEG | NEG | NEG | | 8 | 8 |
| 27 | 40 | LSIL | G | 4.31 | POS* | NEG | NEG | | | 19 | 10 |
| 28 | 36 | LSIL | G | 5.42 | POS | POS* | NEG | NEG | | 24 | 8 |
| 29 | 31 | LSIL | G | *POS | POS | NEG | 3.83 | | | 17 | |
| 30 | 24 | LSIL | G | 5.84 | 5.15 | *NEG | | | | 23 | 19 |
| 31 | 22 | LSIL | T | POS | NEG | POS* | POS | POS | 3.3 | 9 | NEG |
| 32 | 37 | LSIL | T | 5.32 | 7.5 | *POS | POS | | | 22 | |
| 33 | 34 | LSIL | T | POS | 4.07* | NEG | NEG | | | 28 | 16 |
| 34 | 24 | LSIL | T | POS | 4.71 | NEG | POS* | NEG | NEG | 34 | 7 |
| 35 | 30 | LSIL | T | 5.34 | POS | *POS | NEG | NEG | NEG | 27 | 18 |
| 36 | 56 | HSIL | T | NEG | NEG* | NEG | NEG | NEG | 2.7 | 5 | |

LSIL: Pacientes que evolucionan hasta HSIL a lo largo del seguimiento.

*: Momento de la intervención quirúrgica.

*Persistencia: Tº en meses que persiste el VPH.

#Aclaramiento: Tº en meses que tarda en que se negativiza la determinación de VPH.

RESULTADOS

La tabla 33 muestra el resumen de los datos de evolución de la lesión según la variación de la carga viral.

Tabla 33: Resumen de la evolución de la carga viral en las pacientes con VPH 16

| | Negativo (n) | CV mantenida (n) | disminución CV (n) | log CV disminución (log de copias/1000 células) | IC (95%) |
|-------------|-----------------|---------------------|-----------------------|--|-----------------|
| BIEN | 11 | 2 | 3 | 3,68±2,33 | -2.3-4 |
| ASCUS | 0 | 0 | 1 | 2,5 | |
| LSIL | 7 | 2 | 1 | 4,22±2,49 | |
| HSIL | 4 | 0 | 1 | 2,77±2,18 | |
| MAL | 0 | 14 | 0 | -0,024±1,27 | -0.7-0.8 |
| LSIL | 0 | 2 | 0 | -0,75±2,02 | |
| HSIL | 0 | 12 | 0 | 0,003±0,83 | |

Las 14 mujeres que evolucionaron mal tuvieron una carga viral media de 5.12 ± 0.75 logaritmos de copias/1000 células frente a 4.07 ± 0.78 logaritmos de copias/1000 células de las 16 que evolucionaron bien ($p=0.0008$); además mantuvieron esta carga viral elevada persistentemente a lo largo del seguimiento, su descenso medio fue de -0.024 ± 1.27 ($-2.72-1.71$) logaritmos de copias/1000 células. Sin embargo de las 16 mujeres con una buena evolución, 14 disminuyeron la misma o la negativizaron ($p<0.0001$), en éstas el descenso medio de la carga viral fue de 3.68 ± 2.33 ($0.22-6.62$) logaritmos de copias/1000 células. El intervalo de confianza al 95% de las mujeres con mala evolución fue de 0,7 logaritmos. Por el contrario, el límite inferior del intervalo de confianza del 95% fue de 2.3 log.

4.6. Influencia de la integración del genoma del VPH 16 en la evolución de las pacientes

Se realizó la determinación del estado del genoma del VPH 16 en 149 muestras pertenecientes a 58 pacientes y a 45 mujeres sin patología. Los resultados de esta determinación según la evolución de las mismas y los controles se muestran en la tabla 34.

Tabla 34. Relación de la integración y la evolución de la lesión epitelial

| | Episomal | Integrado | Mixto |
|------------------|----------|-----------|-------|
| BIEN | 26 | 0 | 1 |
| MAL | 72 | 3 | 2 |
| CONTROLES | 40 | 3 | 2 |
| TOTAL | 138 | 6 | 5 |

RESULTADOS

En el 92.6% de los casos el genoma estaba de forma episomal. La relación del estado del genoma del VPH 16 y el grado de lesión en el momento de su detección a lo largo del seguimiento se muestra en la tabla 35 y la figura 26.

Tabla 35: Distribución del estado del genoma del VPH 16 según la lesión

| | Episomal | Integrado | Mixto |
|------------------|----------|-----------|-------|
| Controles | 40 | 3 | 2 |
| Citología Normal | 37 | 2 | 2 |
| ASCUS | 4 | 1 | 0 |
| LSIL | 28 | 0 | 1 |
| HSIL | 24 | 0 | 0 |

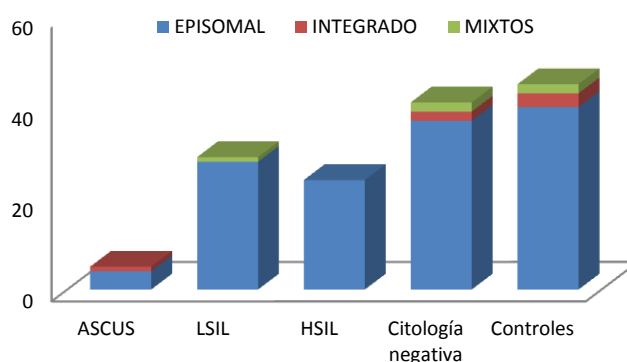


Figura 26. Estado del genoma del VPH 16 según grado de la lesión donde se detecta.

Destaca que ninguna de las muestras dónde se detecta el genoma integrado se encuentra en una lesión de alto grado. Los casos de las pacientes en las que el genoma se encontró integrado y tuvieron mala evolución se detalla a continuación.

Paciente 1: HSIL persistente (1 año) y VPH 16 en forma episomal en dos muestras realizadas con un intervalo de 8 meses se le realizó una conización. En la muestra posterior a la intervención quirúrgica (6 meses después) se le detectó VPH16 con genoma integrado en una infección mixta con otros genotipos (VPH 35 y 58). En las muestras posteriores no volvió a detectarse VPH.

Paciente 2: 18 meses después de una conización por una lesión HSIL por VPH16 episomal, le reaparece otra lesión HSIL y se le detecta un VPH16 con genoma integrado.

RESULTADOS

Paciente 3: Tras una lesión LSIL persistente por un VPH 16 episomal se le realizó una conización. A los 13 meses de la intervención se le detecto un VPH 16 integrado y citología negativa.

Paciente 4: Tras 12 meses con una lesión LSIL por un VPH 16 en forma episomal es sometida a una intervención quirúrgica y en el control posterior se detecta un VPH 16 en forma mixta en una citología negativa.

Paciente 5: HSIL que presenta una forma mixta del VPH 16 tras la cual la paciente es intervenida y posteriormente no se detecta ni lesión ni virus.

Paciente 6: Lesión LSIL con un VPH 16 en forma mixta que tras 15 meses negativiza sin necesidad de intervención quirúrgica.

Las 4 primeras pacientes pasan de una forma episomal o mixta a una forma integrada del genoma.

4.7. Linajes y polimorfismos del gen E6 del VPH16

Se realizó la secuenciación del gen E6 en 63 muestras positivas para VPH 16 pertenecientes a 40 pacientes y a 14 controles, y se obtuvo la secuencia completa para realizar la filogenia y el análisis de los polimorfismos del gen E6. La figura 27 muestra la relación filogénica de los genotipos analizados.

