

VARIANTES MOLECULARES DE VPH 58 EN LA COHORTE DE BOGOTA, COLOMBIA

OSCAR LEONARDO BUITRAGO URIBE

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
BOGOTÁ 2010 D.C.**

VARIANTES MOLECULARES DE VPH 58 EN LA COHORTE DE BOGOTA, COLOMBIA

OSCAR LEONARDO BUITRAGO URIBE
Código 597656

Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Bioquímica

DIRIGIDO POR:

MÓNICA MOLANO LUQUE. PhD
Grupo de Investigación en Biología del Cáncer
Instituto Nacional de Cancerología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
BOGOTÁ 2010 D.C.

FORMATO ÚNICO PARA ENTREGA DE LOS TRABAJOS DE GRADO

Título:

VARIANTES MOLECULARES DE VPH 58 EN LA COHORTE DE BOGOTÁ, COLOMBIA.

Title:

MOLECULAR VARIANTS OF VPH 58 IN THE COHORT OF BOGOTÁ, COLOMBIA.

RESUMEN EN ESPAÑOL

El VPH58 es el segundo tipo viral de mayor incidencia en el ámbito Suramericano y Nacional en mujeres con citología normal y con lesiones de alto grado. Además este virus se encuentra dentro de los ocho tipos virales más altamente prevalentes en cáncer cervical invasivo. A nivel mundial hay muy pocos estudios de variantes sobre los ORF E6 y E7 del VPH58, de los cuales algunos han mostrado una asociación entre ciertas variantes moleculares con la severidad de la neoplasia cervical y con el riesgo de cáncer cervical en poblaciones asiáticas. Sin embargo en el país no se han desarrollado estudios de variantes moleculares del VPH58. Nuestro objetivo fue determinar presencia y persistencia en infecciones prevalentes e incidentes de variantes de E6 y E7 de VPH58 en mujeres con citología normal seguidas durante un periodo de 7 años pertenecientes a la cohorte de Bogotá. Se realizó una revisión sistemática de literatura para determinar las variantes reportadas a nivel mundial que incluyeron la información de ambos ORFs. Se analizaron 34 mujeres con infecciones prevalentes y 71 con infecciones incidentes con VPH58, con su respectivo seguimiento, el análisis de variantes se realizó mediante secuencia de E6/E7 y mediante el desarrollo de la técnica de RLB. La secuencia referencia de VPH58 fue utilizada para comparar las variantes obtenidas. El análisis de carga viral se realizó mediante Gp5+/Gp6+PCR-EIA (método semi cuantitativo). Resultados: Se realizó una revisión de la literatura y se identificaron 24 variantes de E6/E7VPH58 reportadas a nivel

mundial. Se desarrolló y validó un RLB para la identificación de las variantes de E6/E7VPH58 reportadas en la literatura y de dos nuevas variantes sin reportes previos, identificadas inicialmente por la técnica de secuencia. Se analizaron un total de 169 muestras VPH58 positivas provenientes de las mujeres de la cohorte, se detectaron un total de seis variantes, cuatro reportadas previamente en la literatura y dos variantes nunca reportadas. La variante T307/A694/G744/A761 fue la de mayor frecuencia, tanto en infecciones incidentes como en prevalentes. Las variantes no reportadas en la literatura fueron A169/T307/A599/A694/G744/A761 y T307/A694/G744/A761/G763 con una muestra cada una. Ninguna de las muestras analizadas presentó la secuencia referencia del VPH58. En el análisis de eliminación de las variantes ninguna se asoció con mayores o menores tasas de eliminación. Cuando se realizó el análisis teniendo en cuenta las infecciones con VPH58 prevalentes o incidentes, tampoco se observaron diferencias en los tiempos de eliminación. En el análisis multivariado se observó que en mujeres cuya edad de inicio de relaciones sexuales es superior a 15 años existe una mayor eliminación al compararlas con las mujeres con inicio de relaciones sexuales menores de 15 años. Así mismo las mujeres con una paridad de uno o más tuvieron una mayor tasa de eliminación de la infección al compararlas con mujeres nulíparas. Se pudo determinar una tendencia entre cargas virales altas y una mayor persistencia de la infección. No se observó asociación de otros factores de riesgo con la eliminación de la infección.

ABSTRACT

HPV58 is the second viral type in higher incidence in south America and Colombia in normal cytology healthy woman and High grade lesions woman. Moreover that virus is found in the eight type virus with most prevalent in invasive cervical cancer.

In world wide, there are few studies about HPV 58 variants including E6 ORF and E7 ORF, they found association in some molecular variants with the severity of cervical neoplasia

and the risk of cervical cancer in Asian population. However in our country there aren't studies with HPV58 molecular variants.

Our aim was determine presence and persist in prevalent and incident infection of HPV58 E6 and E7 variants in woman with normal cytology followed during seven years period that join to Bogotá cohort. It was systematic bibliographic review for determine reported variants in level world that included ORF E6 and E7 information. It was analyze and follow 34 women with prevalent infection and 71 women with incident infection HPV58 positive. The analyze variants was take out with sequence direct E6/E7 and the developed RBL technique. The reference sequence HPV58 was used to compare with founded variants. The load viral analysis was carry out Gp5+/Gp6+PCR-EIA (semi quantitative method).

Results: It found 24 E6/E7 HPV58 variants reported in the world literature with bioinformatics research. It was validated and developed a RLB technique for the identification of variants reported and two new variants without previous reported. They were identified initially with the sequence technique. It analyzed 169 HPV58 positive samples originated of cohort women It was detected six variants, four reported previously in the literature and two variants never reported, , the variant T307/A694/G744/A761 was the more frequency variant as incident infection as prevalent infection. There are variants no reported in literature A169/T307/A599/A694/G744/A761 (one sample) and T307/A694/G744/A761/G763 (one sample).

None samples analyzed present reference sequence of HPV58. In the analysis of clearance infection none variants analyzed was related with clearance rates lower or high, as well as no observed lower rates clearance in the prevalent and incident infections.

In the multivariate analysis was observed that in women whose age at first intercourse is more than 15 and women with parity greater than one there were greater clearance rates. It was determine a tendency with load viral among high viral loads and greater persistence of the infection. There was no association with other risk factors and the elimination of the infection.

PALABRAS CLAVES:

Virus del papiloma humano, variantes moleculares de E6/E7 , Reverse Line Blot. Carga viral, persistencia.

KEY WORDS:

Human papillomavirus, E6/E7 molecular variants, Reverse Line Blot, Viral Load, Persistense.

FIRMA DEL DIRECTOR:



MONICA MOLANO LUQUE. MSc. PhD.

Director

Grupo de Investigación en Biología del Cáncer

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

Docente ajunto. Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

NOMBRE Y AÑO DE NACIMIENTO DE LOS AUTORES.

OSCAR LEONARDO BUITRAGO URIBE 1979

A mi familia, especialmente a mi esposa por su forma alegre de ver la vida y por su ayuda incondicional, esfuerzo y dedicación.

A mis padres por su ejemplo de vida.

A mi hermana y mis sobrinos por su apoyo y afecto.

A mi Hijo Daniel Leonardo quien me recuerda todos los días el porque seguir....

A la memoria de mis abuelitos quienes ya forman "parte del aire"

....me parece que lo más esencial no lo aprendí de mis maestros de escuela, ni siquiera de mis profesores de universidad, sino de mis padres, que no sabían nada en absoluto de ciencia, en aquel año tan lejano de 1939. Carl Sagan (El mundo y sus demonios)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

A Dios, gracias a su guía en todos los pasos en mi vida.

Al INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA por la financiación de este trabajo.

A la Doctora Mónica Molano Luque; directora de este trabajo, por su amistad, ayuda y por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.

A la Doctora Teresa Martínez por su amabilidad y la realización de los análisis estadísticos.

A Nicolás Morales por su colaboración durante el proceso de Estandarización del Reverse Line Blot y su amistad.

A Antonio Huertas y Carolina Martín Gamez por su amistad y por su ayuda durante la realización del trabajo experimental y la elaboración del documento final.

A mis compañeros del Grupo: Andrés Javier, Panchita, Elizabeth, Diego, Josefa, Schyrly, Diana, Antonio, Oscar, Nicolás Morales; por su amistad, por su ayuda, por las relajantes horas de almuerzo y por compartir conmigo muchos momentos y experiencias en el laboratorio.

A los Doctores Alba Lucia Combata, Pablo Moreno Acosta, Maria Mercedes Bravo y Martha Serrano; por sus oportunos comentarios y sugerencias durante la realización de este trabajo.

A Gloria Mojica y Stella Parra por su colaboración y su amistad.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA por la formación académica que recibí durante la realización de la Maestría.

A mis maestros: Dr. Carlos Arturo Guerrero, Dr. Luís Alberto Gómez, Dr. Eduardo Caminos, Dr. Orlando Acosta, por sus valiosas enseñanzas durante mis estudios de maestría.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Oscar Flores, Luz Marina Castillo, Yurany Moreno, Lucia Acosta, Marien Villamil y Maria Helena Camargo, con los cuales vivimos y compartimos magníficos momentos durante la maestría.

A todas las mujeres que participaron de manera desinteresada en la Cohorte mediante la donación de sus muestras.

A toda mi familia; a mi Esposa Hellen y mi Hijo Daniel Leonardo, a mis padres Luis Hernando y María Roció, a mi hermana Deisy y mis sobrinos Sebastián y Juan Camilo, por su constante ayuda y comprensión sin los cuales esto no sería una realidad.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.....	4
1.1.1 GENOMA DE VPH.....	4
1.1.1.1 Región temprana.....	4
1.1.1.2 Región tardía	6
1.1.1.2 Región larga de control.....	6
1.1.2 TAXONOMÍA VPH.....	6
1.1.2.1 Tipos y subtipos de VPH.....	7
1.1.2.2 Variantes moleculares.....	8
1.1.2.3 Ramas Filogenéticas.....	8
1.1.3. CICLO VIRAL VPH.	9
1.1.4. INFECCIÓN POR VPH.....	9
1.1.4.1 Factores asociados a la adquisición de la infección con VPH.....	9
1.1.5. RELACIÓN DEL VPH EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL.....	10
1.1.5.1 Mecanismos moleculares del VPH implicados en la inducción de carcinogenesis.....	10
1.1.5.1.1 Oncoproteína viral E6.....	11
1.1.5.1.2 Oncoproteína viral E7.....	12
1.1.5.2 Cofactores asociados al desarrollo de cáncer cervical.....	13
1.1.5.2.1 Persistencia de la infección con VPH.....	14
1.1.5.2.2 Potencial oncogénico de las variantes moleculares.....	14
1.1.5.2.3 Carga viral.....	15
1.2 CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS LESIONES CERVICALES.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. METODOLOGÍA.....	19
3.1 POBLACIÓN Y DISEÑO DEL ESTUDIO.....	19
3.2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	20

3.2.1 Selección de las secuencias.....	21
3.3 MUESTRAS.....	21
3.3.1 Muestras objeto del estudio.....	21
3.3.2 Procesamiento de la muestra.....	21
3.3.3 Evaluación de la calidad y del procesamiento de las muestra.....	22
3.4. DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH.....	22
3.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ORF E6 y ORF E7 DEL VPH 58.....	23
3.5.1 Ensayos de sensibilidad de la PCR.....	25
3.5.2 Ensayos de especificidad.....	25
3.5.3 Controles positivos y negativos.....	25
3.6 ELECTROFORESIS.....	26
3.7 DETECCIÓN DE VARIANTES MOLECULARES DEL ORF E6 y ORF E7 DEL VPH 58.....	26
3.7.1 Desarrollo de la técnica de Reverse Line Blot.....	26
3.7.1.1 Hibridación de los Productos de PCR y Detección.....	27
3.7.1.2 Análisis de variantes en E6 y E7 de muestras control usando el RLB.....	27
3.7.2 Validación de la Técnica Reverse Line Blot.....	27
3.7.2.1 Secuencia automática.....	28
3.7.2.1.1 Análisis de la secuencia obtenida.....	29
3.7.3 Detección de Variantes de E6 y E7 en las muestras de la Cohorte.....	29
3.8 ANÁLISIS DE LA CARGA VIRAL.....	29
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
4. RESULTADOS.....	31
4.1 REVISIÓN DE LITERATURA VARIANTES MOLECULARES ORF E6 Y E7 VPH 58.....	31
4.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS ORF E6 Y E7 DE VPH58.....	31
4.3. DETECCIÓN DE VARIANTES MOLECULARES DEL ORF E6 y ORF E7 DEL VPH 58.....	36
4.3.1 Secuencia automática de las muestras pertenecientes a la línea de Base de la Cohorte de Bogota positivas para VPH 58.....	36
4.3.2 Desarrollo de la técnica de Reverse Line Blot.....	42
4.3.2.1 Resultados del Reverse Line Blot.....	50
4.3.2.2 Comparación de los resultados por ambas técnicas.....	50
4.4 VARIANTES MOLECULARES DE E6 Y E7 DE VPH 58 PRESENTES EN MUJERES CON CITOLOGÍA NORMAL PERTENECIENTES A LA COHORTE DE BOGOTA.....	51
4.4.1 MUJERES CON INFECCIONES PREVALENTES CON VPH 58.....	51
4.4.1.1 Frecuencia de variantes en las mujeres con infecciones prevalentes en la línea de base.....	54
4.4.1.2 Frecuencia de variantes en las mujeres con infecciones prevalentes durante el seguimiento.....	55
4.4.2 MUJERES CON INFECCIONES INCIDENTES CON VPH 58.....	55
4.4.2.1 Seguimiento de las mujeres con infección incidente.....	55
4.4.2.2 Frecuencia de variantes de E6/E7 VPH58 con infecciones incidentes en la cohorte de Bogota.....	57

4.5 ANÁLISIS DE LA CARGA VIRAL.....	59
4.5.1 Carga viral en mujeres con infecciones prevalentes.....	59
4.5.2 Carga viral en mujeres con infecciones incidentes.....	60
4.6 ANÁLISIS DE LA ELIMINACIÓN DE LA INFECCIÓN CON VPH 58 EN LAS MUJERES DE LA COHORTE DE BOGOTA.....	60
4.6.1 Análisis de la eliminación de la infección en las mujeres con infección prevalente o incidente con el VPH58 pertenecientes a la cohorte de Bogota.....	61
4.6.2 Análisis de la eliminación de la infección en las mujeres con infección prevalente o incidente con variantes de E6/E7 VPH58 pertenecientes a la cohorte de Bogota.....	62
4.7 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA ELIMINACIÓN O PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN CON EL VPH58 EN LAS MUJERES DE LA COHORTE DE BOGOTA, COLOMBIA.....	65
5. DISCUSIÓN	67
5.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS ORFs E7 Y E7 DE VPH 58.....	67
5.2 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES MOLECULARES DE LOS ORFs E6/E7 VPH 58.....	68
5.3 VARIANTES MOLECULARES DE LOS ORF E6/E7 VPH58 PRESENTES EN LAS MUJERES CON CITOLOGÍA NORMAL PERTENECIENTES A LA COHORTE DE BOGOTA COLOMBIA.....	69
5.4 CARGA VIRAL.....	73
5.5 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A ELIMINACIÓN Y PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN CON EL VPH 58.....	74
6. CONCLUSIONES.....	75
7. PERSPECTIVAS.....	77
8.REFERENCIAS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1:	Genoma del VPH 16	5
Figura No. 2:	Árbol filogenético de los papilomavirus.....	7
Figura No. 3:	Lesiones del cérvix.....	17
Figura No. 4:	Evaluación de la calidad del ADN de las muestras PCR – PCO ₃ /PCO ₅ (209 pb. β-globina).....	33
Figura No. 5:	Diluciones seriadas PCR E6 y E7 VPH 58.....	34
Figura No. 6:	Prueba de especificidad para los iniciadores de los ORF E6 y E7 de VPH 58.....	35
Figura No. 7:	Electroforogramas de las mutaciones detectadas en la Línea de Base.....	38
Figura No. 8:	Ensayo de sensibilidad en RLB iniciadores de los ORF E6 y E7 de VPH 58.....	45
Figura No. 9:	Ensayo de estandarización de la técnica de RLB utilizando los productos E6F1/E7R1 para el ORF E6 y los productos E7P1/E7P2 para el ORF E7.....	47
Figura No. 10:	Ensayo de RLB con las condiciones finales de la estandarización para ambos ORFs E6 y E7 VPH58.....	49
Figura No. 11:	Descripción mujeres con infecciones prevalentes en la cohorte de Bogota.....	53
Figura No. 12:	Frecuencia de variantes presentes en las mujeres prevalentes pertenecientes a la línea de base.....	54
Figura No. 13:	Infecciones Incidentes con VPH 58 en la Cohorte.....	59
Figura No. 14:	Eliminación de la infección en las mujeres con infección prevalente e incidente con el VPH58 pertenecientes a la cohorte de Bogota.....	62
Figura No. 15:	Eliminación de las variantes moleculares de E6/E7 VPH 58 de mujeres infectadas por VPH58 pertenecientes a la cohorte de Bogota.....	64
Figura No. 16:	Eliminación de las variantes moleculares de E6/E7 VPH 58 de mujeres con infecciones incidentes pertenecientes a la cohorte de Bogota.....	65

LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1:	ORF E6 y E7 VPH 58 referencia indicando La posición de los iniciadores para PCR.....	24
Tabla No. 2:	Artículos incluidos dentro del estudio de los cuales se obtuvo información completa de las de los ORF E6 y E7 de VPH58.....	31
Tabla No. 3:	Variantes moleculares de los ORF E6/E7 de VPH 58 reportada en la literatura hasta la fecha mediante la técnica de secuencia directa....	32
Tabla No. 4:	Iniciadores ORF E6 VPH 58.....	33
Tabla No. 5:	Iniciadores ORF E7 VPH 58.....	34
Tabla No. 6:	Variantes de los ORF E6 y E7 de VPH 58 de la línea de base obtenidas por el método de secuencia automática.....	38
Tabla No. 7:	Oligosondas desarrolladas para el ensayo de Reverse Line Blot para la detección e identificación de variantes de los ORF E6 y E7 de VPH58.....	44
Tabla No. 8:	Concentraciones finales de las sondas utilizadas en el ensayo de RLB.....	48
Tabla No. 9:	Resultados de variantes moleculares del ORF E6 y E7 de VPH58 determinadas en la línea de base de la cohorte por la técnica de Reverse Line Blot.....	51
Tabla No. 10:	Variantes E6/E7 VPH58 de mujeres incidentes de la Cohorte de Bogota.....	57
Tabla No. 11:	Carga Viral por variante en infecciones prevalentes.....	59
Tabla No. 12:	Carga Viral por variante en infecciones incidentes.....	60
Tabla No. 13:	Variantes E6/E7 VPH58 documentadas.....	63
Tabla No. 14:	Análisis multivariado de Cox en las mujeres con infecciones incidentes y factores asociados con la eliminación de la infección....	66

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical es el segundo cáncer más común en mujeres a nivel mundial después del *cáncer de seno*, con una estimación de 493000 casos nuevos, de los cuales el 83% ocurren en países en vías de desarrollo y con 274000 muertes reportadas en el 2002(1). En la población de mujeres colombianas se reportan 33504 casos de cáncer anualmente, donde el cáncer cervical presenta una incidencia de 5936 casos y una mortalidad anual de 2853(2) constituyéndose en el de mayor incidencia y mortalidad en la población de mujeres colombianas. La probabilidad de fallecer en los 5 años siguientes del diagnóstico de cáncer de cuello uterino se encuentra cerca del 40% (3) constituyéndose en un problema de salud pública debido a sus implicaciones en el estándar de vida de la persona y costos de atención médica. Dentro de los factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer cervical se han relacionado componentes como la edad, número de partos, edad de inicio de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos orales y principalmente la infección con el virus de papiloma humano (VPH)(4-6). En este aspecto se ha estimado que la prevalencia de VPH a nivel mundial en carcinoma cervical es cercana al 90%(7) y se considera que la presencia de la infección es necesaria pero no suficiente para el desarrollo del cáncer cervical(8). En la mayoría de los casos la infección por el VPH es un fenómeno transitorio que puede llegar a producir lesiones intraepiteliales cervicales de bajo grado que en la gran mayoría de los casos van a regresar espontáneamente y solo un pequeño grupo de mujeres infectadas progresarán hasta cáncer cervical(9). Los fenómenos de progresión y eliminación varían entre otros de acuerdo al grado de la lesión, sin embargo se desconocen los principales mecanismos que están implicados en la persistencia o eliminación de la infección y en la progresión de la lesión.