RESULTADOS

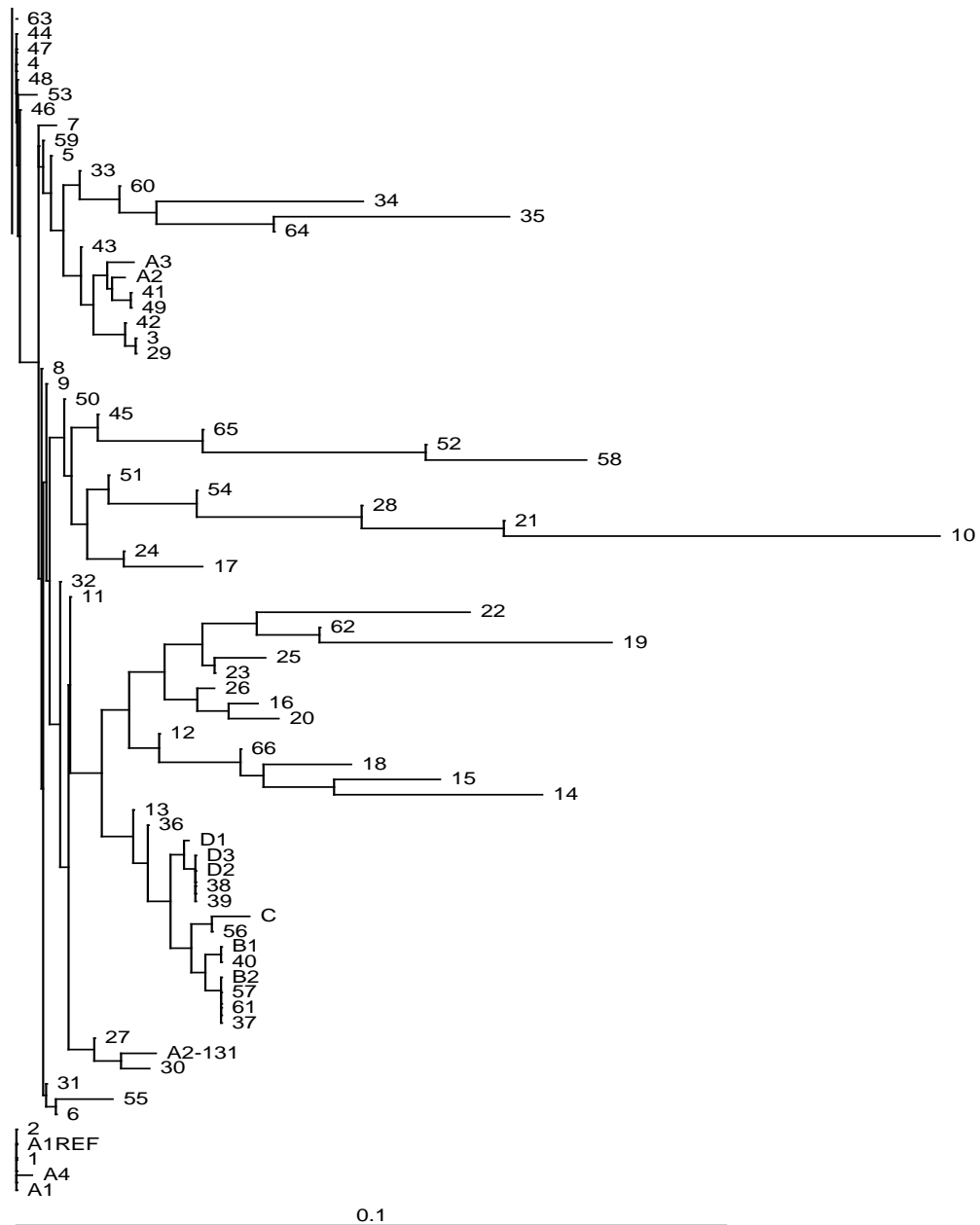


Figura 27. Árbol filogenético de las muestras secuenciadas y secuencias patrón de cada linaje.

En la tabla 36 se muestran los distintos polimorfismos del gen E6 agrupados a su vez por las distintas variantes. En el grupo de prototipo europeo (EP) se incluye el sublinaje A1 y en el grupo de variantes europeas (EV) están incluidos los sublinajes (A2, A3 y A4). Por otro lado en las variantes no europeas (NE) están incluidos los linajes B, C y D y todos los sublinajes correspondientes.

RESULTADOS

Tabla 36. Polimorfismos de los VPH 16 en el gen E6 según la evolución

| | CONTROL | BIEN | MAL | |
|------------------|------------------------------------|------|---------|--------|
| | | | IQ BIEN | IQ MAL |
| EP (n:23) | 6 | 8 | 8 | 1 |
| EV (n:31) | 7 | 7 | 13 | 4 |
| 1 MUT | 350G | 5 | 7 | 4 |
| | 132T | 1 | | |
| 2 MUT | 109C+350G | | 2 | |
| | 256A+289G | 1 | | |
| NE (n:9) | | 1 | 6 | 1 |
| 4MUT | 286A+289G+335T+350G | 1 | | |
| 5 MUT | 145T+286A+289G+335T+350G | | 2 | |
| | 143G+145T+286A+289G+335T | | 1 | |
| 6 MUT | 131G+143G+145T+286A+289G+335T | | 1 | 1 |
| | 145T+286A+289G+335T+350G+532G | | 2 | |
| 7 MUT | 109C+132T+143G+145T+286A+289G+335T | 1 | | |

EP: Prototipo Europeo; EV: Variantes Europeas; NE: No Europeas

MUT: Mutaciones

De las 63 secuencias analizadas, 54 (85.7%) pertenecieron al linaje Europeo, y de ellas 31 (49.2%) pertenecieron a alguna variante de este linaje.

Los prototipos europeos evolucionaron bien en 8 (47.1%) de 17 casos mientras que las variantes lo hicieron en 7 (29.2%) ocasiones de 24 y los no europeos en 1 (12.5%) de 8.

Dentro de las variantes del linaje Europeo el 90% tenían una única mutación siendo mayoritariamente la variante T350G.

Nueve (14.2%) de las secuencias tuvieron 4 o más mutaciones, perteneciendo éstas a los linajes no europeos (africanos, NA y AA).

La paciente que presenta 7 mutaciones tiene cambios específicos de distintos linajes (europeos y africanos), lo que podría indicar coinfección de ambos linajes.

Se detectaron 2 secuencias del sublinaje AA1, distinguible del linaje NA y el sublinaje AA2 por la presencia de la mutación 532G en el gen E6, que pertenecían a la misma paciente que tuvo mala evolución. El resto de las variantes no europeas presentaban mutaciones correspondientes a los linajes africanos. Destaca que todos estos linajes excepto una paciente control, necesitaron de al menos una intervención quirúrgica para eliminar la infección.

Respecto a la evolución de las pacientes, la presencia del linaje prototipo europeo se observó indistintamente en las pacientes con buena y mala evolución, sin embargo las variantes se observaron más frecuentemente en aquellas pacientes con mala evolución. En

RESULTADOS

estas mujeres que evolucionaron peor, fueron frecuentes las mutaciones G145T, T286A, A289G y C335T, además de la T350G.

4.8. Influencia de la variante T350G del VPH16 en la evolución de las pacientes

Se estudió la presencia de la variante T350G del VPH 16 mediante una técnica de discriminación alélica descrita previamente en el apartado de material y métodos en 161 muestras pertenecientes a 62 pacientes y a 38 controles. La relación de este marcador con la gravedad de las lesiones se muestra en la tabla 37.

Tabla 37. Distribución de la variante T350G según la lesión intraepitelial.

| | T350G | T350T |
|--------------------------|--------------|--------------|
| ASCUS (n:4) | 2 (50%) | 2 (50%) |
| LSIL (n:17) | 8 (47%) | 9 (53%) |
| HSIL (n: 41) | 26 (63.4%) | 15 (36.6%) |
| CONTROLES (n: 38) | 14 (36.8%) | 24 (63.2%) |

Se detectó la variante T350G en el 63.4% de las mujeres que presentaron un HSIL, porcentaje significativo cuando se compara con el resto de las mujeres ($p=0.04$) y en el mismo porcentaje se detectó el prototipo en el grupo control no habiendo diferencias significativas con el resto de las mujeres con patología ($p=0.06$).

La relación entre la presencia de esta variante y la evolución de las pacientes se muestra en la tabla 38.

Tabla 38. Relación de la variante y la evolución de la lesión epitelial

| | T350G | T350T |
|---------------------|--------------|--------------|
| BIEN (n: 21) | 11 (52.4%) | 10 (47.6%) |
| MAL (n: 41) | 25 (60.9%) | 16 (39.1%) |

No hubo diferencia significativa en la frecuencia de esta mutación en las mujeres según su evolución, ya que los porcentajes de mujeres portadoras de la variante T350G fueron similares en los dos grupos de pacientes. También se pudo observar que la presencia de la variante se mantuvo a lo largo del seguimiento (tablas 31 y 32).

5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La infección de transmisión sexual (ITS) más común es la producida por el virus del papiloma humano (VPH). Este virus es además el principal agente etiológico infeccioso asociado con el cáncer de cuello uterino y otros cánceres como el de vulva, vagina, pene o ano, además también puede causar cáncer orofaríngeo. A pesar de que se han desarrollado estrategias para su prevención como las vacunas y el cribado, el problema que plantea el manejo y el seguimiento de las mujeres infectadas sigue existiendo: la instauración de las vacunas no ha solventado la infección por otros tipos de VPH oncogénicos, y de hecho en algunos países ya se dispone de la vacuna nonavalente, compuesta por 9 genotipos oncogénicos (Riethmuller et al, 2015); respecto al cribado existen varios protocolos donde todos parecen estar de acuerdo que la determinación del VPH es la técnica ideal, pero que discrepan en el comienzo de la edad de aplicación (SEGO, 2014; WHO, 2014; Burd et al, 2016). El principal problema que se plantea en el cribado, y cuya solución sigue siendo motivo de investigación, es su capacidad pronóstica, pues cada vez es mayor el número de mujeres jóvenes infectadas por VPH que evolucionan más rápidamente a lesiones de alto grado. Dentro de los factores de progresión que pueden ayudar a mejorar ese pronóstico se encuentran los llamados cofactores virales, características propias o intrínsecas del virus que influyen en el desarrollo de la infección. Por tanto, se planteó este trabajo con el fin de valorar esos cofactores virales en un seguimiento de al menos tres años de mujeres infectadas por VPH con atipia o displasia cervical.

Como era lógico esperar, en un primer análisis de la población a estudio, se pudo constatar que las mujeres que tienen un seguimiento continuado son mujeres con lesiones, mayoritariamente con estadíos avanzados (HSIL) por la preocupación que causa su lesión en cuanto a su evolución, a su posible resolución (conización) y a su recaída.

Sin embargo, un dato sorprendente es que estas mujeres no eran muy mayores al comienzo del estudio.