La clasificación de los virus de papiloma incluye tipos, subtipos y variantes. Dentro de los tipos de alto riesgo, el VPH 58 a nivel de Suramérica ocupa el segundo lugar en prevalencia (7%) después del VPH 16 (15%) en mujeres con citología normal(10). Así mismo la

información obtenida de estudios a nivel mundial muestran una alta prevalencia de las infecciones por VPH 58 en lesiones de alto grado y aunque se observa una menor prevalencia en cánceres invasivos, este virus está catalogado como uno de los 8 tipos más prevalentes en este tipo de cáncer. En Colombia, en un estudio de cohorte acerca de la historia natural del virus del papiloma humano, su papel y el de otros cofactores en el desarrollo de cáncer cervical realizado por el Instituto Nacional de Cancerología y la Agencia Internacional para la Investigación en Cancer (IARC), en un grupo de 2200 mujeres con bajos ingresos económicos en Bogotá, Colombia, mostró que este tipo viral es el segundo mas prevalente (6.2%) e incidente (11.2%) después de las infecciones por VPH 16 en mujeres con citología normal, (5;6;11) y los resultados del seguimiento de mujeres positivas para diferentes tipos de VPH de la cohorte mostró que los virus que pertenecen a la especie alfa 9 a la que pertenece el VPH 58 también muestran una persistencia mayor comparada con otros virus de alto y bajo riesgo(11). Adicionalmente los resultados de la cohorte parecen mostrar que mujeres infectadas con VPH 16 ó VPH 18 presentan un mayor riesgo de adquirir una subsiguiente infección con el VPH 58 que con otros tipos virales(12). La mayoría de los estudios que se han realizado a nivel mundial sobre variantes moleculares de VPH han sido para los VPH 16 y 18 y principalmente hacia las regiones E6 y E7 ya que estas regiones codifican para proteínas virales que son cruciales en las propiedades oncogénicas de VPH(13). Estudios experimentales han mostrado que las variantes también pueden estar jugando un papel importante en la persistencia viral. El estudio de las variantes moleculares de VPH ha permitido establecer cuando se presenta una infección persistente por el mismo tipo viral, ya que hay una detección continua de la misma variante a lo largo del tiempo, o si se trata de una reinfección cuando la variante detectada es diferente. De forma adicional estudios epidemiológicos han demostrado que algunas variantes moleculares se han asociado con el desarrollo de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado y cáncer invasivo(14-17). Sin embargo en la actualidad hay muy pocos estudios de variantes moleculares del VPH 58 y no hay ningun estudio de seguimiento. Este trabajo constituye el primer reporte a nivel nacional y mundial en el que se analiza la presencia y persistencia de variantes moleculares de los ORF E6 y E7 del virus del VPH 58. El análisis se realizó en cepillados cervicales provenientes de mujeres con citología normal, con infecciones por VPH 58 (prevalentes e incidentes), las cuales fueron seguidas por un periodo de siete años. Así mismo se realizaron análisis de carga viral como

factor de riesgo en la persistencia de la infección. Adicionalmente asociado al desarrollo del trabajo se desarrolló y validó una técnica molecular para la detección de variantes de los ORF E6 y E7 de VPH 58 basada en la técnica de Reverse Line Blot de gran utilidad para estudios epidemiológicos del VPH 58.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO VPH

Todos los virus del papiloma humano son virus no envueltos de tipo ADN de doble cadena con cápsides icosaedrales con 55nm de diámetro que poseen 72 capsomeros, cada capsomero contiene 5 moléculas de proteína L1, y la proteína L2 se encuentra en una proporción mucho menor, entre 12 a 36 moléculas por cápside (18-20). Los VPH exhiben un tropismo por células epiteliales. Más de 100 tipos de VPH infectan epitelios del tracto genital, entre los que se encuentran algunos tipos de alto riesgo que llevan al desarrollo de lesiones cervicales de alto grado y cáncer cervical.

1.1.1 GENOMA DE VPH

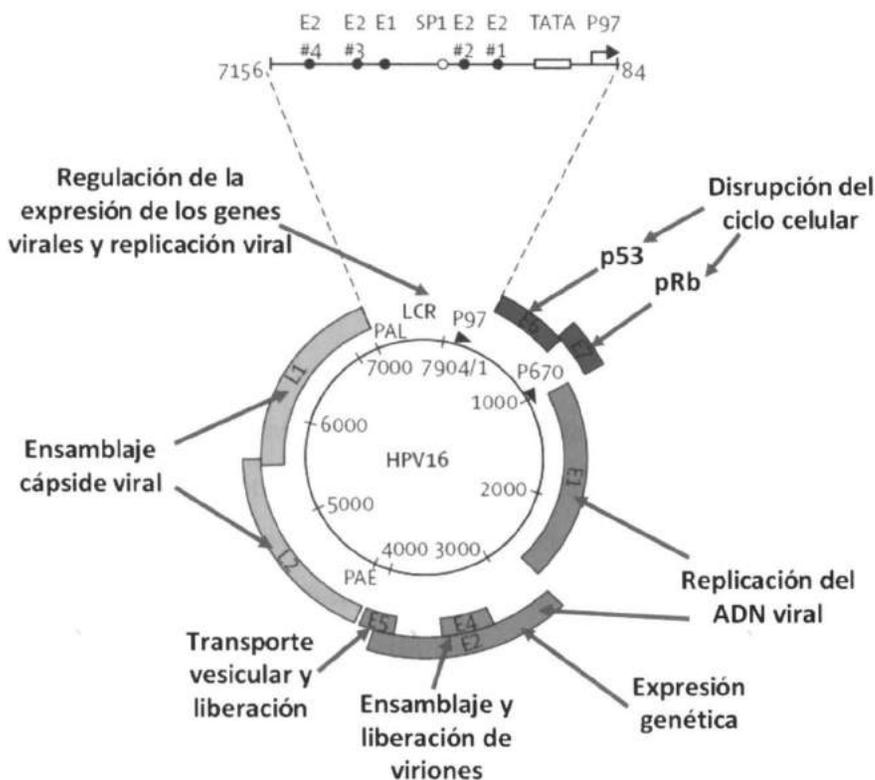
Todos los virus del papiloma humano poseen un ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8kb. Este se encuentra dividido en tres regiones, la región temprana y tardía llamadas así por su momento de expresión dentro del ciclo viral y una región larga de control "LCR" o región no codificante "NCR". Las tres regiones de todos los papilomavirus se encuentran separadas por dos sitios de poliadenilación (pA): un sitio temprano de pA (A_E) y un sitio tardío de pA (A_L).

1.1.1.1 Región temprana.

Esta región corresponde aproximadamente al 50% del genoma viral (~4.5 kb) y codifica seis marcos de lectura abierta "ORF". El ORF E1, codifica para una proteína de 68 a 76 kD esencial para la replicación del ADN viral. E2, codifica para una proteína altamente fosforilada de ~48 kD que está involucrada en la regulación de la expresión de los genes tempranos y en el mantenimiento del estado episomal del genoma viral. En VPH – 16 y VPH – 18 la proteína E2 suprime los promotores desde los cuales se transcriben las

proteínas E6 y E7 (transformantes); cuando parte del genoma del VPH-16 se integra en el genoma de la célula hospedera la integridad de los ORFs E1 y E2 es alterada, con lo cual la función represora de E1 y E2 sobre E6 y E7 puede verse afectada(21). E4 está contenido completamente en el ORF E2 y se ha observado su relación con la regulación del promotor de hTERT(22). E5 codifica una proteína que se localiza preferencialmente en los sistemas membranosos celulares y esta relacionada con la retención de las moléculas de HLA clase I en el Aparato de Golgi(23), además es una región pobremente conservada entre los VPH. E6 codifica una proteína multifuncional de 16 a 19 kD y se ha descrito su unión con diferentes proteínas celulares, especialmente con el supresor tumoral p53 para su degradación(24). E7 codifica una proteína fosforilada ácida de 10 a 14 KD que tiene la capacidad de interactuar con pRB formando complejos en su estado hipofosforilado(25;26), estas dos proteínas presentan un alto potencial oncogénico(27) por los complejos que forman con p53 y pRB. **Figura No. 1**

Figura No 1. Genoma del VPH 16
Modificado de Schiffman (Schiffman 2007)



1.1.1.2 Región tardía.

Esta región corresponde aproximadamente a un 40% del genoma viral, queda corriente abajo de la región temprana y codifica para los ORF L1 y L2 que codifican para la proteína mayor de la cápside L1 y la proteína menor de la cápside L2. La proteína L1 es utilizada como el principal componente de las vacunas producidas en la actualidad(28) por su alta inmunogenicidad. Esta proteína tiene la capacidad de auto ensamblarse en partículas similares a virus o VLPs (Virus Like Particle) cuando es expresada en sistemas recombinantes (29;30) . La proteína menor de la cápside L2, aproximadamente 73 kD es menos inmunogénica que L1. **Figura No. 1**

1.1.1.2 Región larga de control.

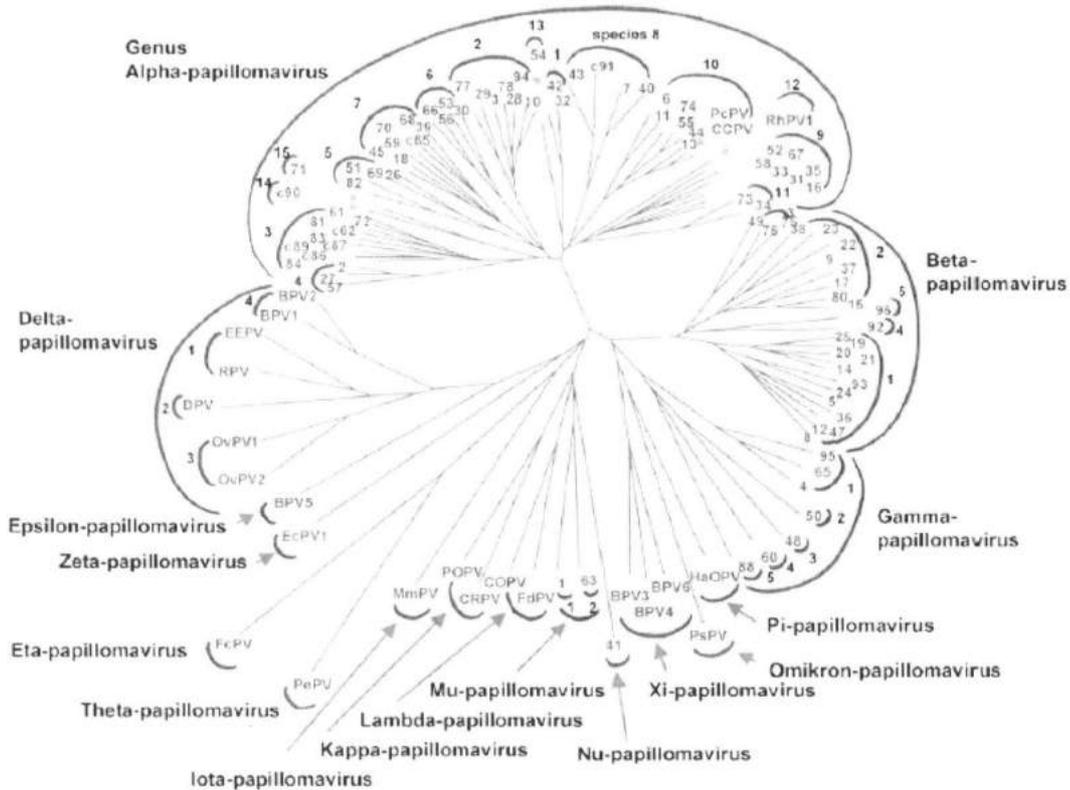
Es un segmento de aproximadamente 850 pares de bases correspondiente al 10% del genoma de los papilomavirus, esta región aunque no codifica para proteínas soporta los orígenes de replicación de múltiples factores virales que son importantes en la regulación de la RNA polimerasa II. Se divide en dos dominios; el RE2 (Respondedor a E2) regulado por la presencia de E2, en esta región se localiza el origen de replicación viral y es desde donde se transcriben los oncogenes E6 y E7. El otro componente es el CE (Celular Enhancer) que constituye un potenciador de la transcripción que es activado por factores transcripcionales celulares(31). **Figura No. 1**

1.1.2 TAXONOMÍA VPH.

Los virus del papiloma humano son miembros de la familia Papillomaviridae, están agrupados en 5 géneros diferentes denominados: alfa-papillomavirus, beta-papillomavirus, Gamma-papillomavirus, Mu-papillomavirus y Nu-papillomavirus. El VPH 58 se ubica en el género Alfa-papillomavirus, específicamente en la especie 9. Para el año 2.001 se habían identificado aproximadamente 86 genomas completos de VPH y 16 de otros Papilomas. (32)**Figura No. 2**

Figura No. 2 Árbol filogenético de Virus de Papiloma Humano

Tomado de Villiers 2002



Árbol filogenético de los Virus del Papiloma construido con la secuencia del ORF L1 de 118 tipos de Virus de Papiloma. El número al final de cada una de las ramas identifica a cada tipo de manera específica. Los números acompañados por c identifican a candidatos para tipos de Virus de Papiloma Humano. Todas las abreviaciones que acompañan a algunos números refieren a Virus de Papiloma animal. El arco alrededor de los números que identifican los tipos, muestran como se agrupan los mismos de acuerdo a especie y los arcos externos indican el agrupamiento de las especies de acuerdo a género. Ejemplo: los VPHs tipo 16, 33, 31, 35, 52, 58 y 67 pertenecen a la especie 9 del género Alfa- papillomavirus.

1.1.2.1 Tipos y subtipos de VPH.

La determinación taxonómica de los VPHs se basa en su secuencia genómica, y principalmente en las variaciones del ORF de L1 que es la región del genoma mas conservada, es así como un aislamiento de VPH es reconocido como nuevo tipo cuando su genoma completo ha sido clonado y la secuencia del ADN del ORF L1 posee una diferencia mayor al 10% de los tipos previamente clasificados(32). Dentro de un mismo tipo viral se

presentan variaciones intratípicas, denominadas subtipos que se caracterizan por poseer diferencias dentro de la secuencia entre el 2% y 10%(32-35).

Dependiendo de su potencial oncogénico los VPH se han agrupado así: Los VPH BR (Bajo Riesgo) 6,11, 13, 44, 40, 42, 43, 54, 55, 57,61, 70, 72, 74, 79, 81, 83, 84, los tipos VPH AR (Alto riesgo) 16,18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, y tipos de VPH cuyo potencial no se ha definido 26, 53, 66, 34(5;34;36)

1.1.2.2 Variantes moleculares.

La definición de variantes según algunos autores son aquellos aislamientos de un tipo específico que presentan cambios en nucleótidos, no por encima del 2% en regiones codificantes y hasta un 5% en regiones no codificantes(33-35).

El estudio de las variantes moleculares ha aportado datos sobre fenómenos como la colonización europea y africana del nuevo mundo a partir del estudio de las variantes de VPH 16 predominantes en el continente americano(37;38).

1.1.2.3 Ramas Filogenéticas.

La clasificación en ramas filogenéticas no es desarrollada por todos los autores como un consenso general y ha sido implementada principalmente para el VPH 16 que ha sido el más ampliamente estudiado, sin embargo para el caso del VPH 58 aún no existe una clasificación por ramas filogenéticas.

Los análisis de ramas filogenéticas para el virus del VPH 16 se han desarrollado mediante el análisis de las secuencias de los genes virales E6 E7, L1 y LCR lo que ha permitido realizar una agrupación teniendo en cuenta su distribución geográfica en E (europeas), As (asiáticas), AA (asiático-americanas), Af1 (africana 1) y Af2 (africana 2) y NA1 (Norteamericana 1) (39;40). Otros investigadores agrupan estos grupos en dos ramas filogenéticas Europeas (E) y no Europeas (n-E) (34;35;41). Las variantes AA, Af, As son referidas también como Ax, ya que los cambios existentes en su genoma son muy similares y conservados entre estas(42;43).

1.1.3. CICLO VIRAL VPH.

El ciclo viral de los papilomavirus se encuentra unido al programa de diferenciación celular del epitelio infectado. Los virus del papiloma inicialmente infectan células basales epiteliales, que constituyen la única capa celular del epitelio que presenta división activa, no existe un mecanismo como tal que permita reproducir todos los pasos de una infección natural debido a que la expresión de las proteínas virales depende de los procesos de diferenciación del epitelio. Se ha podido identificar cinco etapas dentro del ciclo viral de VPH: infección, liberación del genoma viral, fase proliferativa, amplificación genómica y síntesis viral.

1.1.4. INFECCIÓN POR VPH.

La transmisión del VPH ocurre de forma primaria por contacto piel a piel, los estudios epidemiológicos demuestran claramente que el riesgo de adquirir la infección ano genital con VPH y el desarrolló de cáncer cervical es incrementado por el comportamiento sexual, sin embargo existen reportes donde se mencionan formas alternativas de transmisión vía fomites y transmisión vertical madre hijo. Gran parte de las infecciones con VPH son eliminadas de forma natural. La presencia de mujeres infectadas asintomáticas ha permitido establecer que la infección con el virus de VPH es una condición necesaria pero que no es suficiente para el desarrolló de la lesión y el cáncer cervical(39;44-46)

1.1.4.1 Factores asociados a la adquisición de la infección con VPH.

Dentro de los factores de riesgos asociados a la adquisición de la infección con el VPH se encuentran el poseer múltiples parejas sexuales ó el sostener relaciones con compañeros sexuales que posee múltiples parejas sexuales(5;6;47;48).

La infección con VPH es mas común en mujeres sexualmente activas con edades entre los 18 y 30 años, con un decrecimiento agudo en mujeres mayores de 30 años, y con un

incremento en mujeres mayores de 40 años. El inicio de las relaciones sexuales a edad temprana es considerado a su vez un factor de riesgo.

Otros factores de riesgo que se han asociado a la adquisición de la infección incluyen historia de enfermedades de transmisión sexual, el nivel educativo, uso de anticonceptivos orales, tabaquismo, consumo de alcohol, embarazos a término, estado genético e inmunológico de la persona y la región geográfica donde habite entre otros.(45)

Muñoz N. y col. (2.004), en un estudio de cohorte realizado con aislamientos de cepillados cervicales obtenidos de mujeres con citología normal que habitaban Bogotá (Colombia) y que asistían a diferentes centros de salud, determinaron que el número de nuevos compañeros sexuales durante el seguimiento, mujeres menores de 30 años, y el uso de anticonceptivos orales), fueron los principales factores asociados a la adquisición de la infección con VPH, en esta población(6).

1.1.5. RELACIÓN DEL VPH EN LA CARCINOGENESIS CERVICAL.

Se ha estimado que del 90% al 99.7% de casos de cáncer cervical portan ADN de VPH de alto riesgo(8;49;50). Dentro de los tipos virales más prevalentes a nivel mundial se han detectado el VPH16, en un 50% a 60% de los casos con cáncer invasivo y el VPH 18 con un 10% al 15% de prevalencia en este mismo tipo de casos(49;50). Los tipos virales 16, 31, 35 y 52 presentan una mayor frecuencia en cáncer cervical de células escamosas, mientras que los tipos 18, 39, 45, y 59 se encuentran con mayor frecuencia en adenocarcinomas cervicales(45).