La edad media de las mujeres fue de 37 años. En este primer enfoque de la población a estudio se observó que la edad media de las mujeres con HSIL fue significativamente mayor que la de las mujeres con LSIL y las pertenecientes al grupo control. Pero cuando la edad se estratificó se observó que el rango de edad donde hubo más pacientes con HSIL fue de 31-35 años. En esta franja de edad dos de cada tres presentaban esta patología. Estos datos alertan sobre la presencia de lesiones graves en mujeres jóvenes antes de lo sospechado y apunta a que los controles deberían comenzar primero.

DISCUSIÓN

En el caso de las 14 mujeres con ASCUS al principio del estudio, a pesar de que su edad fue mayor no se tuvo en cuenta en términos estadísticos por ser un grupo pequeño.

El que haya lesiones en mujeres más jóvenes puede deberse al cambio de los hábitos sexuales, que pasa por un inicio precoz de las relaciones sexuales y un mayor número de parejas, lo que se traduce en un aumento de la tasa de infección por el VPH en la población (Castellsagué et al, 2012). Aunque la mayoría de las lesiones se aclaran espontáneamente, el riesgo de progresión es más alto cuanto antes comienzan las relaciones sexuales. Así lo demuestra un estudio que incluyó 80000 mujeres con edades comprendidas entre 10 y 70 años, donde se observó que la frecuencia más alta de lesiones intraepiteliales se encontraba en la franja de edad de 10 a 19 años (Braaten et al, 2008). Esto sugiere y apoya que el cribado debería de comenzar antes, como ya lo indican otros autores (Kjaer et al, 2014).

Por otro lado, las pacientes con ASCUS y HSIL tuvieron tiempos de seguimiento más largos que las que presentaron LSIL. Esto es lógico en las pacientes con HSIL, debido a la gravedad de la lesión y a los tratamientos que requirieron estas mujeres (intervención quirúrgica) que se realizaron de acuerdo con la guía de la SEGO (SEGO, 2014). En las pacientes con ASCUS, el mayor tiempo de seguimiento se puede explicar por su mayor edad, ya que los porcentajes de aclaramiento de la infección por VPH disminuyen al aumentar la misma y tienen un mayor riesgo de desarrollar lesiones de alto grado que las pacientes más jóvenes (Erika et al, 2012). De hecho en la última guía de la Sociedad Española de Ginecología para la prevención del cáncer de cuello de útero, tras una citología con ASCUS se recomienda un seguimiento durante 2 años para valorar posibles progresiones de la lesión (SEGO, 2014). Otros estudios de seguimiento de ASCUS han demostrado que estos en un 20% evolucionan a CIN 2 O CIN 3. Estos hallazgos indican que las mujeres con ASCUS tienen que tener un seguimiento más estrecho y prolongado (www.aepcc.es).

Así pues, los datos de seguimiento de mujeres con ASCUS y HSIL son los esperables, aunque por causas distintas: unas para controlar que no progresan (ASCUS), las otras para evitar que recaigan tras la conización (HSIL).

DISCUSIÓN

5.1. Distribución de genotipos y su influencia en la evolución de la población estudiada y coinfección

Si se analizan los datos en función de los genotipos del VPH encontrados se comprueba que el VPH 16 fue el genotipo más frecuente en la población estudiada, seguido de los genotipos 31, 58, 18, 33, 52 y 35. Cabe destacar que muchos de estos genotipos pertenecen a la misma familia que el VPH 16 (VPH 31, 33, 35, 52 y 58). Estos datos son similares a un trabajo realizado recientemente sobre 40382 mujeres donde encontraron como genotipo más prevalente el VPH 16, seguido del VPH 52, 31 y 18 (Kjaer et al, 2014). En otros estudios tras el VPH 16, los genotipos más frecuentes fueron los VPH 18 y 45 (Joura et al, 2014; de Sanjosé et al, 2010; Guan et al, 2012).

Tanto el VPH 16 como los genotipos más frecuentes se detectaron con la misma frecuencia en todos los rangos de edad establecidos. El elevado porcentaje de mujeres jóvenes con una infección por VPH 16 sugiere que la edad de cribado con una prueba de detección genómica de VPH se debería adelantar a edades inferiores a 30 años, como ya se apuntaba anteriormente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la SEGO en sus últimas guías sobre el cribado del cáncer de cuello uterino proponen que el seguimiento se haga a partir de los 30 años con una prueba VPH (SEGO, 2014; WHO, 2014). Incluso en otros lugares como en Estados Unidos, la Sociedad de Ginecología Oncológica y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical recomiendan un cribado mediante técnicas de detección genómica cada 3 años a partir de los 25 años (Burd et al, 2016).

En el caso de los genotipos de la familia $\alpha 9$ también se observó una distribución similar en los rangos de edad estudiados, lo que indica que los genotipos de la familia del VPH 16 tienen el mismo comportamiento que éste. Actualmente en España existen dos vacunas comercializadas frente al VPH, una bivalente, Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals), frente a los genotipos VPH 16 y 18 y otra tetravalente, Gardasil® (Sanofi Pasteur MSD), que incluye además de los genotipos anteriores, los VPH 6 y 11 causantes de las verrugas genitales. Estas vacunas han mostrado un gran potencial para el control de la infección por VPH 16, 18, 6, 11. En Australia, donde la cobertura vacunal es alta, se ha visto una reducción del 77% en la prevalencia de la infección por genotipos de VPH incluidos en la vacuna en mujeres jóvenes, además la incidencia de HSIL en mujeres menores de 18 años descendió de un 0.85% en 2006 a un 0.22% en 2009 (Hartwig et al, 2015). Sin embargo la alta frecuencia de circulación de los genotipos de la familia $\alpha 9$ VPH podría favorecer el aumento de su incidencia y si se mantiene en vigor la vacuna actual podrían ocupar el nicho ecológico del VPH 16.

DISCUSIÓN

Recientemente se ha aprobado por la FDA y la EMA una vacuna nonavalente (Gardasil® 9) que protege frente a los VPH 31, 33, 45, 52 y 58 además de a los 4 genotipos anteriores (Riethmuller et al, 2015; Van de Velde et al, 2012).

En este estudio el 26.5% de las mujeres estaban infectadas por genotipos no 16 pertenecientes a la familia $\alpha 9$ incluidos en la nueva vacuna nonavalente, que sumadas a las infectadas por VPH 16/18 alcanzan una prevalencia del 80.8%. Según estos resultados la vacuna nonavalente, que incluye todos los genotipos de la familia $\alpha 9$ excepto el VPH 35, sería de gran utilidad en la prevención del cáncer de cérvix. En un estudio llevado a cabo en Francia observaron que la vacuna nonavalente superaría en efectividad a la tetravalente frente a la prevención del cáncer invasivo y las lesiones de alto y bajo grado (Riethmuller et al, 2015). Hartwig et al observaron que el 89.0% de los cánceres anuales que se producen en Europa están causados por algún genotipo incluido en esta vacuna (Hartwig et al, 2015), datos que se asemejan a los encontrados en este trabajo considerando todo tipo de lesiones, no solamente los cánceres. Un estudio de predicción de la efectividad de la vacuna nonavalente estima que en Canadá prevendría 171200 diagnósticos de HSIL y 4700 carcinomas in situ a lo largo de 70 años si se asume una cobertura vacunal del 70% (Van de Velde, 2012).

Por lo tanto, la implantación de la vacuna tendría unas consecuencias importantes en el control de la infección de los VPH más frecuentemente relacionados con la progresión a cáncer de cérvix. Sin embargo, no hay que olvidar que todavía el 20% de las mujeres quedarían desprotegidas y a expensas de la evolución viral, al que se sumaría un porcentaje nada despreciable de mujeres que por estar ya infectadas no se beneficiarían de la vacuna. De ahí que el diagnóstico de la infección por VPH y la búsqueda de factores de progresión debe continuar.

El VPH 16 también fue, como se esperaba, el genotipo más frecuente en todas las lesiones intraepiteliales seguido de los genotipos de su familia: juntos se detectaron en más del 80% de los HSIL. Diversos estudios observan que los genotipos VPH 31, 33, 35, 52 y 58 (todos pertenecientes a la familia $\alpha 9$) son más frecuentes en HSIL que en lesiones de bajo grado, mientras que los genotipos VPH 39, 51, 56, 59 y 68 son los menos frecuentes y se encuentran mayoritariamente en mujeres sin alteraciones citológicas (Guan et al, 2012; Joura et al, 2014). Otros autores también observaron que la prevalencia de los genotipos de la familia $\alpha 9$ aumentó al incrementar el grado de las lesiones, y la infección por genotipos como VPH 39, 51, 53, 56, 66 y 68 raramente se observa en lesiones HSIL (Kjaer et al, 2014). En este

DISCUSIÓN

trabajo también se puede comprobar que los genotipos VPH 35, VPH 56, VPH 66 y VPH 68 están presentes pero en muy baja frecuencia y que disminuye en las lesiones de alto grado.