1.1.5.1 Mecanismos moleculares del VPH implicados en la inducción de carcinogénesis.

Se ha reportado que dentro de las proteínas virales que están implicadas en procesos de transformación e inmortalización las más importantes son las proteínas tempranas E6 y E7, estas proteínas cuando son de VPH de alto riesgo poseen la capacidad de inmortalizar células epiteliales escamosas. Los efectos de estas oncoproteínas son de forma independiente pero son mucho más agresivas cuando se encuentran juntas(13;51;52). Las

oncoproteínas virales E6 y E7 generan sus actividades mediante interacción con p53 y Rb respectivamente.

1.1.5.1.1 Oncoproteína viral E6

La oncoproteína viral E6 tanto de los tipos virales de bajo riesgo como de alto riesgo posee un tamaño aproximado de 150 aminoácidos con un peso molecular de 16-18 kD y contienen cuatro motivos C-x-x-C, que son importantes en las funciones de activación transcripcional, transformación, inmortalización y asociación con proteínas celulares. En el caso de la proteína E6 de tipos virales de alto riesgo (AR), la región C-Terminal contiene un dominio PDZ, (PSD-95/Dlg/ZO1) implicado en la interacción con múltiples proteínas celulares (53). En los tipos virales de AR, E6 se encuentra localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma. Dentro de la secuencia de aminoácidos de esta proteína se han descrito tres motivos que dictan la localización nuclear de la misma, el primero de ellos está constituido por los aminoácidos comprendidos desde el aa 7 al aa 12, el segundo está constituido por los aminoácidos comprendidos desde el aa 65 al aa 72 y el tercer motivo está comprendido desde el aa 115 al aa 124(54).

La función más importante descrita para la oncoproteína E6 de tipos de AR es la unión con el supresor tumoral p53, dentro de las funciones caracterizadas para p53 se encuentra: la detención del ciclo celular en el punto de control G1/S si existe daño en el ADN para evitar la replicación, activa las proteínas de reparación del ADN en caso de mutación o daño, o iniciar los procesos de apoptosis si el daño en el ADN es irreparable. El blanco transcripcional de p53 es el inhibidor CDK p21 ya que la inhibición del crecimiento medida por p53 es dependiente de la activación de p21 que a su vez induce la inhibición de CDK que constituye un evento clave para la entrada a la fase S(55;56). La interacción de la proteína de E6 con P53 es mediado por la proteína celular E6AP que posee actividad ubiquitin ligasa tipo 3, esta interacción genera la proteólisis de p53 por ubiquitinación, por tanto permitiendo la entrada en la fase S. Se ha descrito una reducción en el tiempo de vida media de p53 en presencia de E6, este proceso ha sido reportado para proteínas E6 de VPH de AR pero no para tipos de BR(51;57-60).

Otros blancos celulares de la proteína E6 incluyen proteínas que poseen el dominio PDZ, induciendo su degradación mediada por ubiquitina. Varias de estas proteínas están implicadas en el control de la proliferación celular, polaridad celular y adhesión celular(61). El complejo E6/E6AP interactúa con la proteína Bax en queratinocitos humanos(62) y del receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1)(63;64) inhibiendo la acción proapoptótica de Bax y la señalización apoptótica a través del TNFR1 permitiendo la acumulación de mutaciones en el ADN.

Se ha descrito el papel de inducción de la telomerasa humana (hTERT) por parte de la proteína E6 y su papel en los procesos de proliferación celular. hTERT es un complejo compuesto por una unidad transcriptasa reversa (hTERT) y una plantilla de ARN (hTR). Este complejo es expresado en células de línea germinal, proliferación de células Stem para la renovación de tejidos y células de cáncer. La expresión de hTERT en células normales reconstituye la actividad de la telomerasa y suprime la senescencia. E6 induce la actividad de la telomerasa contribuyendo a la inmortalización de las células epiteliales por mantenimiento de la longitud de los telómeros(65). La interacción de E6 y Myc participan en la activación del promotor de *hTERT*(66). El complejo de represión del promotor *hTERT* en presencia de E6 es reemplazado por Myc lo que corresponde a altos niveles de la transcripción de hTERT y por consiguiente de la actividad de la telomerasa(67). Un mecanismo de degradación vía E6/E6AP se da con el represor del promotor de *hTERT* NFX1-91 permitiendo la unión de Myc al promotor de *hTERT*(68). En cambio NFX1-123 una variante por corte y empalme de NFX-1 junto con la proteína de unión citoplasmática poly(A) se perfila como un factor crítico para la actividad de hTERT en células epiteliales que expresan VPH16-E6(69).

1.1.5.1.2 Oncoproteína viral E7

Es una proteína de bajo peso molecular de aproximadamente 100 aminoácidos, esta oncoproteína posee tres regiones conservadas (CR, conserved regions): la región NH₂ terminal CR1, la región CR2 y la región terminal COOH dominio CR3. El dominio CR1 es necesario para la transformación celular y la degradación de pRb, pero no contribuye directamente con la unión de pRb. La región CR2 posee un dominio de unión conservado a

pRb que posee la secuencia LxCxE y un sitio de fosforilación caseína cinasa II (CKII). El dominio CR3 consiste en dos motivos C-x-x-C separados por un espacio de 29/30 aminoácidos. Esta región está implicada en la asociación de pRb y otras proteínas celulares(53;70). La oncoproteína E7 posee la capacidad de formar complejos con Rb en su estado hipofosforilado, esta interacción tiene como consecuencia la cesación de la actividad de Rb y por tanto se permite la entrada a la fase S. Rb es una proteína supresora de tumores, su función clave en el ciclo celular es el de capturar los factores de transcripción E2F, lo cual lleva a la inhibición de la replicación del ADN. La proteína Rb mantiene su expresión de forma continua durante todo el ciclo celular, esta es fosforilada en las etapas S, G2 y M del ciclo celular pero se encuentra hipofosforilada en G0 y G1. Debido a estas observaciones se ha dicho que la proteína se encuentra activa cuando está hipofosforilada y se inactiva cuando está fosforilada y permite de esta forma que las células entren en la fase S y se den todos los eventos subsecuentes del ciclo celular. La fosforilación de Rb se lleva a cabo por los complejos cinasas dependientes de ciclinas.

La actividad de transformación de E7 está mediada no solo con la unión a Rb sino con la capacidad de degradación de esta. Se ha sugerido que es la capacidad de degradación de Rb y no la unión a esta, lo que está implicado en los procesos de transformación(25;51;71). Otras proteínas celulares que se unen con E7 son las Histonas Deacetilasas (HDACs) que actúan como un co-represor transcripcional y al unirse con E7 promueven la proliferación celular(69). E7 también se une a CDK2/ ciclina A y CDK2/ciclina E. La actividad de estas cinasas fosforilan a pRb e inducen la transcripción de genes de la fase S. E7 también se une a los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs) p27 y p21, por lo que se pierde el punto de control del ciclo celular entre G1/S(72) y se promueve la progresión celular.

1.1.5.2 Cofactores asociados al desarrollo de cáncer cervical.

Dentro de los cofactores que han sido asociados al desarrollo de cáncer cervical se ha indicado que existen elementos propios del huésped tales como el estado inmunológico y por otro lado elementos propios de la infección tales como la carga viral, la variante infectante, la presencia de infecciones múltiples y la persistencia de la infección. Algunos factores como embarazos a término, hábito de fumar(73), uso de anticonceptivos

orales(74) y su uso prolongado (mayor a 8 años)(75) han sido relacionados con el desarrollo del cáncer cervical o con el incremento del riesgo para la enfermedad.

1.1.5.2.1 Persistencia de la infección con VPH.

La mayoría de las infecciones cervicales con VPH (que presentan anomalías citológicas o no) son eliminadas, gracias a la respuesta inmune celular entre 1-2 años después de la exposición(28). Los VPH más persistentes tienden a ser los más comunes, es decir los de mayor prevalencia (76). La persistencia de la infección se considera como uno de los principales cofactores implicados en el desarrollo de lesión intraepitelial de alto grado y cáncer cervical, sin embargo a pesar de esto no existe aún un consenso sobre la definición de persistencia debido a que existen problemas conceptuales frente a este aspecto. A causa de esto la duración de una infección persistente no es una constante sino que varía dependiendo del intervalo entre las pruebas usadas en cada estudio. Algunos autores indican que un resultado positivo se toma como tal en muestras consecutivas adquiridas con periodos entre tres y seis meses, indicando que si el tipo viral es un tipo predominante dentro de una población se puede generar una reinfección entre el intervalo de las dos visitas con este tipo viral que puede simular una infección persistente(77). Para subsanar estas últimas apreciaciones los estudios moleculares donde se determina la presencia de variantes han permitido demostrar que existe persistencia de la infección con variantes moleculares de VPH16 y VPH18.

Molano M, y Col. 2002(5) en un estudio tipo cohorte desarrollado en Bogotá de mujeres con citología normal, reportaron que menos de la mitad de las infecciones persisten después de un año y solo el 7% persiste después de cinco años de seguimiento. No encontraron diferencias en persistencia o eliminación de la infección entre infecciones simples y múltiples y se observaron diferencias en persistencia de acuerdo al tipo viral.

1.1.5.2.2 Potencial oncogénico de las variantes moleculares.

Un factor importante en el desarrollo de la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) es el papel de las variantes, pues estas difieren en sus propiedades biológicas y patogénicas. En

estudios que describen el curso de la infección con VPH y su papel en la génesis del cáncer cervical, temas tales como la policlonalidad de lesiones y frecuencia de variantes moleculares particulares de VPH, pueden ser críticos para el entendimiento de la infectividad y patogenicidad viral(78). Además las diferencias en la regulación trascricional viral, las actividades biológicas de las proteínas codificadas por cada variante o la habilidad del hospedero para responder a epítopes virales específicos de cada variante podrían explicar el porque unas infecciones producidas por VPH progresan a cáncer mientras que otras no(41). Los cambios en la secuencia de aminoácidos en las variantes se pueden reflejar en diferencias de patogenicidad, por lo que el riesgo para el desarrolló de Lesiones Escamosas Intraepiteliales (LEI) y cáncer invasivo de cérvix puede variar dependiendo de la variante infectante(79). Estudios en distintas poblaciones de VPH 16 han mostrado que la infección con algunas variantes de E6 puede implicar un mayor riesgo para el desarrolló de cáncer cervical invasivo, por ejemplo, la variante L83V (que tiene una sustitución de una Leucina por una Valina en el residuo 83) está asociada con mayor persistencia viral y progresión a cáncer en países como Inglaterra, Suiza y Japón(80). Los estudios desarrollados sobre los ORF E6 y E7 de VPH 58 han mostrado una asociación entre algunas variantes con la severidad de la neoplasia y el riesgo de cáncer cervical, tal es el caso de las variantes de E7 C632T y G760A asociadas con severidad de la neoplasia y cáncer cervical en la población China(81).

1.1.5.2.3 Carga viral.

La mayoría de las mujeres positivas para tipos de VPH de alto riesgo que presentan anomalías citológicas presentan una alta carga viral(82). En algunos estudios ha sido sugerido que la carga viral de los VPH puede ser un factor que influya tanto en la persistencia de la infección como en la progresión hacia cáncer cervical. Casas L. y col en 1.999(21), comprobaron que el número de copias del genoma viral por célula es mayor cuando la infección es producida por una variante de la rama AA, indicando que estas son más productivas que las Europeas. Esto concuerda con los datos obtenidos por Kämmer C y col en el 2.000(83), pues afirman que la actividad del promotor p97 en las variantes AA es 3.3 veces más alta que en las variantes E, lo que sugiere un incremento en la expresión de las proteínas virales, incluyendo aquellas que favorecen la replicación. Sin embargo, las

discrepancias entre los trabajos que apoyan la asociación de la carga viral con la progresión a cáncer y los que no, se pueden deber a que hay diferencias en la carga viral estimada dependiendo de la técnica usada.

1.2 CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS LESIONES CERVICALES

La citología vaginal está basada en el examen histomórfológico de células exfoliadas de la zona de transformación, tanto del epitelio escamoso del ectocérvix, como del epitelio columnar del endocérvix y permite identificar las lesiones incluso antes del desarrollo del cáncer cervical. El sistema con el cual se catalogan y se reportan los diagnósticos de las citologías cervicales y/o vaginales es denominado Bethesda, el cual fue introducido en 1988, revisado en 1991 y modificado en 2001(84). Con el Sistema Bethesda 2001, los especímenes de citología cervical que no contienen anomalías epiteliales son catalogadas como “negativos para lesión intraepitelial o maligna”(85).

En el proceso natural de la carcinogénesis cervical, las lesiones pueden ser clasificadas en tres grados: Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado (LEI-BG), en donde las alteraciones comprometen menos de la tercera parte de la totalidad del epitelio involucrado; Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado (LEI-AG), si las alteraciones comprometen más del tercio inferior del epitelio; y Carcinoma de Cervix, en el cual se ven involucrados tejidos de sostén del epitelio.

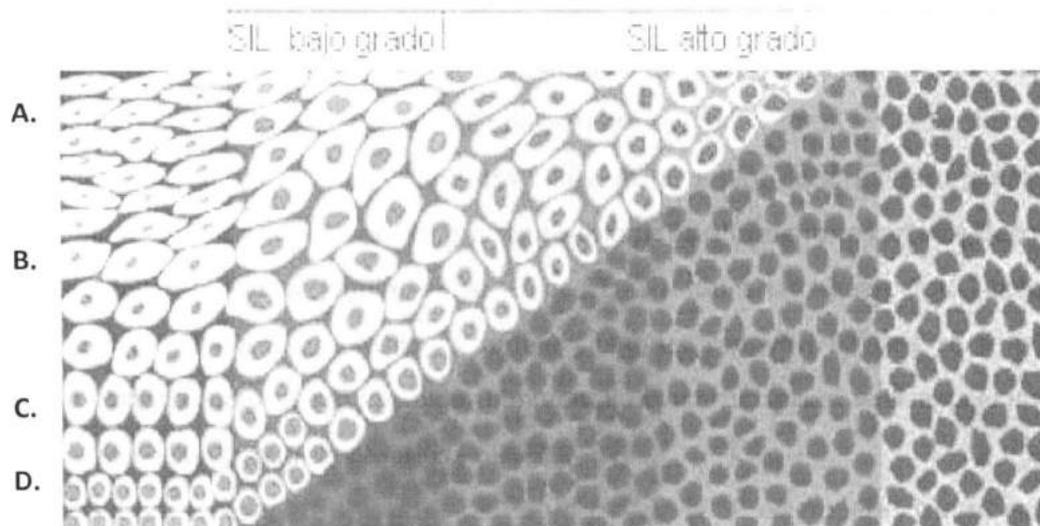
Histológicamente, las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales de grado I (NIC I) son catalogadas y corresponden dentro del Sistema Bethesda como LIE-BG y las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales grado II y III (NIC II y III) como LEI-AG.(84)

La citología cervico-uterina es el método de tamizaje por excelencia del Cáncer Cervical, sin embargo la toma y su lectura pueden presentar algunos problemas. En cuanto a la cantidad adecuada de las células obtenidas en un raspado cervical para poder ser evaluadas en el Sistema Bethesda, la citología puede ser catalogada como “satisfactoria” o “no satisfactoria”. En muchos casos por error, una citología “no satisfactoria” puede

catalogarse como una condición benigna, pudiendo ser este un resultado falso-positivo(86).

En general se ha descrito a la citología como una prueba altamente específica pero poco sensible(87;88), es decir; con ella es posible detectar a todas las mujeres que realmente poseen anomalías cervicales pero también, bajo este mismo diagnóstico se pueden incluir mujeres que no poseen cambios en el epitelio y que posteriormente son enviadas a exámenes confirmatorios innecesarios.

Figura No 3. Lesiones del cerviz



Lesiones intraepiteliales. A: Células superficiales. B: Células intermedias. C: Células parabásales. D: Células basales. SIL: Squamous Intraepithelial Lesión.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERALES

- Analizar la presencia y persistencia de variantes de E6 y E7 de VPH 58 en mujeres con infecciones prevalentes e incidentes, con citología normal durante siete años de seguimiento en la cohorte de Bogotá.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar revisión de la literatura a nivel mundial para la identificación de las variantes moleculares reportadas de los ORF E6 y E7 de VPH58.
- Desarrollar la técnica de secuencia directa y Reverse Line Blot para realizar el análisis de variantes de E6 y E7 de VPH 58 en mujeres con citología normal de la cohorte de Bogotá.
- Analizar la presencia de variantes de E6 y E7 VPH 58 en mujeres con infecciones prevalentes e incidentes con citología normal positivas para VPH 58 que pertenecen al proyecto Historia Natural del virus del papiloma humano su papel y el papel de otros cofactores en el desarrolló de cáncer de cérvix.
- Analizar la persistencia de variantes de E6 y E7 de VPH 58 en mujeres con infecciones prevalentes e incidentes con citología normal seguidas durante un periodo de siete años.
- Realizar el análisis de la carga viral de las infecciones producidas por VPH 58 y su asociación con la presencia y persistencia de variantes de E6 y E7 de VPH 58 en la población de estudio.

3. METODOLOGÍA

3.1 POBLACIÓN Y DISEÑO DEL ESTUDIO

Este proyecto se incluye dentro de un proyecto principal de investigación tipo Cohorte con el cual se pretende analizar la historia natural de la infección por VPH, su papel y el papel de otros factores en el desarrollo de cáncer de cuello uterino, dentro de lo que se incluye el estudio de variantes moleculares.

Entre noviembre de 1993 y noviembre de 1995, el Instituto Nacional de Cancerología condujo un censo poblacional en cuatro centros de salud en Bogotá. Dos mil mujeres con edades entre 18 y 85 años fueron identificadas al azar e invitadas a participar en el estudio de Cohorte. Adicionalmente para tener una mayor información sobre el comportamiento sexual de las adolescentes, 200 jóvenes sexualmente activas, con edades entre los 13 y 17 años y quienes asistían a Profamilia para recibir consejería acerca del uso de contraceptivos también fueron invitadas a participar. En el reclutamiento las mujeres respondieron a un cuestionario epidemiológico estructurado con énfasis en características sociales, comportamiento sexual, historia reproductiva, hábitos de fumar y dieta. Después de la entrevista, a todas las mujeres se les hizo un examen ginecológico y se les tomó un cepillado cervical para realizar un análisis citológico y detección de ADN de VPH, adicionalmente a estas mujeres se les tomó una muestra de sangre para hacer análisis de anticuerpos.

Después de algunas exclusiones (rehusar participar, presentar histerectomía, problemas mentales, anomalías citológicas en la línea de base entre otros), un total de 1995 mujeres (90.7%) entraron al estudio de cohorte, de las cuales 1845 tuvieron citología normal. Se obtuvo un consentimiento informado de todas las participantes en el estudio. Los comités éticos del Instituto Nacional de Cancerología y la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) en Lyon aprobaron el proyecto inicial.

El seguimiento consistió de una visita cada 6-9 meses. En cada visita se respondió a un cuestionario de seguimiento y se tomó nuevamente un raspado cervical para análisis citológico y de ADN de VPH. El seguimiento terminó en Diciembre del 2002 o cuando se presentó un diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical grado III (NIC III). Las mujeres que presentaron una diagnosis de NIC III, fueron sometidas a biopsia para confirmación del diagnóstico y recibieron el tratamiento respectivo. Los resultados de los análisis de VPH no se conocieron durante el seguimiento y no influyeron en el manejo clínico de las mujeres. Los análisis que se llevaron a cabo en el desarrollo de este proyecto se basan en un subgrupo de muestras de la cohorte, correspondientes a 103 mujeres con infecciones prevalentes o incidentes por VPH58 con citología normal, las cuales fueron seguidas por un periodo de siete años, y de las cuales se tiene un total de 815 muestras dentro de las cuales 168 muestras fueron positivas para VPH 58.

A este grupo de muestras se le realizó el estudio de las variantes de E6 y E7 de VPH 58 teniendo como criterio de eliminación de la infección la no presencia de la misma variante de manera consecutiva durante el seguimiento, así mismo se realizó una asociación entre la presencia y persistencia de la infección por VPH 58 y sus variantes con la carga viral.

La fecha de la eliminación de la infección por VPH 58 o de las variantes se definió como la mitad del intervalo de tiempo entre la última muestra positiva para VPH 58 y la siguiente negativa. Para el análisis de variantes de E6 y E7 de VPH 58 se mantuvo el mismo criterio.

3.2 REVISIÓN DE LITERATURA.

Se desarrolló una búsqueda de artículos publicados entre los años 1.991 a 2.009 en la base de datos MEDLINE con el fin de identificar las variantes moleculares del ORF E6 y ORF E7 del VPH 58 reportadas a nivel mundial, así como de las mutaciones que las caracterizan, las variantes más reportadas y las poblaciones en donde se reportaron. Esta búsqueda se complementó de manera manual revisando las listas bibliográficas de los artículos más relevantes. La información de las diferentes variantes reportadas a nivel mundial se recopiló en tablas que se realizarán en Excel.

3.2.1 Selección de las secuencias.

Los criterios para la inclusión de las secuencias incluidas en la tabla comparativa fueron: 1) que las variantes hallan sido identificadas utilizando la técnica de secuencia automática. 2) que la secuencia reportada para la variante incluya todas las mutaciones detectadas en la misma incluyendo silenciosas y no silenciosas. 3) que la secuencia reportada incluya información completa de los nucleótidos 110- 559 para el ORF E6 y de los nucleótidos 575 - 871. 4) que la comparación de la secuencia se realizara con la secuencia referencia de VPH 58 (numero de acceso a GenBank NC_001443)(89)

3.3 MUESTRAS.

En el desarrollo de este proyecto no se realizó tomas o recolección de muestras, ya que estas hacen parte del Banco de muestras del Instituto Nacional de Cancerología, almacenadas a -70°C.

3.3.1 Muestras objeto del estudio.

Las muestras objeto del estudio son cepillados cervicales de mujeres que se encontraron positivas para el virus de papiloma humano tipo 58 durante el desarrollo del estudio de cohorte "Historia Natural de la infección por el virus del papiloma humano su papel y el papel de otros cofactores en el desarrollo de cancer de cervix" las cuales firmaron un consentimiento informado previo. Estas muestras se encuentran almacenadas en el banco de muestras existente en el Instituto Nacional de Cancerología, a -70°C. La detección y tipificación del VPH presente en las muestras, se realizó mediante PCR utilizando los iniciadores Gp5+/6+, seguido de hibridación Southern-blot y de ensayos inmunoenzimáticos o enzyme immune assay (EIA) y Reverse Line Blot(5)

3.3.2 Procesamiento de la muestra.

Las muestras se encuentran almacenadas a -70 C en Buffer Tris HCl 10mM pH 8.3, de estas se tomó una alícuota de 100µl a 150µl la cual se llevó a 95°C por 10 min. Se centrifugó por 1 min. a 3000 rpm y se colocó en hielo para posteriormente ser almacenada a -20°C. Para el análisis de la región E6 y E7 del VPH 58 por PCR se tomó 10µl del sobrenadante. El tratamiento de las muestras se realizó de acuerdo a lo descrito en reportes previos(5).

3.3.3 Evaluación de la calidad y del procesamiento de las muestra.

La calidad de la muestra y su procesamiento se evaluó realizando una Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Polimerase Chain Reaction) que amplifica un fragmento de 209 pb del gen de β-globina. Los iniciadores utilizados fueron BGPCO₃ (5'-ACACAACGTGTCTACTAGC- 3') y BGPCO₅ (5'-GAAACCCAAGAGTCTTCTCT- 3'). Para esta PCR se utilizó el ADN extraído de las líneas celulares SiHa y Hela como controles positivos y como controles negativos se utilizó la mezcla de PCR sin ADN y la mezcla de PCR con agua en lugar de ADN. Así mismo se analizó el ADN proveniente del procesamiento de las muestras. Esta PCR se realizó según metodología previamente descrita(5).

3.4. DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH.

La detección de VPH se realizó utilizando el ADN extraído de las células cervicales, provenientes de los cepillados cervicales, mediante amplificación por PCR de un segmento de 142 pb del ORF L1, utilizando los iniciadores consenso GP5+ (5' – TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC – 3') y GP6+ (5'– GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC – 3'), esta PCR se realizó según metodología previamente descrita (Molano 2002 Bj Jornal cancer 17). La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 50 µl, con 10 mM Tris HCl (pH de 8.5), 50 mM de KCl, Triton® X- 100 al 0.1 %, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 25 picomoles de cada iniciador y 1 U. GoTaq® Flexi ADN Polymerase (Promega), 10 µl de muestra o de controles, el volumen final fue ajustado con agua. Se realizaron 40 ciclos de amplificación utilizando un Termociclador PTC 200 Peltier Termal Cyler (MJ Research). Cada ciclo incluye un paso de denaturación a 94°C durante 1 min, una hibridación a 40°C durante 2 min, una extensión de 72°C durante 1.5 min, antes de iniciar el primer ciclo de

temperaturas la reacción fue precedida por una denaturación a 94°C durante 4 min. Y el último ciclo fue seguido por un paso de elongación a 72°C durante 4 min.

La tipificación del VPH detectado en las exfoliaciones cervicales se realizó mediante PCR – EIA y Reverse Line Blot, de acuerdo también a metodología previamente descrita. (5;90)

3.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ORF E6 y ORF E7 DEL VPH 58.

Para la identificación de las variantes moleculares del ORF E6 y ORF E7 del VPH 58, se realizó una amplificación del ORF E6 y ORF E7 mediante la técnica de PCR .

Para el desarrollo de la PCR se utilizaron iniciadores que flanquean la región de ADN viral comprendida entre nucleótidos 79 al 600 del ORF E6 de VPH 58 utilizando el iniciador sentido E6F1 (5'- CTG TGC AGT GTG TTG GAG A -3') ubicado entre el nucleótido 79 al 99 y el nucleótido antisentido E7R1 (5'- TCTTAGCGTTGGGTTGTT -3') ubicado entre los nucleótidos 583 al 600. También se utilizaron dos iniciadores adicionales que se ubican aproximadamente en la mitad del ORF E6 el iniciador sentido E6F5 (5'- AAA GTG TGC TTA CGA TTG C -3') ubicado entre el nucleótido 299 al 317 y el iniciador antisentido E6R4 (5'- AAT GTG TCT CCA TAT AGC G -3) ubicado entre el nucleótido 354 a 372. De igual forma la totalidad del ORF E7 se abarcó desde el nucleótido 595 al 896, se utilizó el iniciador previamente reportado E7P1 (5'- CTGTAACAACGCCATGAGAG -3') ubicado entre el nucleótido 561 al 580 y el iniciador antisentido E7P2 (5'- TCAGGGTCATCCATTGCAGA -3') ubicado entre el nucleótido 877 al 896. De igual forma se utilizaron un par de iniciadores en la mitad de la secuencia del ORF E7, el iniciador sentido E7F10 (5'- AAA TAG GCT TGG ACG GG -3') ubicado entre en el nucleótido 680 al 696 y el iniciador antisentido E7R10 (5'- GAT ACA CAA ACG AAC CGT -3') ubicado entre el nucleótido 766 al 783. Estos iniciadores se seleccionaron de reportes previos y otros fueron diseñados en el laboratorio mediante el software Gene Runner 3.05. La secuencia de cada iniciador fue comparada, revisada y confirmada mediante BLAST con el GeneBank en la **Tabla No 1** se observan los ORFs E6 y E7 VPH 58 con los iniciadores utilizados en el estudio.

Tabla No. 1 ORF E6 y E7 VPH 58 VPH58 Referencia (124) indicando la posición de los iniciadores para PCR.

	1	CTAAACTATA	ATGCCAAATC	TTGTAAAAAC	TAGGGTGTAA	CCGAAAACGG	TCTGACCGAA		
		GATTTGATAT	TACGGTTTAT	AACATTTTTG	ATCCACATT	GGCTTTTGGC	AGACTGGCTT		
E6	1			E6F1 →				M F Q D	
	61	ACCGGTGCAT	ATATAAAGCA	GAGATTTTTT	GGTAGGCTAC	TGCAGGACTA	TGTTCCAGGA		
		TGGCCACGTA	TATATTTTCGT	CTGTAAAAAA	CCATCCGATG	ACGTCCTGAT	ACAAGGTCTT		
	5	A E E K P R	T L H D	L C Q	A L E T S V H				
	121	CCAGAGGAG	AAACCACGGA	CATTGCATGA	TTTGTGTAG	GCSTGGAGA	CATCTGTGCA		
		GGTCTCCCT	TTTGTGTCCT	GTAACGTACT	AAACACAGTC	CGCAACCTCT	GTAGACACGT		
	25	E I E L K C	V E C K	K T L Q R S	E V Y D				
	181	TGAAATCGAA	TTGAAATGCG	TTGAAATGCAA	AAAGACTTTG	CAGGATCTG	AGGTATATGA		
		ACTTTAGCTT	AACTTTACGC	AACTTACGTT	TTTGTGAAAC	GTCCGTAGAC	TCCATATACT		
	45	F V F A D L	R I V Y	R D G N P F	A V C K				
241	CTTTGTATT	GCAGATTAA	GAATAGTGT	TAGAGATGGA	AATCCATTG	CAGTATGTA			
	GAACATAAA	CGTCTAAAT	CTTATCAGAT	ATCTCTACCT	TTAGGTAAC	GTTCATCATT			
		E6F5 →							
65	V C L R L L	S K I S	E Y R	M Y N	Y S L Y				
301	AGTGTCTTA	CGATTGGTAT	CTAAAATAAG	TGAGTATAGA	CATTATAAAT	ATTCCGCTATA			
	TCACACGAAT	GCTAACGATA	GATTTTATTC	ACTCATATCT	GTAATATTA	TAA			
								← E6R4	
85	G D T L E Q	T L K K	C L N	E I L	I R C I				
361	TGAGAGACA	TTAGAACAAA	CACTAAAAAA	GTGTTTAAAT	GAATATTA	TTAGATGTAT			
105	I C Q R P L	C P Q E	K K R	M V D	L N K R				
421	TATTTGTCAA	AGACCATTGT	GTCCACAAGA	AAAAAAAAGG	CATGTGGATT	TAACAAAAG			
	ATAAACAGTT	TCGGTAACA	CAGGTGTCT	TTTTTTTTCC	GTACACCTAA	ATTGTTTTTC			
125	F H N I S G	R W T G	R C A	V C M	R P R R				
491	CTTTCATAAT	ATTTCGGCTC	GTTCCACAGC	GGCCTGTCCA	GTGTCTTCCA	CACCCCGCCG			
	CAAAGTATTA	TAAAGCCCAG	CAACCCTGCC	CGGACACGTC	CACACAACCT	CTGGGGCTGC			
		E7P1 →							
145	R Q T Q V #		M R	G N N P	T L R				
541	TAGACAAACA	CAAGTGTAA	GTGTAAACAAC	GCCATGAGAG	GAACAACCC	AACGCTAAGA			
	ATCTGTTTTG	GTTCACATTG	GACATTTGTTG	CGGTACTCTC	CT				
								← E7R1	
10	E Y I L D L H	P E E T D L	F C Y E	Q L C					
601	GAATATATTT	TAGATTTACA	TCCTGAACCA	AGTGACCTAT	TCCTCATGA	GCAATTATGT			
	CTTATATAAA	ATCTAAATGT	AGGACTTGGT	TGACTGGATA	AGACGATACT	CGTTAATACA			
30	D S S D E D E	I G L D G P	D G Q A	Q P A					
661	GACAGCTCAG	ACGAGATGA	AATAGGCTTG	GACGGGCCAG	ATGGACAAGC	ACAACCGGCC			
	CTGTCCAGTC	TGCTCTACT	TTATCCGAAC	CTGCCCGGTC	TACCTGTTTG	TGTTGGCCGG			
50	T A N Y Y I V	T C C Y T C	G T T V	R L C					
721	ACAGCTAATT	ACTACATTGT	AACTTGTGTT	TACACTTGTG	GCACCACGGT	TCGTTTGTGT			
	TGTCGATTAA	TGATGTAACA	TTSAACAACA	ATGTGAACAC	CGTGGT			← E7R10	
70	I N S T T T D	V R T L Q Q	L L M G	T C T					
781	ATCAACAGTA	CAACAACCGA	CGTACGAACC	CTACAGCAGC	TGCTTATGGG	CACATGTACC			
90	I V C P S C A	Q Q #							
841	ATTGTGTGCC	CTAGCTGTGC	ACAGCAATAA	ACACCATCTG	CAATGGATGA	CCCTGAAGGT			
	TAACACACGG	GATCGACACG	TGTCGTTATT	TGTGGT		TCCA			
								← E7P2	

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos codificados por los ORF E6 y ORF E7 del VPH 58R. El número ubicado al lado izquierdo de cada fila indica la posición del primer nucleótido y aminoácido de cada una de estas. Las letras en rojo indican las posiciones de nucleótidos en los cuales se ha reportado algún cambio que genera cambio de aminoácido, las letras en azul indican posiciones de nucleótidos en las cuales se ha reportado algún cambio pero que no genera cambio de aminoácido. En amarillo se resalta la secuencia y ubicación de los iniciadores sentido (E6F1, E6F5, E7P1 Y E7F10) empleados en este trabajo y en verde se resalta la secuencia y ubicación de los iniciadores antisentido (E7R1, E6).

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ l, cada una con: Tris HCl 10 mM a un pH de 9.0, KCl 50 mM, Triton® X- 100 al 0.1 %, MgCl₂ 2.5 μ M, dNTPs 0.2 μ M, 0.5 μ M de cada iniciador y 1.25 u. de Taq Polimerasa, 10 μ l de muestra o de controles y el volumen final se ajustó con agua.

3.5.1 Ensayos de sensibilidad de la PCR.

Se realizaron diluciones seriadas de muestras VPH 58 previamente tipificadas y cuantificadas para establecer el nivel de sensibilidad de las PCRs. Las muestras se clonaron para tener el suficiente material control positivo del ORF E6 y E7. Para el desarrollo de todos los experimentos, se realizó la cuantificación del ADN obtenido, utilizando un espectrofotómetro y se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 10ng/ μ l, 1ng/ μ l, 100pg/ μ l, 10pg/ μ l, 1pg/ μ l y 100fg/ μ l. De cada una de estas diluciones se tomaron 10 μ l para realizar las PCRs y establecer el nivel de sensibilidad de la técnica (lo que indica el limite de amplificación). Estos ensayos fueron realizados en triplicado para garantizar la reproducibilidad.

3.5.2 Ensayos de especificidad.

Para los ensayos de especificidad se utilizaron muestras pertenecientes al Proyecto de Historia Natural, previamente tipificadas y en las cuales se detectó ADN de tipos de VPH diferentes al VPH 58, muestras en las que se detectó ADN de otros agentes bacterianos como *C. trachomatis*, ADN humano obtenido y purificado a partir de células sanguíneas y ADN obtenido y purificado de diferentes microorganismos (*H. pylori*.)

3.5.3 Controles positivos y negativos.

Para cada PCR se utilizaron como controles positivos tres diluciones seriadas del producto clonado de las muestras de los ORF E6 y E7 de VPH 58, en el que se incluía el nivel mínimo de detección previamente estandarizado, en los ensayos de sensibilidad.

Como controles negativos se utilizaron 2 tubos con mezcla de PCR sin ADN y 2 tubos de agua por cada experimento realizado. Estos controles internos de calidad de los

experimentos nos ayudaron a comprobar que el grado de exactitud de los resultados se mantuvo.

3.6 ELECTROFORESIS.

Para la visualización de los productos obtenidos por PCR se realizó electroforesis horizontal con geles de Agarosa al 1% TBE, coloreados con Bromuro de Etidio, corridos con Buffer TBE 0.5 X, a un voltaje de 110w, y se observaron con luz ultravioleta, mediante el uso de un analizador de Imágenes BioRad. Como marcadores de peso se utilizaron ϕ X174ADN/Hae II (Promega) y/o 100 bp ADN Ladder (invitrogen) dejando registro gráfico de cada observación.

3.7 DETECCIÓN DE VARIANTES MOLECULARES DEL ORF E6 y ORF E7 DEL VPH 58

La detección e identificación de las variantes moleculares del ORF E6 y ORF E7 del VPH 58 se realizó mediante la técnica de secuencia automática y mediante el desarrollo de la técnica de Reverse Line Blot, la cual ha sido descrita y utilizada para otros fines.

3.7.1 Desarrollo de la técnica de Reverse Line Blot

Para el desarrollo de la técnica se utilizaron oligosondas marcadas con un grupo Amino en la posición 5', estas sondas fueron diseñadas en el laboratorio mediante el software Gene Runner 3.05. La secuencia de cada sonda se comparó, revisó y confirmó mediante el uso de BLAST. El grupo amino de las sondas sirve para unir las mismas a una membrana cargada negativamente Byodine C (Pall Corporation) de acuerdo al principio de la técnica descrito previamente(91).

El criterio de selección y/o diseño de las sondas se basó en la revisión de literatura, procurando que detecten mutaciones que permitan identificar y diferenciar las diferentes variantes reportadas de manera específica y además aquellas que detecten mutaciones que conlleven a cambio de aminoácidos. Así mismo se diseñó un grupo de sondas control,

de acuerdo a la secuencia del VPH 58 Referencia (VPH 58R)(89), que incluyera la región de la mutación reportada.

3.7.1.1 Hibridación de los Productos de PCR y Detección

En breve, 10 μ L de los productos de PCR de las muestras fueron adicionados a 150 μ L de 2X SSPE/0.1% SDS, y denaturados por 10 min a 99°C. La membrana (con las sondas de oligonucleótidos) se colocaron en un minibloter, de tal manera que los pozos de siembra del miniblot quedaron perpendiculares a los oligonucleótidos. A los pozos de siembra se le aplicaron los productos de PCR (160 μ L) y se hibridaron por 45 min. Las muestras fueron removidas del minibloter por aspiración y la membrana se lavó 2 veces en 2X SSPE/0.5% SDS x 15 min. Posteriormente la membrana se incubó con el conjugado de streptavidina-peroxidasa diluido en 2X SSPE/0.5% SDS por 45 min y posteriormente se realizaron 2 lavados en 2XSSPE/0.5% por 10 minutos. Para la detección quimio-luminiscente del ADN hibridado, la membrana se incubó en ECL líquido de detección y se expuso a un film (Hyperfilm). El film posteriormente fue desarrollado.(91)

Las condiciones (concentraciones de reactivos, temperaturas y tiempos) de realización del RLB se ajustaron durante la estandarización de la prueba y se validaron con la realización de ensayos de reproducibilidad.

3.7.1.2 Análisis de variantes en E6 y E7 de muestras control usando el RLB

Se realizaron ensayos de identificación de variantes mediante el RLB de muestras a las que previamente se les había identificado la presencia de variantes por secuencia directa con el fin de analizar la reproducibilidad inter ensayos.

3.7.2 Validación de la Técnica Reverse Line Blot

Para la validación de la técnica Reverse Line Blot como método de detección e identificación de variantes moleculares en el ORF E6 y ORF E7 del VPH 58, se utilizaron muestras de cepillados cervicales que pertenecen a la línea de base de la cohorte y

muestras usadas en la estandarización, las cuales se analizaron en forma paralela con la técnica de secuencia directa (Gold Estándar) y con la técnica de RLB como métodos de detección e identificación de variantes moleculares en E6 y E7. Se realizaron ensayos de concordancia entre las dos técnicas mediante análisis de valores de kappa.