La prevalencia de genotipos VPH 18 y VPH 45 fue baja, hecho previamente observado en nuestro entorno (de Oña et al, 2010). Sin embargo, un estudio a nivel mundial en mujeres infectadas por VPH observó que los genotipos 18 y 45 fueron más frecuentes en mujeres con carcinomas invasivos de cérvix que en mujeres con HSIL, además se detectaban más frecuentemente en biopsias que en cepillados endocervicales, concluyendo que estos dos genotipos se infravaloran en los HSIL si no se realiza la detección de VPH en la biopsia tomada para estudio histológico (Guan et al, 2012). Este hecho explicaría porque en este seguimiento hay una baja proporción de estos genotipos ya que todas las muestras estudiadas fueron cepillados endocervicales.

Aunque eran pocos casos, los VPH 45 se detectaron en mujeres jóvenes (31-35 años) y en lesiones de alto grado (4 de 5). De Sanjosé et al en el metaanálisis anteriormente citado observó que este genotipo se encuentra más frecuentemente en mujeres jóvenes y es raro en pacientes con LSIL y citologías sin alteraciones (Sanjosé et al, 2010).

Uno de los aspectos más importantes de este estudio es contar con mujeres con un seguimiento, que aunque puede parecer escaso (al menos 3 años) permite analizar parámetros de evolución de la infección.

En lo que se refiere a la evolución de las pacientes se pudo comprobar que un tercio de las mujeres lograron resolver su infección espontáneamente. Esta tasa de resolución fue mayor en las mujeres menores de 30 años con lesiones leves (LSIL y ASCUS). En el resto de pacientes las tasas de regresión fueron similares. La resolución de la lesión ocurrió en un tiempo medio de un año: 13.6 meses en las pacientes con LSIL, 12.5 en las pacientes con HSIL, y 8.2 meses en aquellas con ASCUS. Resultados similares a un estudio de 2010 que publicó tasas de regresión de lesiones en mujeres jóvenes de CIN2/3 a CIN1 o negativo del 28% en 15 meses (Moscicki et al, 2010). Similares también a otro estudio que tenían tiempos de aclaramiento de las lesiones de 11 meses (Goodman et al, 2008).

Atendiendo al genotipo infectante el tiempo de regresión fue de 14.1 meses en las pacientes infectadas con VPH 16 y algo inferior, 8.8 meses, con el resto de genotipos. Estos resultados indican que la regresión de las lesiones escamosas se produce en un tiempo inferior a dos años, pasado este tiempo, la permanencia de la lesión puede sugerir una persistencia de la infección, lo que implicaría una mala evolución. En el tiempo de seguimiento del estudio 11

DISCUSIÓN

mujeres no lograron eliminar el virus. En estos casos el seguimiento debe continuar por el riesgo de recaídas.

Finalmente, en cuanto a la evolución, 22 mujeres tuvieron una progresión de su lesión. El tiempo medio de progresión hasta lesiones de alto grado, fue de 8.8 meses en las mujeres con una infección por genotipos VPH 16 y 18, mientras que para el resto de genotipos fue de 14.1 meses. En un metaanálisis se observó que las mujeres con un genotipo 16 y 18 tienen mayor riesgo de evolucionar más rápidamente a lesiones de alto grado (De Sanjosé, 2013; De Sanjosé, 2008). El hecho de que haya pocas mujeres que progresen es porque la población a estudio tenía lesiones graves mayoritariamente y se suelen intervenir rápidamente al menor síntoma de progresión.

En este estudio, 114 (64.4%) pacientes necesitaron una intervención quirúrgica para eliminar la lesión. De ellas, 93 (81.6%) estaban infectadas por VPH 16 o miembros de su familia ($\alpha 9$). Tras la conización, 99 pacientes tuvieron buena evolución en los controles citológicos posteriores y hasta el final del estudio a pesar de que 9 de ellas no aclararon el VPH. Once mujeres redujeron la lesión a LSIL tras la intervención quirúrgica, 9 de ellas mantuvieron la infección por VPH persistente. Solo 4 pacientes mantuvieron hasta el final del estudio la misma lesión e infección tras la conización. En resumen, 99 pacientes resolvieron la lesión, 11 la redujeron y 4 la mantuvieron. Únicamente 22 (19.2%) pacientes tuvieron una infección persistente hasta el final del estudio por el VPH, estas mujeres, como se dijo anteriormente deben seguir con sus controles periódicos.

Los resultados son similares a otros descritos en la literatura donde en un 10-30 % de los casos de conización la infección por VPH persiste a los 6 meses, lo que indica un mayor riesgo de aparición de lesión con respecto a las pacientes que eliminan la infección. En este sentido la guía europea para prevención del cáncer de cérvix ya propone que el seguimiento postratamiento se realice mediante una prueba de detección genómica ya que predice el fallo de tratamiento más rápidamente que el seguimiento citológico (Arbyn et al, 2010) y ésta prueba debería realizarse periódicamente y en intervalos más cortos que los que indican los protocolos actuales, que lo alargan hasta 1 año, para evitar recidivas o confirmar el aclaramiento.

Esta descrito que tras la conización existen tasas de recidiva de lesiones intraepiteliales de hasta el 15% (Kye Hyun et al, 2009). Se consideran como factores que influyen en estas recidivas la edad, el grado de la lesión previa al tratamiento, la menopausia, que los márgenes de la pieza de la cirugía estén limpios de lesión y la carga viral previa al tratamiento así como la

DISCUSIÓN

persistencia de una infección por un genotipo VPH 16, (Kreimer et al, 2007). Sin embargo otras publicaciones concluyen que ni la edad, ni la gravedad de la lesión previa a la conización influyen en la persistencia de la infección, mientras que sí lo hacen el genotipo de VPH infectante y la carga viral previa a la conización, siendo el genotipo VPH 16 el que más se relaciona con la persistencia (Nam et al, 2009). En este estudio cuatro pacientes fueron intervenidas en al menos 2 ocasiones y a pesar de ello mantuvieron la lesión inicial (HSIL), todas estaban infectadas por VPH 16.

Respecto a las infecciones mixtas solo 7 (3.95%) de las mujeres en seguimiento presentaron una infección por varios genotipos de VPH, encontrándose sobre todo en mujeres con lesiones de bajo grado y con una edad media de 38 años. Estas infecciones estaban causadas por 2 genotipos de alto riesgo y tan solo en uno de los casos se encontraron 3 genotipos diferentes. Siempre al menos uno de los genotipos coinfectantes era VPH 16 o pertenecía a su familia.

Las tasas de infecciones mixtas descritas en la literatura son muy variadas, oscilando entre el 20-30% (Mendez et al, 2006; Vacarella et al, 2011; Thomas et al, 2000; Wentzensen et al, 2014; Salazar et al, 2015) aunque hay autores que llegan a describir 79.2% (Del Rio-Ospina et al, 2015), la gran variación en la tasa de infecciones mixtas descritas puede deberse al tipo de población estudiada según sus factores de riesgo y si la detección se realiza en un estudio de corte de prevalencia (transversal) o en el contexto de un seguimiento de mujeres infectadas. En un estudio mundial, se estimó que la tasa de infecciones mixtas en Europa era de un 7% (de Sanjosé et al, 2010), porcentaje ligeramente superior al encontrado en este trabajo.

Se ha mostrado interés en conocer si la coinfección del VPH con otros virus latentes o implicados también en procesos oncológicos, como el EBV, ADV y CMV favorece la progresión de las lesiones (Ammatuna et al, 2000; Lau et al, 2009; Marinho-Dias et al, 2013; Gallo A et al, 2009). En este estudio no se detectó en ningún caso (ni en pacientes ni en mujeres del grupo control) el genoma de éstos virus, lo que sugiere que las tasas de estas coinfecciones son muy bajas o al menos no se detecta en las mujeres con una infección persistente por VPH.

También se analizó la infección de VPH en 8 mujeres que estaban infectadas por VIH, se observó que tuvieron infecciones más largas y graves por diferentes genotipos (16, 58, 33, 35, 56, 52, 68, 18), no todos incluidos en la nueva vacuna nonavalente. A pesar de que la mayoría de las pacientes estuvieran a tratamiento frente al VIH y resolvieran las lesiones citológicas, no fueron capaces de negativizar la infección por VPH, a excepción de una, que

DISCUSIÓN

tuvo la lesión más leve. Además hubo 2 pacientes que no resolvieron la lesión después de conizaciones repetidas. Estos resultados están en consonancia con numerosos autores que encuentran que las pacientes VIH positivas presentan lesiones más graves que la población general (Teixeiro et al, 2012; Zhang et al, 2012). Un estudio publicado en 2016 propone que la modulación de las citocinas producidas por el VIH, favorece una infección persistente por el VPH (Kriek et al, 2016).

5.2. Cofactores virales y seguimiento de las pacientes

Aunque mucho se ha avanzado en el conocimiento de la infección por VPH, todavía no se ha conseguido un marcador que pueda predecir con total seguridad la evolución de la infección. Uno de los marcadores más prometedores es la determinación de la carga viral, tan útil en infecciones por otros virus como el VIH, VHC, CMV,... y cada vez más presente en los laboratorios de Microbiología.

En un primer análisis de la carga viral (expresado en log de copias/1000 células) puede sorprender que el grupo control tuvo cargas virales de VPH más altas que el grupo de mujeres con lesiones (>6log vs 4-6log). Sin embargo, en el comienzo de la infección cabe esperar una replicación muy activa del virus. De hecho, este resultado está en consonancia con otras publicaciones que relatan que cargas virales más altas son necesarias para que el sistema inmune elimine la infección y propone que el aclaramiento de una infección por VPH 16 va precedida de un pico transitorio de carga viral (Monnier-Benoit et al, 2006).