3.7.2.1 Secuencia automática

Para purificar los productos de PCR se utilizó el kit comercial GFX™ PCR (Amersham Biosciences). Se realizó secuenciación directa del ORF E6 y ORF E7, en un Secuenciador Personal Amersham Pharmacia Biotech (Seq 4x4), con el Kit de Secuencia 7-Deaza-dGTP marca Visible Genetics. Utilizando los amplímeros inicialmente obtenidos de las diferentes PCRs dirigidas hacia la región E6 y E7 del VPH58. Cada mezcla de secuencia contenía: 2.5 µl de Buffer de secuencia (Tris HCl 260 mM a pH 8.3, MgCl₂ 39 mM), 2.5 µl de un iniciador marcado en 5' con Cy 5.5. a una concentración de 3 µM, 2 µl de DMSO (Dimetil sulfoxido), 4 µl de ADN purificado del producto amplificado, 4µl de enzima Thermo sequenase™ diluida 1:10 en Buffer Thermo sequenase™, 7 µl de H₂O destilada y 1.5 µl del ddNTP correspondiente (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, cada uno de estos contiene 750 µM de cada dATP, dCTP, dTTP, 562.5µM de dGTP, 185.5µM de 7 -deaza-dGTP y 2.5µM del correspondiente ddNTP diluido en EDTA 0.1 mM. a pH 8.0).

Para cada reacción de secuencia se realizaron 2 fases de ciclado, uno de 18 ciclos y uno de 15 ciclos en un Termociclador PTC 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). La fase iniciadora de ciclado incluyó una denaturación a 94°C durante 15 seg., una hibridación a 50°C durante 15 seg., y una extensión de 70°C durante 60 seg. La segunda fase de ciclado incluyó una denaturación de 94°C durante 15 seg., y una extensión de 70°C durante 60 seg. La fase iniciadora de ciclado fue precedida por una denaturación a 94°C durante 2 min., y la segunda fase de ciclado fue seguida por una extensión de 72°C durante 2 min.

Una vez terminadas las fases de ciclado se adicionó a cada reacción 6 µl de Formamida y se realizó una denaturación a 94°C, posteriormente se colocaron en hielo y se almacenaron a -20°C hasta que se realizó el corrido de la muestra a 1500 w y 50°C en geles de poliacrilamida al 6% (pre-corridos) (Visible Genetics) utilizando un Secuenciador Personal 4X4 Amersham Pharmacia Biotech.

3.7.2.1.1 Análisis de la secuencia obtenida.

Las secuencias obtenidas con el programa Seq 4 X 4 2.0. se confirmó mediante: BLAST con el GeneBank y BLAST.

Las variaciones encontradas, tanto como de nucleótidos como de aminoácidos se ubicaron y numeraron teniendo como referencia la secuencia del genoma de referencia para el Virus del Papiloma Humano 58 o VPH – 58R(89)

3.7.3 Detección de Variantes de E6 y E7 en las muestras de la Cohorte

A las muestras positivas para VPH 58 en la línea de base se les realizó la detección de variantes usando ambas técnicas: el reverse line blot y la secuencia directa. La técnica con la cual se obtuvo mejores datos de sensibilidad, especificidad y facilidad para la detección del mayor número de variantes en E6 y E7 de VPH58 se seleccionó para realizar los análisis de variantes en E6 y E7 de las muestras positivas para VPH 58 durante el seguimiento.

3.8 ANÁLISIS DE LA CARGA VIRAL.

El método de ensayo inmuno-enzimático o enzyme immune assay (EIA) puede ser utilizado como un método semi-cuantitativo para determinar la cantidad relativa de copias virales de ADN de VPH en los raspados cervicales, la razón de esto es que existe una relación de tipo lineal entre la cantidad de ADN viral y la densidad obtenida en la realización específica de la EIA, la realización de este análisis ha sido descrito previamente.(92)

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Este proyecto es un estudio de seguimiento de tipo cohorte.

Se utilizó el programa estadístico SPSS 17 para el análisis de los resultados. Y se desarrollaron dos tipos de análisis:

Uno de Corte Transversal: En el cual se realizó el análisis de la prevalencia de variantes de E6 y E7 de VPH 58 y su asociación con carga viral en la línea de base

Otro de Corte Longitudinal: En el cual se analizó la persistencia o eliminación de la

infección por VPH58 y sus variantes y su asociación con carga viral durante 7 años de seguimiento.

El tiempo de eliminación de la infección por VPH 58 y las variantes se modeló usando el método de Kaplan-Meier el cual estima la probabilidad de eliminación de la infección por VPH 58 como una función de tiempo desde el enrolamiento.

Se analizaron factores asociados potencialmente con eliminación de la infección por VPH 58 como las variantes de E6 y E7 de VPH 58 y la carga viral. Se realizó un análisis de regresión de Cox para estimar los riesgos relativos (RR) y los intervalos de confianza (ICs) del 95% en la eliminación de la infección por VPH 58 de acuerdo a los diferentes factores de riesgo.

4. RESULTADOS

4.1 REVISIÓN DE LITERATURA VARIANTES MOLECULARES ORF E6 Y E7 VPH 58.

La ejecución de la revisión se efectuó mediante la búsqueda en las bases de datos PUBMED y MEDSCAPE identificando los artículos en los que se había realizado descripción de variantes moleculares del ORF E6 y E7 de VPH 58. Esta revisión se complementó con la revisión de los listados de referencias de artículos relevantes sobre el tema y de la búsqueda de secuencias consignadas en el GENBANK. Hasta la fecha, los reportes sobre variantes de E6 y E7 de VPH son escasos y corresponden a trabajos desarrollados en poblaciones asiáticas. Los reportes con información completa de las variantes de ambos ORF E6 y E7 son el trabajo de Chan P. et al 2002 y de Wu E. et al 2009, aunque este último trabajo presenta variaciones en la secuencia no solo en la región conservada (LCR, E6 y E7) sino también en la región variable del genoma viral. El trabajo de Xin C, et al 2001 reporta variantes únicamente en el ORF E6 igual que el trabajo de Calleja-Macias I, et al 2005. En la **tabla 2** se incluye la información de los artículos incluidos en el estudio y la **tabla 3** incluye las variantes de los E6 y E7 de VPH 58 reportadas hasta la fecha.

Tabla 2. Artículos incluidos dentro del estudio de los cuales se obtuvo información completa de las de los ORF E6 y E7 de VPH58.

Año	Autor	ORF Secuenciado	Región Secuenciada	Origen de las muestras	Muestras positivas VPH 58
2001	Xin Cui, et al.	E6	95-560	Japón	41
2002	Chan Paul, et al.	E6 y E7	54-560 (E6) 561-877 (E7)	China	220
2005	Calleja-Macias I, et al.	LCR, E6, LL	94-575 (E6)	China, Escocia, Brasil, Alemania, Mali, Marruecos	6(E6)
2009	Wu En-qi, et al.	Genoma completo	Genoma completo	China	37

4.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS ORF E6 Y E7 DE VPH58.

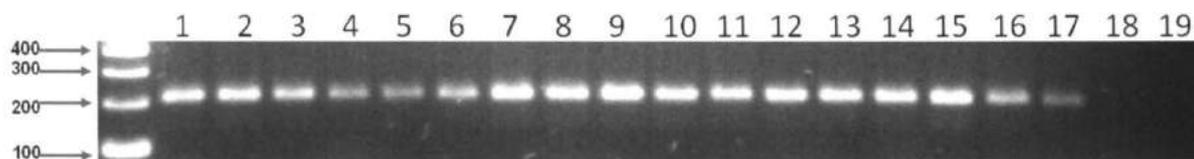
A 168 muestras que fueron positivas para VPH 58 y que entraron al estudio, se les realizó la amplificación del gen de la β -Globina (209pb) con el fin de confirmar la calidad del ADN. El análisis mostró que el 100% de la muestras amplificaron para este gen. La figura No 4 muestra la amplificación de un grupo de muestras y los respectivos controles positivos y negativos. **Figura No 4.**

Tabla 3. Variantes moleculares de los ORF E6/E7 de VPH 58 reportadas en la literatura hasta la fecha mediante la técnica de secuencia directa. Se incluye las diferentes posiciones donde se han reportado cambios de nucleótidos de estos ORFs. HPV 58R: secuencia referencia, las letras en minúscula nos indican cambio de nucleótido que no llevan a cambio de aminoácido, las letras en mayúscula son cambios de nucleótidos que llevan a cambio de aminoácidos. En los cambios de aminoácidos, la primera letra indica el aminoácido de VPH 58R, la segunda letra indica el aminoácido del cambio.

HPV 58R	E6									E7									CAMBIO DE A.A		REFERENCIA							
	1	2	2	3	3	3	3	4	5	5	6	6	6	7	7	7	7	7	7	8		8	8	8	8	E6	E7	
	8	0	5	0	6	7	8	9	3	9	3	3	9	2	4	5	6	6	9	9		0	0	4	5	5		
	7	3	8	7	7	4	8	2	8	9	2	8	4	6	4	6	0	1	3	8	1	3	0	2	7			
	C	G	A	C	C	G	A	T	A	G	C	T	G	T	T	T	G	G	A	C	C	T	C	T	G			
1	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			Chan et al. 2002
2	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K93N		Chan et al. 2002, Wu et al. 2009
3	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I128T		Wu et al. 2009
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-			Chan et al. 2002
5	t	-	-	t	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	G	t	A	-	t	c	-	D86E	T74A/D76E	Chan et al. 2002
6	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			Chan et al. 2002
7	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	g	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-		G41R/G63D	Chan et al. 2002
8	-	C	-	t	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	g	-	A	-	G	t	A	-	-	-	-	E32Q/D86E/K93N	G63S/T74A/D76E	Chan et al. 2002
9	-	-	-	t	-	-	-	-	-	A	T	-	-	-	g	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-		R9K/T20I/G63S	Chan et al. 2002
10	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	g	c	-	A	-	-	-	-	-	-	-		G41R/G63D	Chan et al. 2002
11	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	g	-	C	A	-	-	-	-	-	-	-		G41R/G63H	Chan et al. 2002
12	-	-	-	t	-	-	-	c	-	-	-	-	A	-	g	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-		G41R/G63D	Chan et al. 2002
13	-	-	-	t	A	-	-	-	-	-	-	-	c	g	-	-	-	G	t	A	-	-	-	-	-	D86E	T74A/D76E	Chan et al. 2002
14	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	g	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-		T20I/G63S	Chan et al. 2002, Wu et al. 2009
15	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	g	-	A	-	-	-	C	-	-	-	-		G41R/G63D/V77A	Wu et al. 2009
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-		V77A	Chan et al. 2002
17	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	K93N	V77A	Chan et al. 2002, Wu et al. 2009
18	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-		V77A	Wu et al. 2009
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	g	-	-	-	-	-	C	-	-	A	-		L22P/V77A/C105Y	Wu et al. 2009
20	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	E88K/K93N	V77A	Wu et al. 2009
21	-	-	-	-	-	-	C	-	-	A	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	K93N	R9K/V77A	Wu et al. 2009
22	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	g	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	K93N	G41R/G63D	Chan et al. 2002
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	g	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-		T20I/G63S	Chan et al. 2002
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	g	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-		G41R/G63D	Chan et al. 2002

Figura No 4. Evaluación de la calidad del ADN de las muestras

PCR – PCO₃/PCO₅ (209 pb. β-globina)



La numeración a la izquierda indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular, 100 bp ADN Ladder (Invitrogen) del 1 al 15 se indican diferentes muestras positivas para la amplificación de β-globina (209pb), 16 y 17 controles positivos, 18 y 19 son los controles negativos de la PCR, mezcla de PCR sola y mezcla de PCR con agua en lugar de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Para la amplificación de los ORF E6 y E7 de VPH 58 se desarrollaron y estandarizaron un total de 6 PCRs (tres para cada ORF). Las PCRs para el ORF E6 incluyen una que amplifica todo el ORF mediante los iniciadores E6F1 y E7P1 dando un fragmento correspondiente de 521pb, la segunda con los iniciadores E6F1 y E6R4 amplifican la primera parte del ORF que corresponde a un fragmento de 293pb, la tercera con los iniciadores E6F5 y E7R1 amplifica un fragmento de 301pb de la segunda parte del ORF E6. **Tabla No 4.**

Tabla No 4. Iniciadores ORF E6 VPH 58.

NOMBRE	SECUENCIA	LONGITUD	UBICACIÓN	COMBINACION	AMPLIFICADO
HPV58 E6F1	5'- CAGACATTTTTGGTAGGCTA -3'	21	79 al 99	E6F1/E7R1 (79-600)	521
HPV 58 E6R4	5'- AAT GTG TCT CCA TAT AGC G -3'	19	372 al 354	E6F1/E6R4 (79-372)	293
HPV 58 E6F5	5'- AAA GTG TGC TTA CGA TTG C -3'	19	299 al 317	E6F5/E7R1 (299-600)	301

De igual forma se desarrollaron tres PCRs para la amplificación del ORF E7 de VPH 58, la primera con los iniciadores reportados en la literatura E7P1 y E7P2 que amplifican la longitud completa del ORF del ORF E7 (335pb), una segunda PCR con los iniciadores E7P1 y E7R10 que amplifican un fragmento de 222pb que corresponde a la primera mitad del ORF y la tercera con los iniciadores E7F10 y E7P2 que amplifica un fragmento de 216pb, correspondientes a la segunda mitad del ORF. Las secuencias de estos iniciadores se muestran en la **Tabla No 5.** Las PCRs para E6 E6F1/E6R4, E6F5/E7R1 y las PCRs para E7 con los iniciadores E7P1/E7R10 y

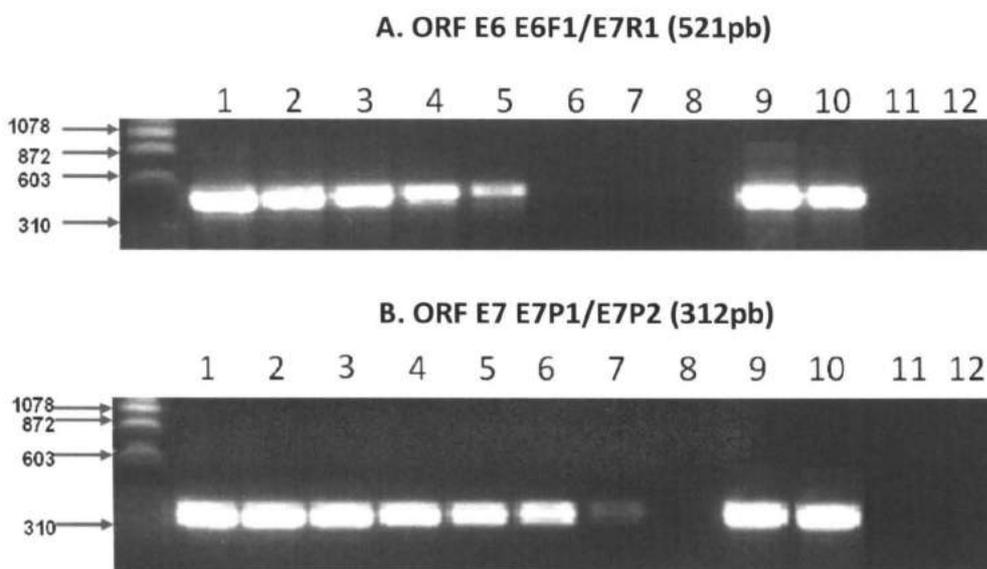
E7F10 y E7P2 se desarrollaron con el fin de evaluar las muestras que obtuvieron un resultado negativo para la PCR E6F1/E7R1 para E6 y la PCR E7P1/E7P2 para E7.

Tabla No 5. Iniciadores ORF E7 VPH 58.

NOMBRE	SECUENCIA	LONGITUD	UBICACIÓN	COMBINACION	AMPLIFICADO
HPV58 E7P1	5'- CTGTAACAACGCCATGAGAG -3'	20	561 al 580	E7P1/E7P2 (561-896)	335
HPV58 E7R10	5'- GAT ACA CAA ACG AAC CGT -3'	18	783 AL 766	E7R10/E7P1 (783-561)	222
HPV 58 E7F10	5'- AAA TAG GCT TGG ACG GG -3'	17	680 AL 696	E7F10/E7P2 (680-896)	216

Los ensayos de sensibilidad de las diferentes PCRs mostraron que para el ORF E6 usando los diferentes set de iniciadores, el nivel de sensibilidad fue de 1pg/μl. La figura 5. A muestra el nivel de sensibilidad de 1pg usando los iniciadores E6F1/E7R1. Para el ORF E7 el nivel de sensibilidad de las diferentes PCRs fue de 10 fg/μl. La figura 5. B muestra el resultado usando los iniciadores (E7P1/E7P2). Estos resultados fueron replicados en diversos ensayos para garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Figura No 5. Diluciones seriadas PCR E6 y E7 VPH 58.

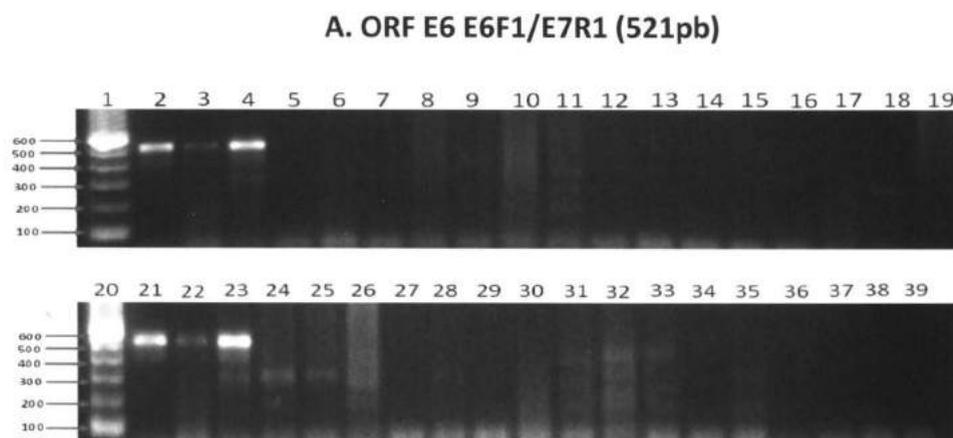


La numeración de la izquierda representa el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular Φ x174ADN/Hae II (Promega), los carriles del 1 al 8 (A y B) representa diluciones seriadas del Clon del ORF E6 y el ORF E7 de VPH 58, las diluciones son 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1pg/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl y 1 fg/μl respectivamente, 9 y 10 (A y B) son controles de muestras positivas para VPH 58, 11 y 12 (A y B)

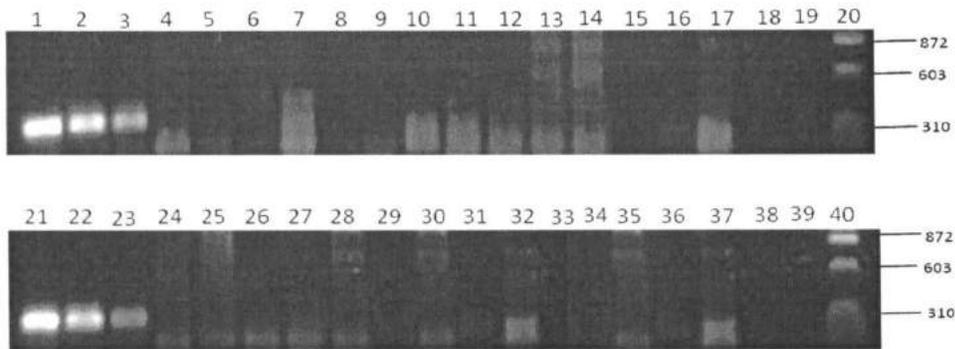
corresponden a los controles negativos donde se utilizó mezcla de PCR sola y mezcla de PCR con agua en lugar de ADN respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

La especificidad de las PCRs se evaluó mediante ensayos en los cuales se utilizaron como controles positivos muestras positivas para VPH58 y como controles negativos la mezcla de PCR sin ADN y mezcla de PCR con agua en lugar de ADN. Como muestras se utilizaron ADN humano (obtenido a partir de células sanguíneas), ADN de la bacteria *H. pylori*, ADN de *C. trachomatis* y ADN de 16 tipos de VPHs diferentes al VPH 58, de muestras recolectadas y pertenecientes a la cohorte en las cuales la detección y tipificación de los diferentes VPHs, había sido previamente establecida (VPH 59, 42, 40, 11, 6, 26, CP-8061, 16, 33, 18, 35, 39, 45, 51, 52 y 66. El resultado de este ensayo mostró que hubo amplificación en las muestras positivas para VPH 58, no se observó amplificación para los otros tipos de VPH, ni del ADN humano, *H. pylori* y *C. trachomatis*, lo que sugiere que las PCR desarrolladas presentan una alta especificidad para la amplificación de los ORF E6 y E7 de VPH 58. En la figura No 6. A se muestra un ejemplo para el ORF E6 mediante el uso de los iniciadores E6F1/E7R1 y la figura No 6. B muestra el ejemplo para el ORF E7 utilizando los iniciadores E7P1/E7P2 .

Figura No 6. Prueba de especificidad para las iniciadores de los ORF E6 y E7 de VPH 58.



B. ORF E7 E7P1/E7P2 (312pb)



A. La numeración de la izquierda representa el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular utilizado 100 bp ADN Ladder (Invitrogen), los carriles 1 y 20 son del marcador de peso molecular, los carriles 2, 3, 4, 21, 22, 23 representan diferentes muestras positivas para VPH 58, los carriles 18, 19, 38 y 39 corresponden a los controles negativos de mezcla de PCR sola y mezcla de PCR con agua en lugar de ADN, los carriles 15 al 17 y 35 al 37 corresponden a ADN humano, ADN de *H. pylori* y ADN de *C. trachomatis* respectivamente, los carriles del 5 al 14 corresponde a VPH 59, 42, 40, 11 (2 muestras), 6 (2 muestras), 26, CP-8061(2 muestras) respectivamente y los carriles del 24 al 34 corresponden a VPH 16, 33 (2 muestras), 18, 35, 39, 45, 51, 52 y 66 respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

B. La numeración de la derecha representa el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular utilizado Φ x174ADN/Hae II (Promega), los carriles 20 y 40 son del marcador de peso molecular, los carriles 1, 2, 3, 21, 22 Y 23 son diferentes muestras positivas para VPH 58, los carriles 18, 19, 38 y 39 corresponden a los controles negativos de mezcla de PCR sola y mezcla de PCR con agua en lugar de ADN, los carriles 15 al 17 y 35 al 37 corresponden a ADN humano, ADN de *H. pylori* y ADN de *C. trachomatis* respectivamente, los carriles del 4 al 14 corresponde a VPH 59 (2 muestras), 42, 40, 11 (2 muestras), 6 (2 muestras), 26, CP-8061(2 muestras) respectivamente y los carriles del 24 al 34 corresponden a VPH 16, 33 (2 muestras), 18, 35, 39, 45, 51, 52 y 66 respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

4.3. DETECCIÓN DE VARIANTES MOLECULARES DEL ORF E6 y ORF E7 DEL VPH 58

4.3.1 Secuencia automática de las muestras pertenecientes a la línea de Base de la Cohorte de Bogota positivas para VPH 58.

Anterior al desarrollo de la técnica de RLB y debido a que se carecían de secuencias caracterizadas de VPH 58 previamente identificadas en la población colombiana, se utilizaron 34 muestras positivas para VPH 58 pertenecientes a la línea de base de la cohorte, que corresponde al 1,8% de las 1845 mujeres pertenecientes a la línea de base. Se obtuvieron las secuencias completas de los ORF E6 y E7 mediante la utilización de los iniciadores E6F1, E6R4, E6F5, E7R1, E7P1, E7R10, E7F10 Y E7P2. Para el ORF E6, los iniciadores E6F1/E7R1 amplifican

todo el ORF y los iniciadores E6F1/E6R4 y E6F5/E7R1 amplifican la primera y segunda mitad del ORF y para el ORF E7, los iniciadores E7P1/E7P2 amplifican todo el ORF y los iniciadores E7P1/E7R10 y E7F10/E7P2 amplifican la primera y segunda mitad del ORF respectivamente. Estos iniciadores vienen marcados con cyanina (Cy 5.5) en el extremo 5' lo que permite obtener las secuencias de la cadena sentido y la cadena antisentido de cada una de las muestras.

Se estableció como una variante la suma de las mutaciones a lo largo de las regiones de E6 y E7. De las 34 muestras se logró la obtención de secuencias en 27 muestras de ambos ORFs que corresponden al 79,4%, de 3 muestras solo se obtuvo información de uno de los ORF (8.8%), estas se clasificaron como variantes no informativas y de 4 muestras no hubo amplificación de ninguno de los ORF (11.8%). En total se encontraron 5 variantes diferentes, 3 de las cuales habían sido reportadas previamente en la literatura en poblaciones Asiáticas y dos variantes de las cuales no existen reportes hasta la fecha. La frecuencia específica de cada una se distribuyó de la siguiente forma, T307/A694/G744/A761 61,7% (21 de 34), T307/T632/G744/A760 8,8% (3 de 34), T307/G744 2,9% (1 de 34), A169/T307/A599/A694/G744/A761 2,9% (1 de 34), T307/A694/G744/A761/G763 2,9% (1 de 34). No Amplifican y no informativas 20,5% (7 de 34). Ninguna de las muestras presentó la secuencia del VPH 58 de referencia. En la Tabla No 6 se recogen estos resultados, en la **figura No 7** se presentan los electroforogramas de los cambios de nucleótidos encontrados en las secuencias.

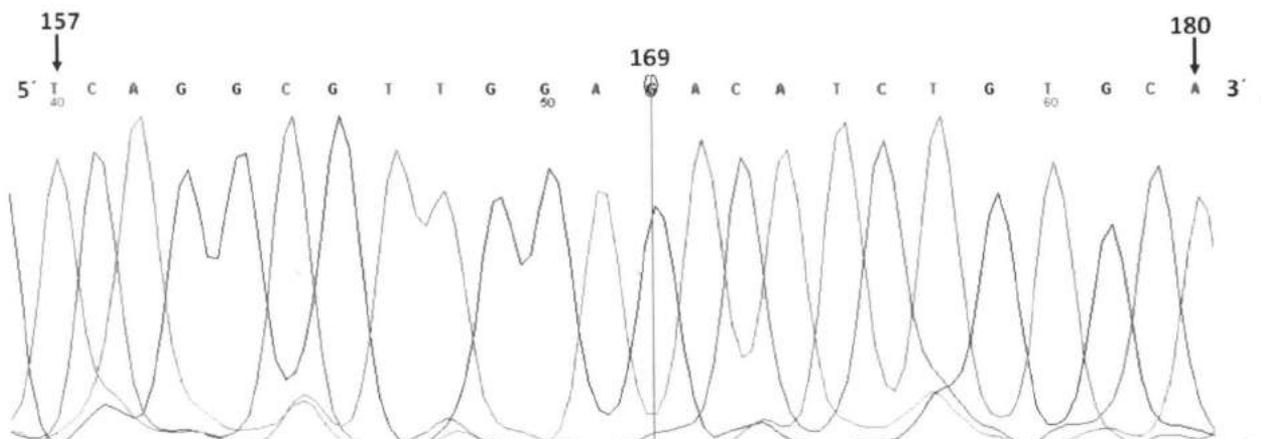
Tabla No 6. Variantes de los ORF E6 y E7 de VPH 58 de la línea de base obtenidas por el método de secuencia automática.

MUESTRAS	E6	E7	CAMBIO DE A.A		VARIANTE	REFERENCIA
			E6	E7		
n= 34	HPV 58R	G C G A C C G A T A	G C T G T T T G G A A C C T C T G			
21	- - - - t - - - - -	- - - - A - g - - - A - - - - - - - -		G41R / G63D	T307 / A694 / G744 / A761	Chan et al. 2002
3	- - - - t - - - - -	- T - - - g - A - - - - - - - - - -		T20I / G63S	T307 / T632 / G744 / A760	Chan et al. 2002, Wu et al. 2009
1	- - - - t - - - - -	- - - - g - - - - - - - - - - - - - -			T307 / G744	Chan et al. 2002
1	a - - - - t - - - - -	A - - - A - g - - - A - - - - - - - -		R9K / G41R / G63D	A169 / T307 / A599 / A694 / G744 / A761	No Reportada
1	- - - - t - - - - -	- - - - A - g - - - A G - - - - - - - -		G41R / G63D / T64A	T307 / A694 / G744 / A761 / G763	No Reportada
4	N.A	- - - A - g - - - A - - - - - - - - - -		G41R / G63D		
3	N.A	N.A				

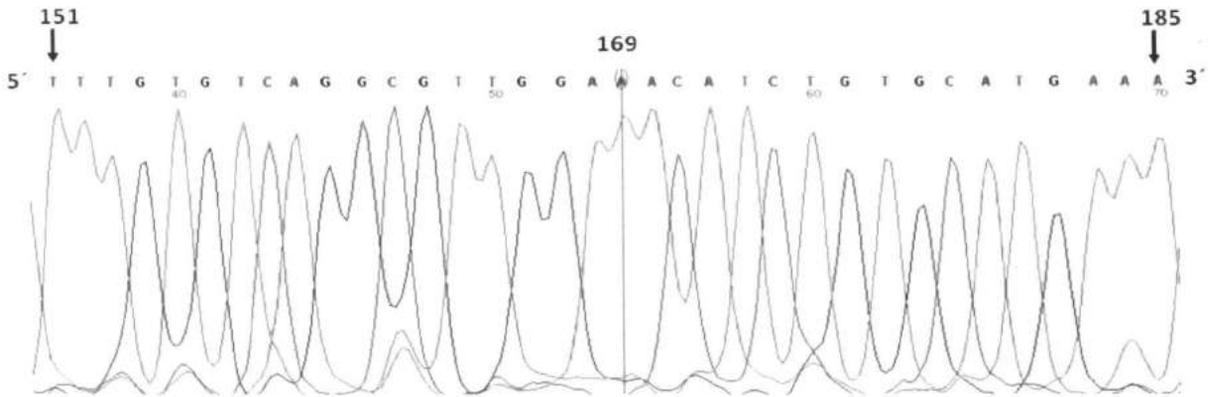
Tabla No 6. Variantes moleculares de los ORF E6/E7 de VPH 58 encontradas mediante la técnica de secuencia en la línea de base. Se incluye las diferentes posiciones donde se han reportado cambios de nucleótidos de estos ORFs. HPV 58R: secuencia referencia, las letras en minúscula nos indican cambio de nucleótido que no llevan a cambio de aminoácido, las letras en mayúscula son cambios de nucleótidos que llevan a cambio de aminoácidos. En los cambios de aminoácidos la primera letra indica el aminoácido de VPH 58R, la segunda letra indica el aminoácido del cambio, en la columna referencia se incluyen los reportes donde se han reportado las secuencias encontradas, N/A (no amplifica).