Este dato parece confirmar que una carga viral única no es un marcador de predicción, por lo que se necesitan seguimientos periódicos para evaluar su eficacia. De hecho, se pudo observar que las pacientes que necesitaron ser intervenidas tuvieron cargas virales consecutivas mantenidas y no excesivamente elevadas, en algunos casos incluso tras la intervención quirúrgica. Por otro lado, las pacientes que aclararon el virus, tuvieron cargas virales iniciales altas pero disminuyeron rápidamente o se negativizaron. Estos resultados se asemejan a lo publicado en un trabajo donde las mujeres con infección por VPH 16 con cargas virales más bajas, pero mantenidas, tenían más frecuentemente una lesión de alto grado (Del Rio-Ospina et al, 2015). Otros autores también observaron que mujeres con una infección persistente tenían cargas virales más bajas, aunque mantenidas, que aquellas con infecciones transitorias (Manawapat et al, 2012).

DISCUSIÓN

Otro trabajo en 2012 concluyó que hay una relación entre un aumento progresivo de la carga viral en muestras consecutivas de mujeres con lesiones que van progresando hasta CIN3. En este estudio establecieron una regresión lineal entre la carga viral y el tiempo en días de progresión de la lesión y observaron que había una diferencia estadísticamente significativa de las cinéticas de las pacientes que tenían una infección transitoria y aquellas que progresaban hasta CIN3 (Depuydt et al, 2012). Estos autores en un estudio posterior intentan demostrar que la carga viral es un buen biomarcador para diferenciar entre mujeres que tienen una infección en regresión y mujeres con infecciones persistentes. Vieron que las mediciones seriadas de carga viral podían agruparse en lineales y no lineales. Las cargas virales con una relación lineal en descenso pertenecían a pacientes que estaban en regresión de la lesión (Depuydt et al, 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo avalan estos datos, ya que de las 30 pacientes válidas para evaluar la CV como cofactor de evolución, las 14 que necesitaron una intervención quirúrgica tuvieron CV entre 4-6 log mantenidas y por el contrario 13 pacientes con regresión de las lesiones disminuyeron o negativizaron la CV a lo largo del seguimiento. La significación estadística de estos resultados es un valor añadido para definir la CV del VPH como un cofactor viral de progresión de las lesiones intraepiteliales y por lo tanto su determinación en el seguimiento de las pacientes infectadas por VPH tiene un valor pronóstico de gran importancia y utilidad clínica. Se hace hincapié en el seguimiento ya que también se demuestra, como publican otros estudios, que una única determinación de la CV no tiene valor pronóstico aunque esta sea elevada (Constandinou-Williams et al, 2010).

Aunque el número de mujeres es pequeño, los datos de este estudio también concluyen por medio de herramientas estadísticas que un seguimiento periódico con un descenso menor de 1log es pronóstico de mala evolución y por el contrario un descenso de 2.5log o no detectar el virus en un segundo control se relaciona con una buena evolución. Son necesarios más estudios en este campo para confirmar estos resultados.

Otro marcador viral a estudio es la integración del genoma viral en el genoma celular. Se determinó la forma de genoma (episomal o integrado) en 149 muestras con VPH 16 que pertenecían a 58 pacientes con lesiones intraepiteliales y 45 mujeres pertenecientes al grupo control, en el 92 % de las muestras estudiadas se detectó la forma episomal no habiendo diferencias entre las pacientes con distintas alteraciones anatomopatológicas comparadas con las del grupo control, ni tampoco hubo relación con la evolución de las pacientes. A pesar de que está aceptado que la integración del genoma del VPH 16 en el del hospedador es un factor

DISCUSIÓN

que contribuye al desarrollo de las lesiones, hay teorías contradictorias ya que algunos autores observan que la integración se produce casi exclusivamente en HSIL y carcinomas invasivos (Tono et al, 2001; Hudelist et al, 2004), mientras que otros proponen que hay una integración temprana en los LSIL y las infecciones asintomáticas (Kulmala et al, 2006; Andersson et al, 2005; Gallo et al, 2003).

Por último, como marcador intrínseco de la progresión de la infección se propuso el análisis del gen E6. En 63 muestras pertenecientes a 40 pacientes y 14 controles se secuenció el gen E6 del VPH 16 para conocer su linaje y las posibles alteraciones que explicasen una mala evolución, ya que existen varios estudios que muestran una asociación de las variantes no europeas (NE), sobre todo las Asio-Americana (AA) y Africana (Af) con lesiones más graves y un mayor riesgo de progresión e invasión que las variantes europeas (EV) (Sichero et al, 2007; Xi et al, 2007). De ellas, 54 (85.7%) secuencias pertenecieron al linaje Europeo y casi la mitad de éstas (49.2%) presentaban alguna variante del mismo. Las 9 secuencias restantes (14.3%) fueron no europeas (NE), 7 pertenecían a alguna variante africana y 2 se correspondían con una variante AA. Las mujeres infectadas con VPH 16 pertenecientes a estos linajes NE tuvieron una mala evolución excepto una, que pertenecía al grupo control, sería necesario realizar el seguimiento de esta paciente.

El escaso número de muestras estudiadas no permite deducir nada significativo, aunque los datos sugieren que variantes europeas y linajes no europeos parecen evolucionar peor que los prototipos europeos. Varios estudios también encuentran una elevada proporción de variantes Europeas que alcanzan hasta el 86%. Además observan que esta variante se mantiene a lo largo del tiempo en la evolución de las pacientes (Zuna et al, 2009; Geraets et al, 2013). En este estudio se demostró esta persistencia en 9 mujeres a las que se le pudo realizar la secuenciación del gen E6 en al menos dos muestras a lo largo del seguimiento.

Destaca que una de las pacientes del estudio estaba infectada por un VPH 16 que presentaba mutaciones que correspondían a dos linajes diferentes (una variante europea y una africana) lo que puede indicar una coinfección por 2 linajes distintos, aunque ya se ha publicado que la tasa de infección por múltiples variantes es muy baja (Geraets et al, 2013).

Las variantes del VPH se definen por unos pequeños cambios de nucleótidos en su secuencia cuando se comparan con la secuencia de referencia. Ésta en el caso del VPH 16 es la primera que se secuenció y se le denominó prototipo (EP) no implicando ninguna importancia biológica (Zuna et al, 2009). Ya que el estudio de variantes no parecía concluyente, se

DISCUSIÓN

analizaron los cambios en los distintos nucleótidos en relación con el prototipo europeo con el fin de comprobar si algún cambio genómico se relacionaba con mala evolución. Como se comentaba anteriormente, el escaso número de muestras limitó este estudio. Sin embargo, se pudo constatar que las mutaciones G145T, T286A, A289G, C335T y T350G eran frecuentes en mujeres que evolucionaron mal y precisaron una intervención quirúrgica. Con respecto a este último cambio hay estudios que correlacionan la variante europea (EV) T350G con progresión a cáncer, mientras que otros no encuentran diferencias entre ésta y el prototipo (EP). Algunos estudios asociaban esta mutación con infecciones persistentes y con el desarrollo de lesiones cervicales (Zhang et al, 2015). Otros autores también encontraron que esta mutación se asocia a mayor persistencia de la infección (Cornet et al, 2013).

En este estudio el 46% de las secuencias europeas (E) presentó la variante T350G y se encontró por igual en controles y pacientes.

Además la variante T350G, cuando se determinó por SNP, se detectó de forma significativa en las lesiones más graves. Cuando se estudió la evolución no se encontraron diferencias significativas en la progresión o no de las mujeres portadoras de esta variante tal como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, lo que sí se observó fue que la mutación T350G se detectó en un porcentaje mayor en mujeres con HSIL comparado con el resto y se mantuvo a lo largo del seguimiento de las pacientes, lo que parece indicar que la infección persistente es producida por la misma variante del VPH. Por lo tanto, según estos resultados, no se podría considerar la variante T350G como un cofactor viral de progresión pero sí podría ser un marcador de persistencia de infección por la misma cepa viral.