Figura No 7. Electroforogramas de las mutaciones detectadas en la Línea de Base

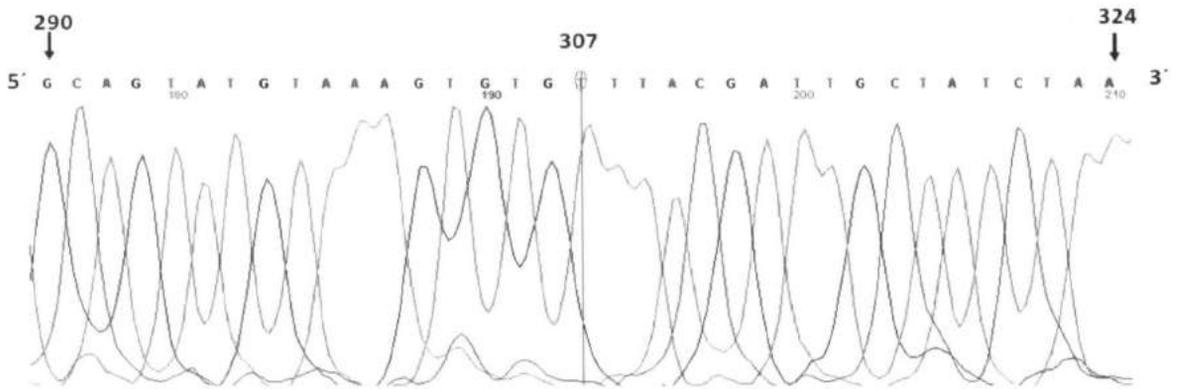
A. G169 Secuencia iniciador sentido



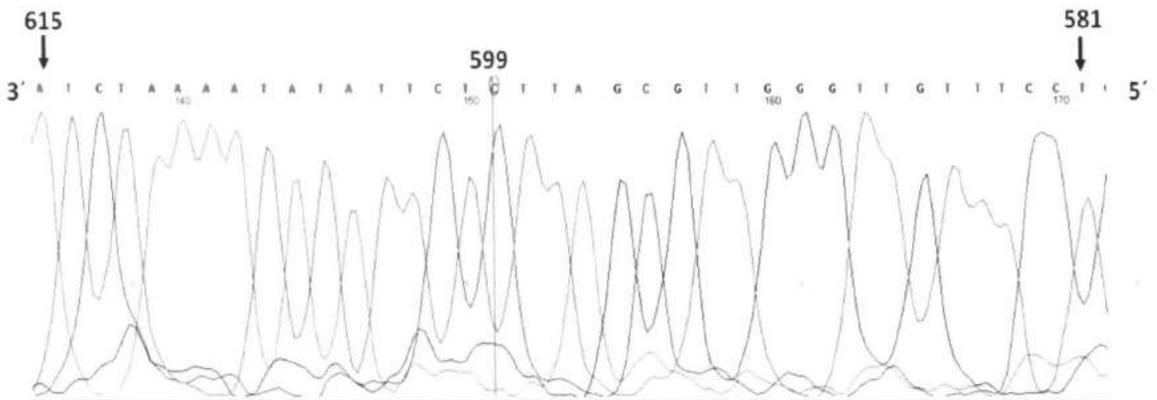
B. A169 Secuencia iniciador sentido



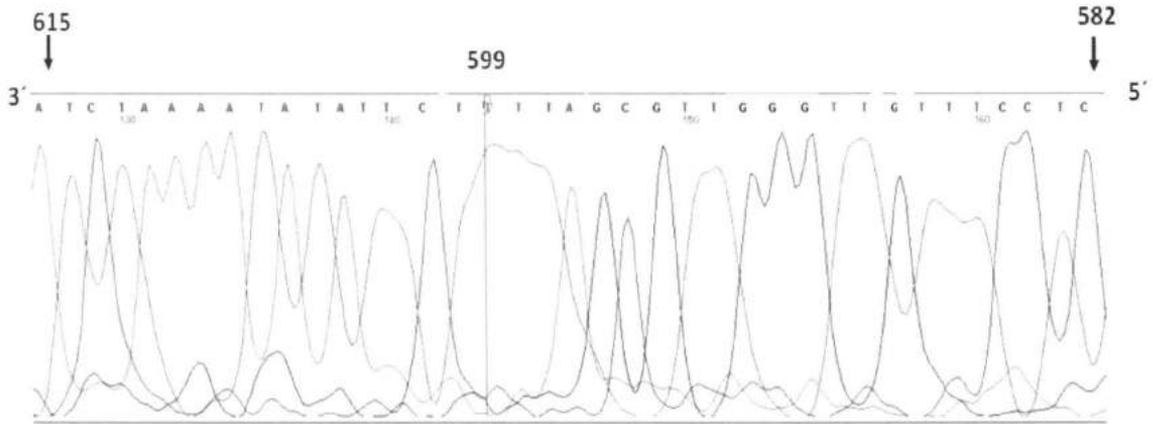
C. T307 Secuencia iniciador sentido



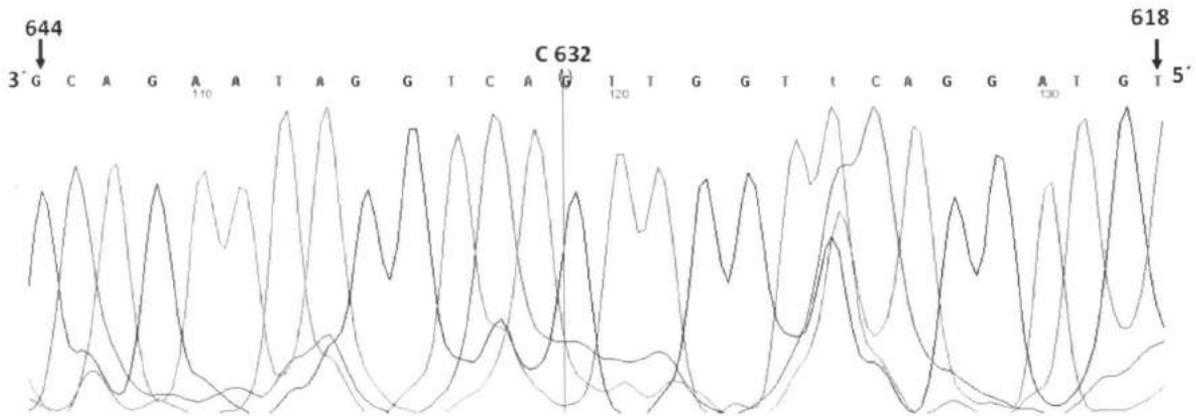
D. G599 secuencia iniciador antisentido



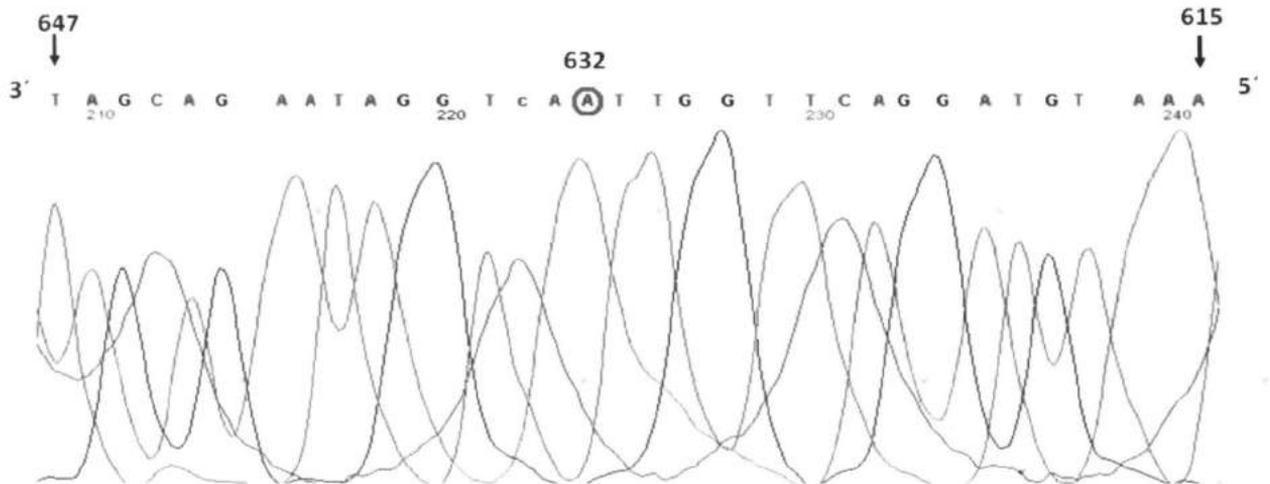
E. A599 secuencia iniciador antisentido



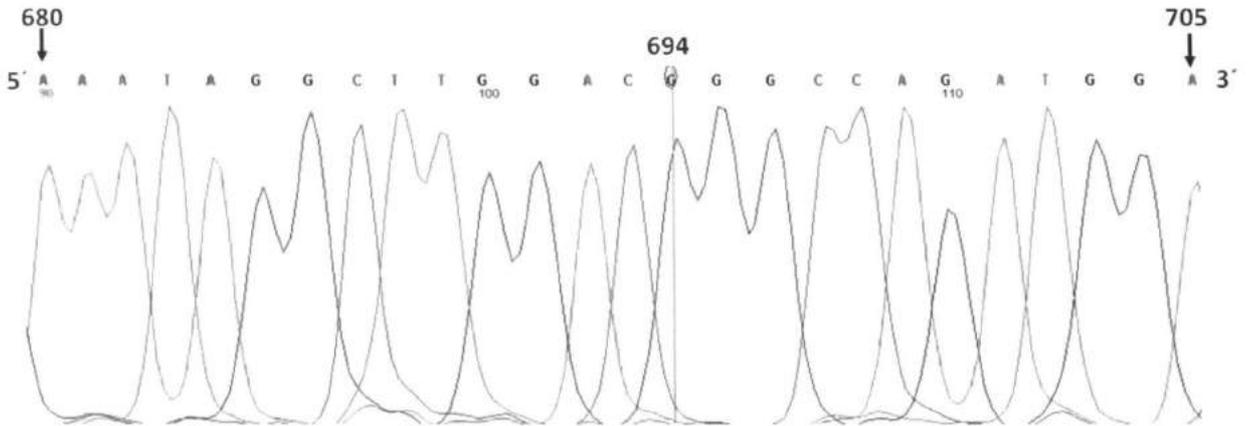
F. C632 secuencia iniciador antisentido



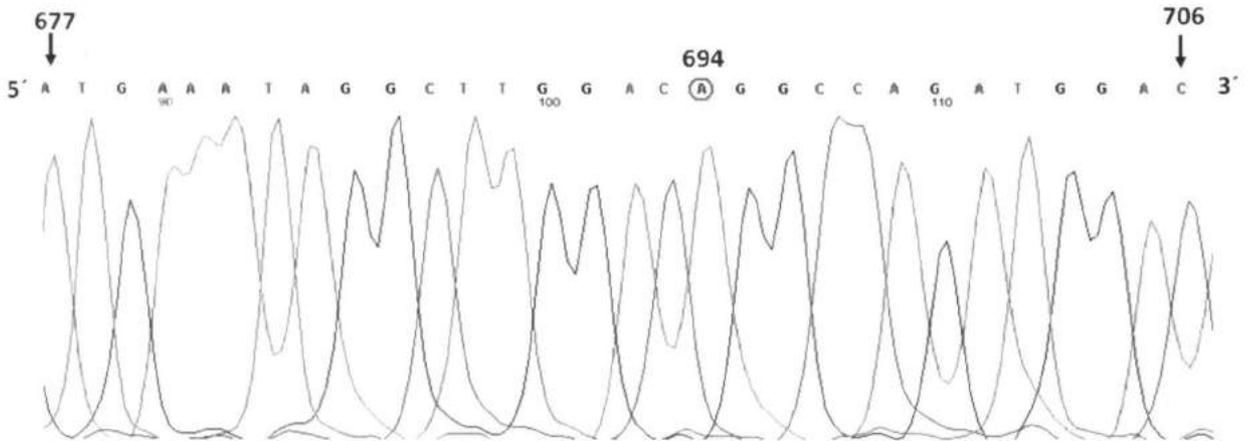
G. T632 secuencia iniciador antisentido



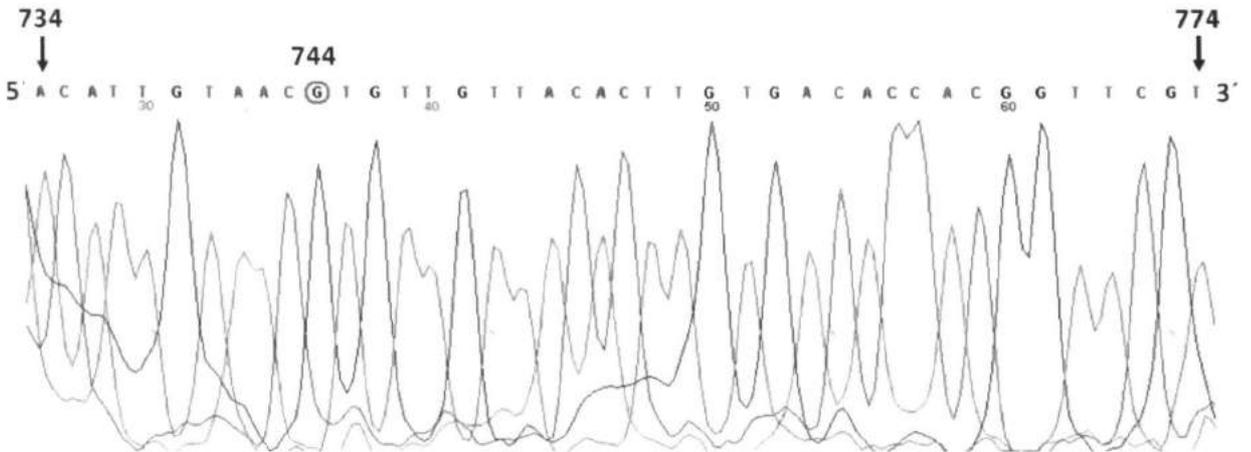
H. G694 Secuencia iniciador sentido



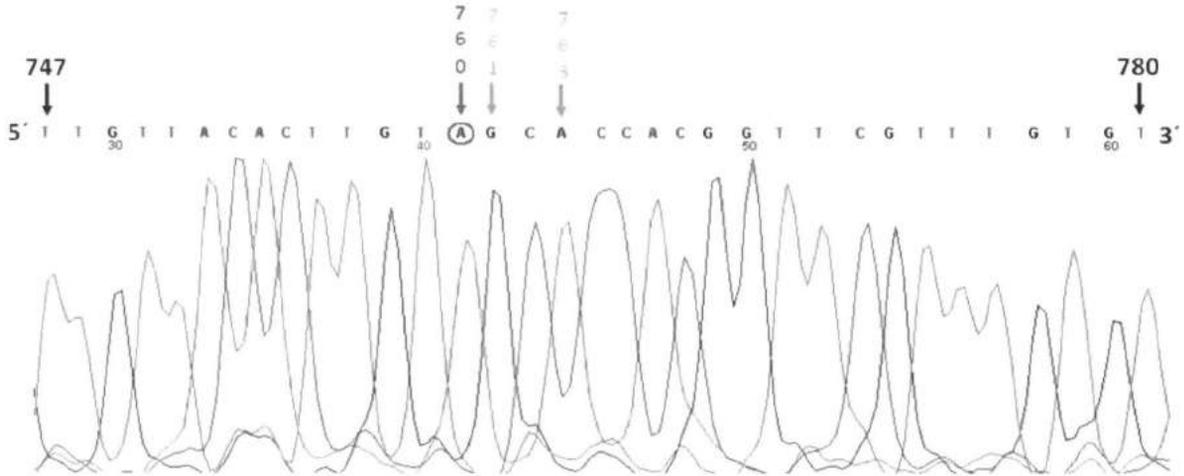
I. A694 Secuencia iniciador sentido



J. G744 Secuencia iniciador sentido



K. A760, G761, A763 Secuencia iniciador sentido



L. G760, A761, G763 Secuencia iniciador sentido

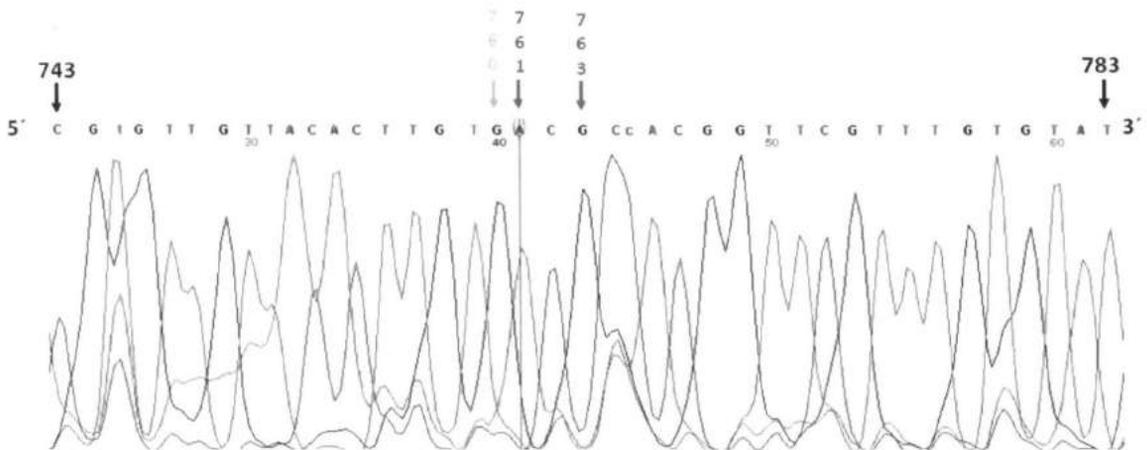


Figura No 7. Los electroforogramas A; G169, D; G599, F; C632, y H; G694 presentan los nucleótidos de VPH 58 referencia para esas posiciones. Los electroforogramas B; A169, C; T307, E; A599, G; T632, I; A694 y J; G744 indican el cambio de nucleótido en esas posiciones, la línea o el círculo resaltan la posición del nucleótido que se quiere mostrar. En los electroforogramas K y L se señalan con las flechas y números de azul claro las posiciones de referencia y con las flechas y números rojos los cambios de nucleótidos en esas posiciones.

4.3.2 Desarrollo de la técnica de Reverse Line Blot.

En el desarrolló de la técnica de RLB se diseñaron un total de 38 sondas las cuales en su extremo 5' tienen adicionado un grupo amino el cual se utiliza para realizar el acople de la sonda a la membrana. Las sondas fueron sintetizadas por IDT (Integrated DNA Technologies). Fueron diseñadas de acuerdo a la secuencia del ORF E6 y E7 de VPH 58 referencia, así como de

las variantes que se han reportado en la literatura a la fecha y a las encontradas con la técnica de secuencia automática en la línea de base, correspondientes a variantes no reportadas en la literatura. La totalidad de las sondas se diseñaron en el laboratorio mediante la utilización del software GeneRunner 3.05, la secuencia de las sondas diseñadas fueron corroboradas y comparadas mediante la utilización de la base de datos Blast (nucleotide-nucleotide) con el GeneBank.

De las sondas diseñadas 14 hibridan en el ORF E6, 7 de las cuales son dirigidas para regiones específicas que no presentan mutaciones (sondas referencia) y 7 para estas mismas regiones pero que incluyen una o varias mutaciones. Para el ORF E7 se desarrollaron 24 sondas, 9 sondas de referencia y 15 sondas de mutaciones específicas, en estas se incluyen las sondas para las mutaciones A169 y G763 que no habían sido reportadas hasta la fecha. En la **Tabla 7** se muestra la información de las sondas desarrolladas para ambos ORFs, la nomenclatura utilizada y la región con la que hibrida. Se destaca en color rojo las sondas dirigidas contra mutaciones indicando en color rojo el cambio de nucleótido, de igual forma para estas regiones se observan sondas de referencia (indicadas en negro) dentro de la sonda se identifica con cursiva y negrita en color azul la posición referencia del nucleótido comparado con el de la variante. En algunos casos una sola sonda de referencia sirve para identificar diferentes tipos mutaciones (si aquellas se encuentran en una sola región o si son varios cambios de una misma posición). La longitud promedio de las sondas fue de 16.9pb con un rango entre 15pb a 19pb, con una moda de 16pb para las de referencia y de 17pb para las de las variantes, el TM promedio fue de 46°C con un rango entre 39,6°C y 51,4°C con una moda de 44,5°C para las sondas de variantes, las sondas de referencia no presentaron moda.

Para el desarrollo del RLB se utilizaron los mismos iniciadores desarrollados para la amplificación de los ORF E6 y E7, para el ORF E6 los iniciadores E6F1, E6R4, E6F5, E7R1 (E6F1/E7R1 amplifican todo el ORF y los iniciadores E6F1/E6R4 y E6F5/E7R1 amplifican la primera y segunda mitad del ORF respectivamente) y de los iniciadores E7P1, E7R10, E7F10 y E7P2 para el ORF E7 (E7P1/E7P2 amplifican todo el ORF y los iniciadores E7P1/E7R10 y E7F10/E7P2 amplifican la primera y segunda mitad del ORF respectivamente). Para este

ensayo los iniciadores antisentido poseen una modificación mediante un marcaje con Biotina en su extremo 5'.

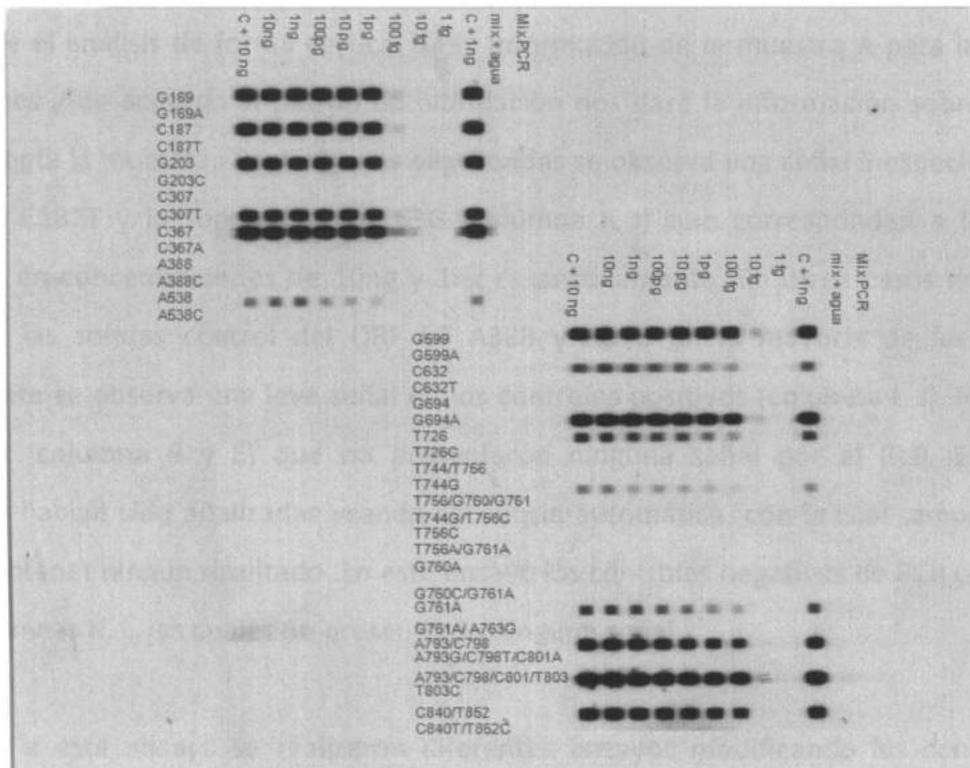
Tabla No 7. Oligosondas desarrolladas para el ensayo de Reverse Line Blot para la detección e identificación de variantes de los ORF E6 y E7 de VPH 58.

SONDA	SECUENCIA	LOCALIZACION	LONGITUD	TM
G169	5'- GTT GGA GAC ATCTGT G -3'	163nt - 178nt	16	46,4
G169A	GTT GGA AAC ATCTGT G	163nt - 178nt	16	44,5
C187	5'- TGA AAT CGA ATT GAA ATG -3'	181nt - 198nt	18	42,7
C187T	5'- CAT GAA ATT GAA TTG AAA -3'	179nt - 176nt	18	40,4
G203	5'- CGT TGA ATG CAA AAA GA -3'	199nt - 215nt	17	45,4
G203C	5'- GTT CAA TGC AAA AAG ACT -3'	200nt - 217nt	18	45
C307	5'- TAA AGT GTG CTT ACG AT -3'	298nt - 314nt	17	44,8
C307T	5'- AGT GTG TTT ACG ATT G -3'	301nt - 316nt	16	43
C367	5'- CTA TAT GGA GAC ACA TTA G -3'	356nt - 374nt	19	43,7
C367A	5'- TAT ATG GAG AAA CAT TAG -3'	357nt - 374nt	18	39,6
A388	5'- AGA ACA AAC ACT AAA AAA -3'	373nt - nt390nt	18	41,4
A388C	5'- AAC AAGTGT TAAATGAA -3'	386nt - 403nt	18	41,4
A538	5'- CGA CGT AGA CAA ACA -3'	536nt - 550nt	15	44,9
A538C	5'- GCC GTA GAC AAA CAC AA -3'	537nt - 553nt	17	49,8
G599	5'- AAC GCT AAG AGA ATA TAT -3'	591nt - 608nt	18	41,6
G599A	5'- AACGCTAAA AGAATATATT -3'	591nt - 609nt	19	41,2
O632	5'- AAC CAA CTG ACCTAT T -3'	626nt - 641nt	16	43,6
O632T	5'- TGA ACC AAT TGA CCT AT -3'	624nt - 640nt	17	44,5
G694	5'- AAT AGG CTT GGA CG G G -3'	681nt - 696nt	16	51,3
G694A	5'- ATA GGCTTG GAC A GG C -3'	682nt - 697nt	16	51,4
T726	5'- ACA GCT AAT TAC TAC ATT -3'	721nt - 738nt	18	42
T726C	5'- ACA GCC AAT TAC TAC AT -3'	721nt - 735nt	17	44,5
T744-T756	5'- AAC TTG TTG TTA CAC TTG -3'	741nt - 758nt	18	45
T744G	5'- TAC ATT GTA ACG TGT TG -3'	733nt - 749nt	17	43,8
T756C	5'- TTG TTG TTA CAC CTG TG -3'	744nt - 760nt	18	46,7
T756/G760/G761	5'- TTA CAC TTG TGG CAC C -3'	750nt - 765nt	16	49
T744G/T756C	5'- AC GTG TTG TTA CAC CTG -3'	742nt - 758nt	17	49,5
T756A/G761A	5'- TA CAC CTG TGA CAC CA -3'	751nt - 766nt	16	49,5
G760A	5'- TTA CAC TTG TAG CAC CA -3'	750nt - 766nt	17	47,5
G760C/G761A	5'- TAC ACT TGT CAC ACC -3'	751nt - 765nt	15	44,4
G761A	5'- TTA CAC TTG TGA CAC CA -3'	750nt - 766nt	17	47,7
G761A/ A763G	5'- TTA CAC TTG TGA CG C CA -3'	750nt - 766nt	17	51,2
A793/C798	5'- AAC AGT ACA ACA ACC GA -3'	784nt - 800nt	17	48,1
A793/C798/C801/T803	5'- CAA CAA CCG ACG TAC G -3'	791nt - 806nt	16	50,6
A793G/C798T/C801A	5'- TAC AG C AAC TGA A GT ACG -3'	789nt - 806nt	18	49
T803C	5'- GAC GCA CGA ACC CTA -3'	799nt - 813nt	15	51,2
C840/T852	5'- TAC CAT TGT GTG CCC TAG -3'	837nt - 854nt	18	51,4
C840T/T852C	5'- ACT ATT GTG TGC CCC A -3'	838nt - 853nt	16	50,4

Tabla No 7. El nombre de la sonda indica el nucleótido o nucleótidos para el cual fue diseñada la sonda, las sondas referencias se indican en negro y la posición del nucleótido dentro de la sonda se resalta en cursiva negrilla en color azul, las sondas de mutaciones se indican en rojo y la posición de la mutación o mutaciones se indican en negrilla cursiva y en color rojo, se indica el ORF al que pertenece cada sonda, la localización dentro del gen, su longitud y el Tm de cada sonda.

Los ensayos de sensibilidad de las PCRs utilizando los diferentes iniciadores biotinados mostraron que para el ORF E6 fue de 1pg/μL en gel de agarosa y para el ORF E7 fue de 100fg/μL en gel de agarosa (Datos no mostrados). Cuando se utilizaron estos iniciadores en el ensayo de RLB se obtuvo una sensibilidad 10 veces mayor para las diferentes PCRs de ambos ORFs comparada con la sensibilidad en gel. Utilizando los iniciadores hacia el ORF E6 el nivel de sensibilidad fue de 100fg/μL y para el ORF E7 fue de 10fg/μL (con las condiciones finales de la concentración de las sondas descritas posteriormente) **Figura No 8**. Las demás condiciones del ensayo de RLB (tiempos de hibridación, temperaturas de hibridación y lavados) se mantuvieron de forma similar a lo descrito en la metodología. Se determinó que el tiempo de exposición de la placa de autoradiografía fuera de 30 minutos lo que permite una buena detección de las señales sin que exista una sobre exposición y la aparición de señales inespecíficos.