En resumen, tras la realización de este estudio de mujeres con un seguimiento de al menos tres años por una infección por VPH, se puede observar que las lesiones de alto grado ocurren por igual en mujeres jóvenes y mayores y que por tanto es importante que la edad de comienzo del cribado con pruebas de detección de VPH sea antes de los 30 años y así prevenir estas lesiones encontradas en mujeres jóvenes. El genotipo más frecuente fue el VPH 16 seguido de los miembros de su familia, la mayoría incluidos en la nueva vacuna nonavalente. Respecto a los factores virales de progresión de la infección estudiados: genotipo, carga viral, presencia de la variante T350G y otros polimorfismos del gen E6, según los resultados obtenidos, en los programas de cribado y en los seguimientos de las pacientes infectadas por VPH se deberían utilizar técnicas que permitan conocer el genotipo y la carga viral del mismo. El genotipo permite saber si es un genotipo con alto riesgo de producir lesiones de alto grado y la variación de la CV en un seguimiento con periodos cortos adelantaría el pronóstico de la

DISCUSIÓN

infección: si la CV se mantiene persistente sería un indicador de mala evolución, por el contrario su disminución significaría su aclaramiento. Por último, la detección de los distintos polimorfismos del gen E6 y de la variante T350G en concreto, en distintas muestras pueden confirmar si la infección persistente es causada por la misma cepa viral. Además el diseño de técnicas de discriminación alélica, similares a la empleada para la detección de la variante T350G, permitiría, sin utilizar técnicas de secuenciación, conocer las mutaciones comunes a los linajes no europeos (T286A, A289G y C335T) que tienen peor evolución.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En todos los grupos de edad fue frecuente encontrar lesiones graves (HSIL), por lo que el control de la infección se debe comenzar lo antes posible.
2. El VPH 16 fue el genotipo más frecuente en la población estudiada, seguido de los genotipos de su familia $\alpha 9$ que comprende los VPH 31, 33, 35, 52 y 58.
3. La edad no influyó en la distribución de genotipos.
4. La resolución espontánea de la infección ocurre en un periodo de 1 año, este tiempo es mayor en las lesiones más graves (HSIL) o en las producidas por el VPH 16.
5. La intervención quirúrgica logra altos porcentajes de éxito, aunque en algunos casos el VPH persiste, lo que aconseja controles estrechos tras la conización hasta el aclaramiento del VPH.
6. Las lesiones de alto grado estuvieron producidas fundamentalmente por un solo genotipo de VPH oncogénico; la tasa de infecciones mixtas fue baja.
7. En la población estudiada no se encontraron coinfecciones con otros virus (CMV, EBV o ADV) que se pueden encontrar en lesiones genitales.
8. Hubo pocas mujeres con infección por VIH. Estas mujeres no fueron capaces de eliminar el VPH tras la conización.
9. En un periodo de tiempo inferior a un año tras el primer control positivo y cuantificado para un genotipo oncogénico, la CV se erige como factor pronóstico de resolución o evolución de lesión: la Carga Viral elevada y mantenida se comportó como un cofactor viral de mala evolución. Por otro lado la disminución progresiva de la Carga viral se relacionó con la resolución de las lesiones.
10. La integración del genoma viral en el genoma celular humano fue infrecuente y no se relacionó con la gravedad y evolución de la lesión intraepitelial.
11. La detección de cuatro mutaciones (G145T, T286A, A289G, C335T) siempre presentes en las variantes no europeas, permite identificar fácilmente estos linajes relacionados con mala evolución o progresión de las lesiones.
12. La variante T350G del VPH 16 se detectó de forma continuada en todas las pacientes independientemente de su evolución por lo que se puede considerar un factor viral de persistencia de la infección por la misma cepa.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta P, Muñoz S, Álvarez R, Rodríguez J, Orejuela L, Arboleda Y, Sierra H. Factores de Riesgo Asociados a Cáncer de Cuello Uterino en el Departamento del Cauca. Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad del Cauca. 2004; 6(3)
- Álvarez-Argüelles, M. E., de Oña-Navarro, M., Rojo-Alba, S., Torrens-Muns, M., Junquera-Llaneza, M. L., Antonio-Boga, J., ... & Melón-García, S. (2015). Quantification of human papilloma virus (HPV) DNA using the Cobas 4800 system in women with and without pathological alterations attributable to the virus. *Journal of virological methods*, 222, 95-102.
- Ammatuna, P., Giovannelli, L., Giambelluca, D., Mancuso, S., Rubino, E., Colletti, P., ... & Lima, R. (2000). Presence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in the cervix of women infected with the human immunodeficiency virus. *Journal of medical virology*, 62(4), 410-415
- Andersson, S., Safari, H., Mints, M., Lewensohn-Fuchs, I., Gyllensten, U., & Johansson, B. (2005). Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *British journal of cancer*, 92(12), 2195-2200.
- Arbyn, M., Anttila, A., Jordan, J., Ronco, G., Schenck, U., Segnan, N., ... & Von Karsa, L. (2010). European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. —summary document. *Annals of Oncology*, 21(3), 448-458.
- Arias-Pulido, H., Peyton, C. L., Joste, N. E., Vargas, H., & Wheeler, C. M. (2006). Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *Journal of clinical microbiology*, 44(5), 1755-1762
- Aromseree, S., Pientong, C., Swangphon, P., Chaiwongkot, A., Patarapadungkit, N., Kleebkaow, P., ... & Ekalaksananan, T. (2015). Possible contributing role of Epstein-Barr virus (EBV) as a cofactor in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Journal of Clinical Virology*, 73, 70-76.
- Beca, F., Pinheiro, J., Rios, E., Pontes, P., & Amendoeira, I. (2014). Genotypes and prevalence of HPV single and multiple concurrent infections in women with HSIL. *Diagnostic cytopathology*, 42(11), 919-923.
- Bello BD, Spinillo A, Alberizzi P, et al: Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions. *J Med Virol* 2009;81:703-712.

BIBLIOGRAFÍA

- Bosch, F. X., Broker, T. R., Forman, D., Moscicki, A. B., Gillison, M. L., Doorbar, J., ... & Cuzick, J. (2013). Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. *Vaccine*, 31(SUPPL. 8), 11-131.
- Boulet, G. A., Benoy, I. H., Depuydt, C. E., Horvath, C. A., Aerts, M., Hens, N., ... & Bogers, J. J. (2009). Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia \geq 2 in a liquid-based cytology setting?. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(11), 2992-2999.
- Boulet, G. A., Horvath, C. A., Berghmans, S., & Bogers, J. (2008). Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(4), 810-817.
- Braaten, K. P., & Laufer, M. R. (2008). Human papillomavirus (HPV), HPV-related disease, and the HPV vaccine. *Reviews in obstetrics and gynecology*, 1(1), 2.
- Brinton L, Reeves W, Brenes M, Herrero R, Briton R, Gaitan E, Tenorio F, et al. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol*. 1989;130(3):486-96
- Briolat, J., Dalstein, V., Saunier, M., Joseph, K., Caudroy, S., Prétet, J. L., ... & Clavel, C. (2007). HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *International journal of cancer*, 121(10), 2198-2204
- Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, Brotons M, Mena M, Cosano R, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S, Castellsagué X. ICO information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Spain. Summary Report 2015-03-20
- Burd, E. M. (2016). Human papillomavirus laboratory testing: the changing paradigm. *Clinical microbiology reviews*, 29(2), 291-319
- Burk, R. D., Harari, A., & Chen, Z. (2013). Human papillomavirus genome variants. *Virology*, 445(1), 232-243.
- Castellsagué, X., Iftner, T., Roura, E., Vidart, J. A., Kjaer, S. K., Bosch, F. X., ... & Torcel-Pagnon, L. (2012). Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *Journal of medical virology*, 84(6), 947-956.
- Castellsagué, X., Díaz, M., De Sanjosé, S., Muñoz, N., Herrero, R., Franceschi, S., ... & Meijer, C. J. (2006). Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(5), 303-315.

BIBLIOGRAFÍA

- Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, et al: Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis* 2011;203:910-920.
- Chaturvedi AK, Myers L, Hammons AF, et al: Prevalence and clustering patterns of human papillomavirus genotypes in multiple infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2439-2445.
- Cheung, J. L., Lo, K. W., Cheung, T. H., Tang, J. W., & Chan, P. K. (2006). Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *Journal of Infectious Diseases*, 194(12), 1706-1712.
- Christensen N, Hopfl R, DiAngelo S, Cladel N, Pratrack S, Welsh P, Budgeon L, reedC, kreider J. Assembled baculovirus –expressed human papillomavirus type 11 L1 capsidprotein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* 1994;75:2271-76
- Constandinou-Williams, C., Collins, S. I., Roberts, S., Young, L. S., Woodman, C. B., & Murray, P. G. (2010). Is human papillomavirus viral load a clinically useful predictive marker? A longitudinal study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(3), 832-837.
- Cornet, I., Gheit, T., Clifford, G. M., Combes, J. D., Dalstein, V., Franceschi, S., ... & Clavel, C. (2013). Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. *Infect Agent Cancer*, 8(4).
- Cox, J. T., Castle, P. E., Behrens, C. M., Sharma, A., Wright, T. C., Cuzick, J., & Athena HPV Study Group. (2013). Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: results from the ATHENA HPV study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 208(3), 184-e1.
- Cricca, M., Morselli-Labate, A. M., Venturoli, S., Ambretti, S., Gentilomi, G. A., Gallinella, G., ... & Zerbini, M. (2007). Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecologic oncology*, 106(3), 549-557.
- Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al: Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004;57:68-72.
- Das, D., Bhattacharjee, B., Sen, S., Mukhopadhyay, I., & Sengupta, S. (2010). Association of viral load with HPV16 positive cervical cancer pathogenesis: causal relevance in isolates harboring intact viral E2 gene. *Virology*, 402(1), 197-202.

BIBLIOGRAFÍA

- de Sanjosé S. La investigación sobre la infección por el virus del papiloma humano y el cáncer de cuello uterino en España. pp.141-46. En: El virus del papiloma humano y cáncer: Epidemiología y Prevención. De Sanjosé S, García A, (edr). Editorial EMISA. Madrid. 2006
- de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., ... & Vallejos, C. S. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology*, *11*(11), 1048-1056.
- de Sanjose, S., Wheeler, C. M., Quint, W. G., Hunt, W. C., Joste, N. E., Alemany, L., ... & Castle, P. E. (2013). Age-specific occurrence of HPV16-and HPV18-related cervical cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *22*(7), 1313-1318.
- de Oña, M., Alvarez-Argüelles, M. E., Torrents, M., Villa, L., Rodriguez-Feijoo, A., Palacio, A., ... & Melón, S. (2010). Prevalence, evolution, and features of infection with human papillomavirus: A 15-year longitudinal study of routine screening of a women population in the north of Spain. *Journal of medical virology*, *82*(4), 597-604.
- Del Río-Ospina, L., Soto-De León, S. C., Camargo, M., Moreno-Pérez, D. A., Sánchez, R., Pérez-Prados, A., ... & Patarroyo, M. A. (2015). The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. *BMC cancer*, *15*(1), 1.
- Depuydt, C. E., Criel, A. M., Benoy, I. H., Arbyn, M., Vereecken, A. J., & Bogers, J. J. (2012). Changes in type-specific human papillomavirus load predict progression to cervical cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, *16*(12), 3096-3104.
- Depuydt, C. E., Jonckheere, J., Berth, M., Salembier, G. M., Vereecken, A. J., & Bogers, J. J. (2015). Serial type-specific human papillomavirus (HPV) load measurement allows differentiation between regressing cervical lesions and serial virion productive transient infections. *Cancer medicine*, *4*(8), 1294-1302.
- Dickson EL, Vogel RI, Bliss RL, et al: Multiple-type human papillomavirus (HPV) infections: a cross-sectional analysis of the prevalence of specific types in 309,000 women referred for HPV testing at the time of cervical cytology. *Int J Gynecol Cancer* 2013;*23*:1295-1302.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*, *32*, 7-15.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, *30*, F55-F70.

BIBLIOGRAFÍA

- Federica A, Gomes A, Bonecini M. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomaviruses: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection. *Rev Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2005;100(1):1-12
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. and Bray, F. (2015), Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, 136: E359–E386
- Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, et al: Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol* 2001;64:550-559.
- Flynn, K., & Rimm, D. L. (2001). Diagnosis of "ASCUS" in women over age 50 is less likely to be associated with dysplasia. *Diagnostic cytopathology*, 24(2), 132-136.
- Forman, D., de Martel, C., Lacey, C. J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., ... & Franceschi, S. (2012). Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 30, F12-F23.
- Freitas, L. B., Chen, Z., Muqui, E. F., Boldrini, N. A. T., Miranda, A. E., Spano, L. C., & Burk, R. D. (2014). Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PloS one*, 9(7), e100746.
- Fujii, T., Masumoto, N., Saito, M., Hirao, N., Niimi, S., Mukai, M., ... & Tsukazaki, K. (2005). Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagnostic Molecular Pathology*, 14(2), 103-108.
- Gallo, G., Bibbo, M., Bagella, L., Zamparelli, A., Sanseverino, F., Giovagnoli, M. R., ... & Giordano, A. (2003). Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *Journal of clinical pathology*, 56(7), 532-536.
- Geraets, D. T., van Doorn, L. J., Kleter, B., Colau, B., Harper, D. M., & Quint, W. G. (2013). Long-term follow-up of HPV16-positive women: persistence of the same genetic variant and low prevalence of variant co-infections. *PloS one*, 8(11), e80382.
- Goodman, M. T., Shvetsov, Y. B., McDuffie, K., Wilkens, L. R., Zhu, X., Thompson, P. J., ... & Hernandez, B. Y. (2008). Prevalence, acquisition, and clearance of cervical human papillomavirus infection among women with normal cytology: Hawaii Human Papillomavirus Cohort Study. *Cancer research*, 68(21), 8813-8824
- Gradilone, A., Vercillo, R., Napolitano, M., Cardinali, G., Gazzaniga, P., Silvestri, I., ... & Agliano, A. M. (1996). Prevalence of human papillomavirus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the cervix of healthy women. *Journal of medical virology*, 50(1), 1-4

BIBLIOGRAFÍA

Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, Clifford GM. (2012) Human papillomavirus types in 115,789 HPV positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer.

Guidelines for screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention. WHO guidelines, 2014

Hagensee ME, Olson NH, Baker TS, Galloway DA. Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J. Virol.* 1994;68:4503-05.

Hartwig, S., Baldauf, J. J., Dominiak-Felden, G., Simondon, F., Alemany, L., de Sanjosé, S., & Castellsagué, X. (2015). Estimation of the epidemiological burden of HPV-related anogenital cancers, precancerous lesions, and genital warts in women and men in Europe: Potential additional benefit of a nine-valent second generation HPV vaccine compared to first generation HPV vaccines. *Papillomavirus Research*, 1, 90-100.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, et al: Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005;191:1796-1807.

Huang LW, Chao SL, Chen PH, et al: Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *J Clin Virol* 2004;29:271-276.

Hudelist, G., Manavi, M., Pischinger, K. I., Watkins-Riedel, T., Singer, C. F., Kubista, E., & Czerwenka, K. F. (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecologic oncology*, 92(3), 873-880.

Palefsky, J. (2009). Human papillomavirus-related disease in people with HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 4(1), 52.

Joura, E. A., Ault, K. A., Bosch, F. X., Brown, D., Cuzick, J., Ferris, D., ... & Iversen, O. E. (2014). Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(10), 1997-2008

Kahn J, Rosenthal S, Succop P, Ho G, Burk R. The interval between enarche and age of first exual intercourse as a risk factor for subsequent HPV Infection in adolescent and young adult women. *J. Pediatr.* 2002; 141(5):718-23.

Keating JT and Wang HH. Significance of a diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance for Papanicolaou smears in perimenopausal and postmenopausal women. *Cancer Cytopathology* 2001; 93: 100-105).

BIBLIOGRAFÍA

- Kjær, S. K., Munk, C., Junge, J., & Iftner, T. (2014). Carcinogenic HPV prevalence and age-specific type distribution in 40,382 women with normal cervical cytology, ASCUS/LSIL, HSIL, or cervical cancer: what is the potential for prevention?. *Cancer Causes & Control*, 25(2), 179-189.
- Kriek, J. M., Jaumdally, S. Z., Masson, L., Little, F., Mbulawa, Z., Gumbi, P. P., ... & Williamson, A. L. (2016). Female genital tract inflammation, HIV co-infection and persistent mucosal Human Papillomavirus (HPV) infections. *Virology*, 493, 247-254.
- Kulmala, S. A., Syrjänen, S. M., Gyllensten, U. B., Shabalova, I. P., Petrovichev, N., Tosi, P., ... & Johansson, B. C. (2006). Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *Journal of clinical pathology*, 59(5), 513-517.
- La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Fasoli M, gentile A, Tognoni G. Cigarette smoking and the risk of cervical enoplasia. *Am J Epidemiol*. 1986;123:22-29.
- Lau, H. Y., Twu, N. F., Chen, P. C. H., Lai, C. R., Juang, C. M., Yen, M. S., & Chao, K. C. (2009). The relationship between human papillomavirus and epstein-barr virus infections in relation to age of patients with cervical adenocarcinoma. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 48(4), 370-374.
- Lee SA, Kang D, Seo SS, et al: Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPVVDNAChip. *Cancer Lett* 2003;198:187-192.
- Levi JE, Kleter B, Quint WG, et al: High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 2002;40:3341-3345.
- Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, et al: A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* 2001;183:8-15.
- Luzaszuk y col. (Lukaszuk, K., Liss, J., Wozniak, I., Emerich, J., & Wójcikowski, C. (2003). Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 608-612.
- Manawapat, A., Stubenrauch, F., Russ, R., Munk, C., Krüger Kjaer, S., & Iftner, T. (2012). Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *American journal of cancer research*, 2, 192-203.

BIBLIOGRAFÍA

- Manos MMTY, Wright DK. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. 1989;7:209–14
- Marinho-Dias, J., Ribeiro, J., Monteiro, P., Loureiro, J., Baldaque, I., Medeiros, R., & Sousa, H. (2013). Characterization of cytomegalovirus and epstein-barr virus infection in cervical lesions in Portugal. *Journal of medical virology*, 85(8), 1409-1413.
- Markowitz, L. E., Tsu, V., Deeks, S. L., Cubie, H., Wang, S. A., Vicari, A. S., & Brotherton, J. M. (2012). Human papillomavirus vaccine introduction—the first five years. *Vaccine*, 30, F139-F148.
- Marongiu, L., Godi, A., Parry, J. V., & Beddows, S. (2014). Human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants stratified by cervical disease stage. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, 8-13.
- Massad L, Schneider M, Watts D, Strickler H, Melnick S, Palefsky J, Anastos K et al. HPV testing for triage of HIV-infected women with papanicolaou smears read as atypical squamous cells of uncertain significance *Womens Health (Larchmt)*. 2004;13(2):147-53 59
- Mejlhede N, Bonde J, Fomsgaard A: High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. *APMIS* 2009;117:108-114.
- Molano M, Weiderpass E, Posso H, Morre SA, Ronderos M, Franceschi S, Arslan A, et al. Prevalence and determinants of *Clamydia trachomatis* infections in women from Bogota, Colombia. *Sex Tansm Infect*. 2003;79:474-78.
- Monnier-Benoit, S., Dalstein, V., Riethmuller, D., Lalaoui, N., Mougín, C., & Prétet, J. L. (2006). Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *Journal of clinical virology*, 35(3), 270-277
- Moreno V, Bosch F, Muñoz N, Meijer C, Shah K, Walboomers J, Herrero R, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1085-1092.
- Moscicki, A. B., Ma, Y., Wibbelsman, C., Darragh, T. M., Powers, A., Farhat, S., & Shiboski, S. (2010). Rate of and risks for regression of CIN-2 in adolescents and young women. *Obstetrics and gynecology*, 116(6), 1373
- Moscicki, A. B., Schiffman, M., Kjaer, S., & Villa, L. L. (2006). Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 24, S42-S51.
- Munoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24, S1-S10.

BIBLIOGRAFÍA

- Nam, K., Chung, S., Kim, J., Jeon, S., & Bae, D. (2009). Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. *Journal of gynecologic oncology*, 20(2), 91-95.
- Nygård, M., Hansen, B. T., Dillner, J., Munk, C., Oddsson, K., Tryggvadottir, L., ... & Kjær, S. K. (2014). Targeting human papillomavirus to reduce the burden of cervical, vulvar and vaginal cancer and pre-invasive neoplasia: establishing the baseline for surveillance. *PLoS one*, 9(2), e88323.
- Oncoguía SEGO: Prevención del cáncer de cuello de útero. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Octubre 2014.
- Pande, S., Jain, N., Prusty, B. K., Bhambhani, S., Gupta, S., Sharma, R., ... & Das, B. C. (2008). Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *Journal of clinical microbiology*, 46(3), 1060-1066.
- Perez, S., Cid, A., Araujo, A., Lamas, M. J., Saran, M. T., Alvarez, M. J., ... & Melon, S. (2011). A novel real-time genotyping assay for detection of the E6-350G HPV 16 variant. *Journal of virological methods*, 173(2), 357-363
- Persing, D. H., & Landry, M. L. (1989). In vitro amplification techniques for the detection of nucleic acids: new tools for the diagnostic laboratory. *The Yale journal of biology and medicine*, 62(2), 159.
- Pista A, Oliveira A, Verdasca N, et al: Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:941-946.
- Quaas, J., Reich, O., Frey Tirri, B., & Küppers, V. (2013). Explanation and use of the colposcopy terminology of the IFCPC (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy) Rio 2011. *Geburtsh Frauenheilk*, 73, 904-907
- Riethmuller, D., Jacquard, A. C., St Guily, J. L., Aubin, F., Carcopino, X., Pradat, P., ... & Prétet, J. L. (2015). Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of HPV-related diseases in France. *BMC public health*, 15(1), 453.
- Rodriguez, E. F., Reynolds, J. P., Jenkins, S. M., Winter, S. M., Henry, M. R., & Nassar, A. (2012). Atypical squamous cells of undetermined significance in patients with HPV positive DNA testing and correlation with disease progression by age group: an institutional experience. *International journal of clinical and experimental pathology*, 5(5), 428.

BIBLIOGRAFÍA

- Rosa M, Medeiros L, Dormelles D, Bozzeti M, Rosa F, Rosa B. Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2009; 25(5): 953-64.
- Rose RC, Reichman RC, Bonnez W. Human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera. *J. Gen. Virol.* 1994; 75:2075-79.
- Rositch AF, Poole C, Hudgens MG, et al: Multiple human papillomavirus infections and type competition in men. *J Infect Dis* 2012;205:72-81.
- Rositch, A. F., Koshiol, J., Hudgens, M. G., Razzaghi, H., Backes, D. M., Pimenta, J. M., ... & Smith, J. S. (2013). Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *International journal of cancer*, 133(6), 1271-1285
- Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, et al: Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis* 2001;184:1508-1517.
- Salazar, K. L., Zhou, H. S., Xu, J., Peterson, L. E., Schwartz, M. R., Mody, D. R., & Ge, Y. (2015). Multiple Human Papilloma Virus Infections and Their Impact on the Development of High-Risk Cervical Lesions. *Acta cytologica*, 59(5), 391-398.
- Sasagawa, T., Shimakage, M., Nakamura, M., Sakaike, J., Ishikawa, H., & Inoue, M. (2000). Epstein-Barr virus (EBV) genes expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer: a comparative study with human papillomavirus (HPV) infection. *Human pathology*, 31(3), 318-326.
- Schmitt, M., Depuydt, C., Benoy, I., Bogers, J., Antoine, J., Arbyn, M., & Pawlita, M. (2013). Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. *Journal of clinical microbiology*, 51(5), 1458-1464.
- Sellors, J. W., & Sankaranarayanan, R. (2003). *La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: manual para principiantes*. International Agency for Research on Cancer
- Sichero, L., Ferreira, S., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A., Franco, E. L., & Villa, L. L. (2007). High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *International journal of cancer*, 120(8), 1763-1768.

BIBLIOGRAFÍA

- Smith J, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Casteldagué X, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Nat Cancer Inst.* 2002;94:1604-13.
- Sobota RS, Ramogola-Masire D, Williams SM, et al: Co-infection with HPV types from the same species provides natural cross-protection from progression to cervical cancer. *Infect Agent Cancer* 2014;9:26.
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., ... & Young, N. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*, 287(16), 2114-2119
- Spinillo A, dal Bello B, Gardella B, et al: Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol* 2009;113:115-119.
- Teixeira, N. C. P., Araújo, A. C. L., Correa, C. M., Lodi, C. T. D. C., Lima, M. I. M., Carvalho, N. D. O., ... & Melo, V. H. (2012). Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(2), 164-169
- Thomas KK, Hughes JP, Kuypers JM, et al: Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. *J Infect Dis* 2000;182:1097-1102.
- Tonon, S. A., Picconi, M. A., Bos, P. D., Zinovich, J. B., Galuppo, J., Alonio, L. V., & Teysse, A. R. (2001). Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Journal of clinical virology*, 21(2), 129-134.
- Toro de Méndez, Morelva, & Ferrández Izquierdo, Antonio. (2011). Detección de virus papiloma humano (HPV) a partir de muestras celulares de cuello uterino en base líquida: Correlación con la inmunorreactividad de la proteína p16INK4a. *Investigación Clínica*, 52(1), 3-14
- Trottier H, Mahmud S, Costa MC, et al: Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1274-1280.
- Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, et al: Clustering of multiple human papillomavirus infections in women from a population-based study in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2011;204:385-390.
- Van de Velde, N., Boily, M. C., Drolet, M., Franco, E. L., Mayrand, M. H., Kliewer, E. V., ... & Brisson, M. (2012). Population-level impact of the bivalent, quadrivalent, and

BIBLIOGRAFÍA

nonavalent human papillomavirus vaccines: a model-based analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(22), 1712-1723.

Verhelst S¹, Poppe WA, Bogers JJ, Depuydt CE. Serial measurement of type-specific human papillomavirus load enables classification of cervical intraepithelial neoplasia lesions according to occurring human papillomavirus-induced pathway. *Eur J Cancer Prev*. 2016 Feb 17. [Epub ahead of print]

Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., ... & von Knebel Doeberitz, M. (2008). Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer research*, 68(1), 307-313.

Von Karsa, L., Arbyn, M., De Vuyst, H., Dillner, J., Dillner, L., Franceschi, S., ... & Törnberg, S. (2015). European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Research*, 1, 22-31.

Wang S, Zuna R, Wentzensen N, Dunn S, Sherman M, Gold M, Schiffman M, et al. Human Papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(1): 113-20.

Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, et al: No evidence for synergy between human papillomavirus genotypes for the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions in a large population-based study. *J Infect Dis* 2014;209:855-864.

Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, et al: Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *J Infect Dis* 2006;194:1291-1299.

Winer R, Hughes J, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat N, Holmes K, Koustky L. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 2006;354:2645-54

Xi, L. F., Koutsky, L. A., Hildesheim, A., Galloway, D. A., Wheeler, C. M., Winer, R. L., ... & Kiviat, N. B. (2007). Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16(1), 4-10.

Yang, L., He, Z., Huang, X. Y., Liu, H. N., & Tao, J. Y. (2014). Prevalence of human papillomavirus and the correlation of HPV infection with cervical disease in Weihai, China. *European journal of gynaecological oncology*, 36(1), 73-77.

BIBLIOGRAFÍA

- Yim, E. K., & Park, J. S. (2005). The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Research and Treatment*, 37(6), 319-324.
- Zhang, H. Y., Tiggelaar, S. M., Sahasrabudde, V. V., Smith, J. S., Jiang, C. Q., Mei, R. B., ... & Qiao, Y. L. (2012). HPV prevalence and cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women in Yunnan Province, China: a pilot study. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 13(1), 91.
- Zhang, L., Liao, H., Yang, B., Geffre, C. P., Zhang, A., Zhou, A., ... & Zheng, W. (2015). Variants of human papillomavirus type 16 predispose toward persistent infection. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(7), 8453.
- Zuna, R. E., Moore, W. E., Shanesmith, R. P., Dunn, S. T., Wang, S. S., Schiffman, M., ... & Teel, T. (2009). Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *International journal of cancer*, 125(11), 2609-2613.