Figura No 8. Ensayo de sensibilidad en RLB iniciadores de los ORF E6 y E7 de VPH 58



A la izquierda las sondas utilizadas para el reverse line blot, en la parte superior la concentración de las diluciones. El grupo de sondas en la parte superior de la figura corresponde a la región de E6 y las que se encuentran en la parte inferior a la región de E7.

La interpretación de la técnica de RLB tiene como principio la aparición de señales en el hyperfilm que son productos de la hibridación del producto de PCR marcado con biotina y las sondas unidas a la membrana. Durante el proceso de estandarización se realizaron varios ensayos para mejorar la sensibilidad de la técnica, para esto se acoplaron a la membrana diferentes concentraciones de sondas. Dependiendo de la intensidad de la señal entre las sondas y las muestras en la membrana durante el revelado, se estandarizaron las concentraciones ideales a las cuales debían ser usadas las diferentes sondas. Inicialmente se inició con una concentración inicial para todas las sondas de 200pmol. En la **figura No 9** se observa el primer ensayo de estandarización del RLB donde podemos ver en las filas las diferentes sondas (sondas referentes y con mutación) y en las columnas (A;B;C etc diferentes muestras analizadas y controles). En el primer carril de las oligosondas de E6, se observa como la muestra A hibrida para la sonda de referencia (G169) y no hibrida para la sonda de mutación (G169A).

Es así que el análisis de forma vertical da la información de la muestra A para las diferentes mutaciones y de acuerdo al patrón de hibridación nos dará la información sobre la variante que presenta la muestra. Para algunas oligosondas se observa una señal inespecífica como en la sonda C187T y la sonda G761/A763G (columna I, J) que corresponden a los controles positivos en concentraciones de 10ng y 1ng respectivamente. En otros casos no se observa señal de las sondas control del ORF E6 A388 y A538 en la mayoría de las muestras y únicamente se observa una leve señal en los controles positivos (columna I, J). Hubo algunas muestras (columna B y E) que no presentaron ninguna señal por el RLB. Estas mismas muestras habían sido analizadas usando secuencia automática con la cual tampoco se había podido obtener ningún resultado. En este ensayo los controles negativos de PCR corresponden a las columnas K, L, las cuales no presentaron ninguna señal.

Posterior a este ensayo se realizaron diferentes ensayos modificando las concentraciones finales de las sondas, con el fin de mejorar las señales de hibridación entre las sondas y los productos de PCR, para evitar la formación de señales inespecíficas y procurando mejorar las

señales débiles de ciertas sondas como las de las mutaciones G196A y T744G. En la **tabla No 8** se describe las concentraciones a las cuales las sondas fueron finalmente utilizadas (las concentraciones de las sondas oscilaron entre 100 pmol y 600 pmol). La **figura No 10** muestra un ejemplo de un ensayo con las condiciones óptimas de estandarización.

Figura No 9. Ensayo de estandarización de la técnica de RLB utilizando los productos de E6F1/E7R1 Biot para el ORF E6 y los productos de E7P1/E7P2 Biot para el ORF E7



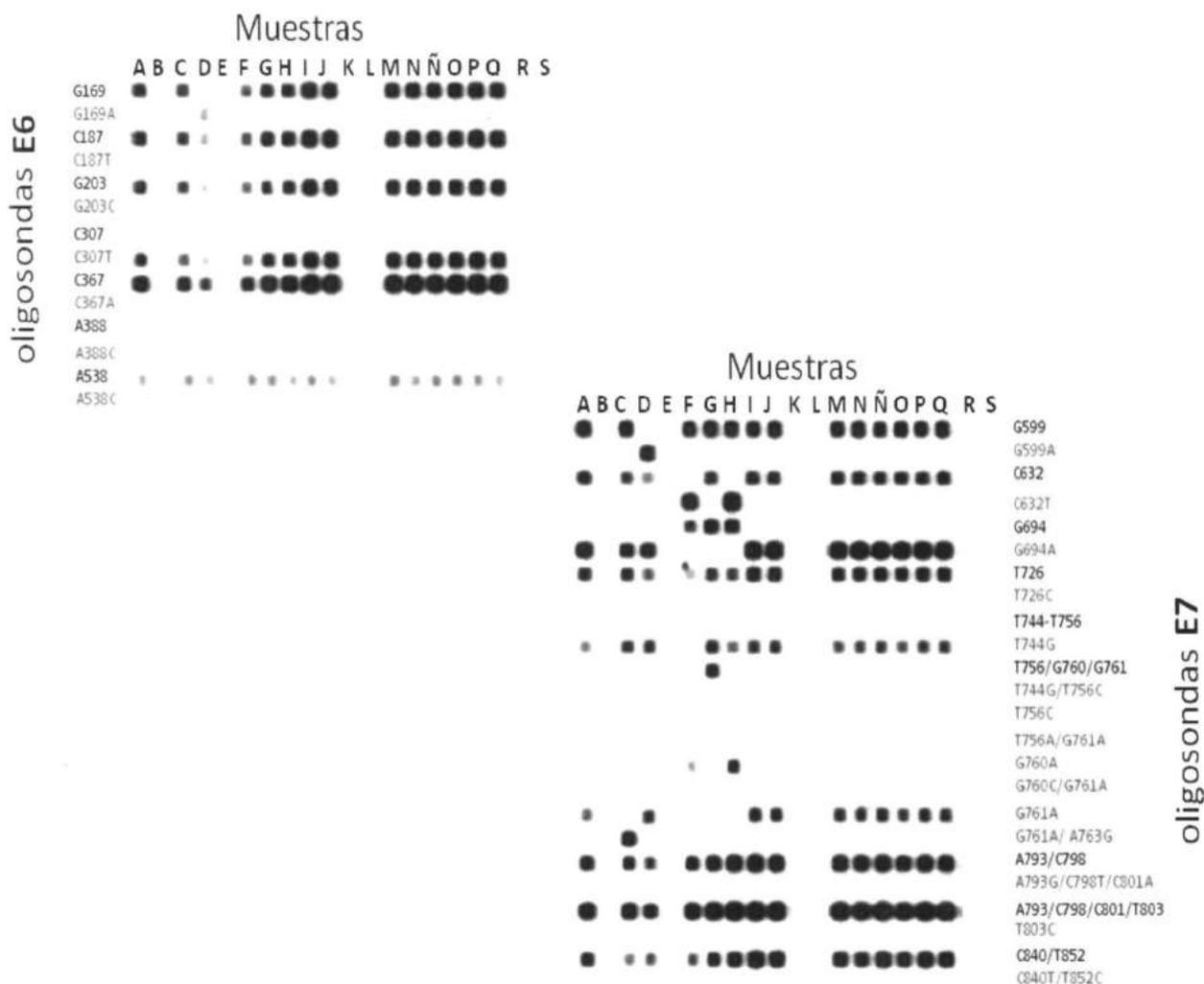
Las sondas de referencia se indican en negro (hibridan con la secuencia sin mutación) y las sondas de variantes se destacan en rojo (hibridan con secuencias que presentan la mutación indicada) las letras en la parte superior identifican la muestra es decir la muestra A hibridada en E6 corresponde a la misma muestra A que hibridada en E7 con el producto de PCR correspondiente a cada ORF. A, B, C, D, E, F, G, H muestras positivas VPH 58; I, J controles positivos VPH 58 en concentraciones de 10ng y 1 ng respectivamente; K, L controles negativos Mix PCR sin ADN y Mix PCR reemplazando muestra por agua respectivamente. Tiempo de exposición de auto radiografía 30 minutos.

Tabla No 8. Concentraciones finales de las sondas utilizadas en el ensayo de RLB.

SONDAS	concentracion final pmol
G169	200
G169A	200
C187	200
C187T	150
G203	250
G203C	200
C307	200
C307T	300
C367	200
C367A	200
A388	100
A388C	200
A538	600
A538C	100
G599	200
G599A	250
C632	600
C632T	200
G694	150
G694A	200
T726	500
T726C	200
T744/T756	200
T744G	600
T756/G760/G761	400
T744G/T756C	200
T756C	200
T756A/G761A	200
G760A	500
G760C/G761A	200
G761A	500
G761A/ A763G	150
A793/C798	200
A793G/C798T/C801A	200
A793/C798/C801/T803	200
T803C	200
C840/T852	350
C840T/T852C	200

Tabla No 8. Las sondas de referencia se indican en color negro y las sondas de variantes se indican con color rojo, las concentraciones finales de cada sonda se expresa en pmol.

Figura No 10. Ensayo de RLB con las condiciones finales de la estandarización para ambos ORF E6 y E7 de VPH 58 utilizando los productos de E6F1/E7P1 Biot y E1P7/E7P2Biot



CARRIL	VARIANTE
A:	T307/A694/G744/A761
B, E:	No Amplifican
C:	T307/A694/G744/A761/G763
D:	A169/T307/A599/A694/G744/A761
F, H:	T307/T632/G744/A760
G:	T307/G744
I, J, M, N, Ñ, O, P, Q:	Controles positivos
K, L, R, S:	T307/A694/G744/A761
	Controles negativos

Las sondas de referencia se indican en negro (las que hibridan con la secuencia sin mutación) y las sondas de variantes se destacan en rojo (secuencias que hibridan con secuencias que presentan la mutación indicada) las letras indicadas en la parte superior identifica la muestra es decir la muestra A hibridada en E6 corresponde a la misma muestra hibridada en E7 con el producto de PCR correspondiente a cada ORF. Tiempo de exposición de la auto radiografía 30 minutos. El descriptivo indica la variante identificada.

A pesar de las modificaciones realizadas no fue posible conseguir señal de la sonda de referencia A388 correspondiente al ORF E6 y debido a que las demás sondas de ambos ORF presentan señales de hibridación con las muestras en las mismas condiciones de hibridación, incubación y lavado se decidió omitir el dato de esta sonda.

Las muestras que obtuvieron un resultado negativo cuando se realizó el RLB con el producto de PCR E6F1/E7P1Biot para E6, se sometieron nuevamente a un segundo RLB pero utilizando los productos de las PCRs E6F1/E6R4Biot y E6F5/E7P1Biot. De igual forma para E7 cuando los resultados fueron negativos para el RLB con los productos de PCR E7P1/E7P2Biot se utilizaron los productos de las PCRs E7P1/E7R10Biot y E7F10/E7P2Biot. Las muestras en las que no se pudo obtener información de alguna de las PCR anidadas y en aquellas muestras en las que solo se pudo obtener información de uno de los ORF fueron clasificadas como variantes no informativas.

4.3.2.1 Resultados del Reverse Line Blot.

El resultado obtenido para las 34 muestras pertenecientes a la línea de base, mostró un total de 5 patrones de hibridación que corresponden a cinco variantes diferentes. Estas variantes son las mismas que las identificadas por el método de secuencia automática. De igual forma que en la secuencia automática, 7 muestras no presentaron amplificación en el RLB y no se pudo determinar las variantes de E6 y E7 de VPH 58 en estas muestras. La información de las variantes determinadas por la técnica de Reverse Line Blot se observa en la **tabla No 9**.

4.3.2.2 Comparación de los resultados por ambas técnicas

Al realizarse la comparación de los resultados obtenidos para las 34 muestras se pudo determinar un nivel de concordancia del 100% para el análisis a nivel de variante molecular, sin embargo en la técnica de Reverse Line Blot no se pudo establecer en 4 muestras cambios presentes en la región E7 que si habían sido detectados por la técnica de secuencia. Este resultado al tener en cuenta el criterio de variante molecular como la suma de los cambios

encontrados en ambos ORFs no afecta el índice de concordancia al no presentarse una reducción en el número de variantes detectadas por ambas técnicas.

Tabla No 9. Resultados de variantes moleculares del ORF E6 y E7 de VPH58 determinadas en la línea de base de la cohorte por la técnica de Reverse Line Blot.

MUESTRAS n= 34	HPV 58R	E6				E7												CAMBIO DE A.A	VARIANTE	REFERENCIA																
		G	C	A	C	G	A	T	A	G	C	T	T	T	G	G	A				A	C	C	T	T	G										
		1	1	2	2	3	3	3	3	4	5	5	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8					
		6	8	0	5	0	6	7	8	9	3	9	3	3	9	2	4	5	6	6	6	9	9	0	0	4	5	5	5	5	5	5				
		9	7	3	8	7	7	4	8	2	8	9	2	8	4	6	4	6	0	1	3	3	8	1	3	0	2	7								
		G	C	G	A	C	C	G	A	T	A	G	C	T	G	T	T	T	G	G	A	A	C	C	T	C	T	G						E6	E7	
21		-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	g	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G41R / G63D	T307 / A694 / G744 / A761	Chan et al. 2002	
3		-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	g	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T20I / G63S	T307 / T632 / G744 / A760	Chan et al. 2002, Wu et al. 2009	
1		-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		T307 / G744	Chan et al. 2002	
1		a	-	-	t	-	-	-	-	-	-	A	-	-	A	-	g	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R9K / G41R / G63D	A169 / T307 / A599 / A694 / G744 / A761	No Reportada
1		-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	g	-	-	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G41R / G63D / T64A	T307 / A694 / G744 / A761 / G763	No Reportada	
7																																				

Variantes moleculares de los ORF E6/E7 de VPH 58 encontradas mediante la técnica de RLB en la línea de base. Se incluye las diferentes posiciones donde se han reportado cambios de nucleótidos de estos ORF. HPV 58R: secuencia referencia, las letras en minúscula nos indican cambio de nucleótido que no llevan a cambio de aminoácido, las letras en mayúscula son cambios de nucleótidos que llevan a cambio de aminoácidos. En los cambios de aminoácidos la primera letra indican el aminoácido de VPH 58R, la segunda letra indica el aminoácido del cambio, en referencia incluyen los reportes donde se han reportado las secuencias encontradas, N/A (no amplifica).

Dado el alto nivel de concordancia entre las técnicas, se determinó realizar el análisis de variantes moleculares de los ORFs E6/E7 de VPH58 utilizando la técnica de Reverse Line Blot. Las muestras que presentaron patrones de hibridación atípicos se sometieron a secuencia automática de ambos ORF para determinar si se trataba de una nueva variante molecular.

4.4 VARIANTES MOLECULARES DE E6 Y E7 DE VPH 58 PRESENTES EN MUJERES CON CITOLOGÍA NORMAL PERTENECIENTES A LA COHORTE DE BOGOTA.

4.4.1 MUJERES CON INFECCIONES PREVALENTES CON VPH 58.

De las 1845 mujeres incluidas en el estudio que pertenecen a la línea de base, 34 mujeres (1,8%) presentaron resultado positivo para la detección por PCR para VPH 58, de estas 19

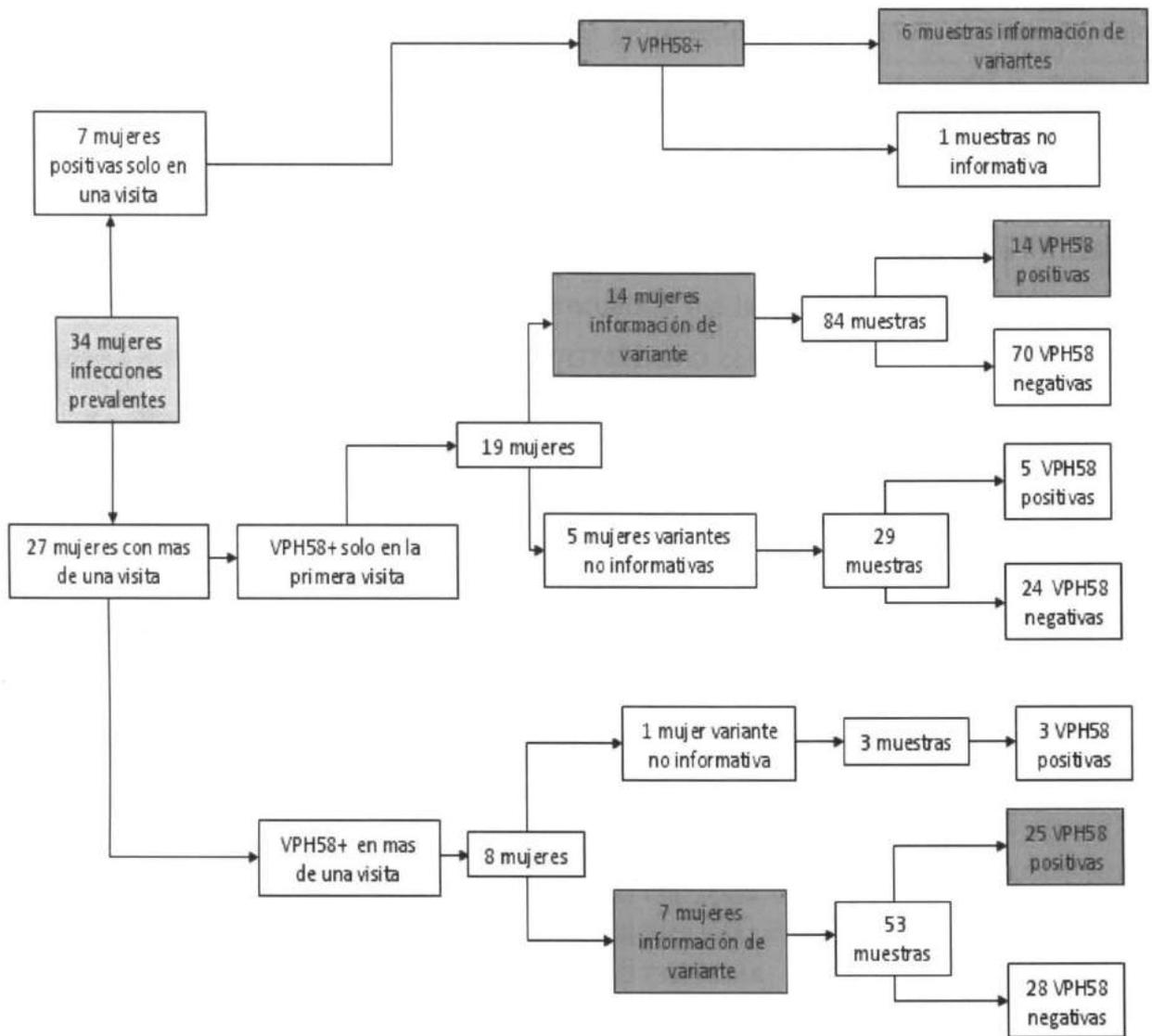
(56%) presentaron únicamente infección con VPH 58 mientras las restantes 15 (44%) presentaron infección con VPH 58 y otros tipos de VPH.

Hay que aclarar que la determinación de la infección por VPH como la identificación de las variantes en las muestras pertenecientes al seguimiento se desarrolló sin conocer la relación que existía entre las muestras y las mujeres a las que pertenecían. Al terminar la determinación de las variantes en las muestras, estos datos fueron anexados a la base de datos de la cohorte para la realización de los análisis de persistencia.

Este análisis permitió determinar que de 7(20,5%) de las 34 mujeres solo se tiene información de la primera visita, ya que posterior a esta visita no existe mas información ni muestras de estas mujeres. El analisis de variantes de estas 7 muestras mostró que en 6 muestras se pudieron detectar la presencia de variantes, de las 27 mujeres restantes se obtuvo información de la presencia de variantes en 21, las cuales fueron seguidas en un rango comprendido entre 1 y 7 años con un promedio de 6.8 visitas (rango entre 2 y 12 visitas). En las mujeres que solo presentaron una visita no se pudo determinar persistencia y eliminación de la infección al no poseerse mas datos.

De las 34 mujeres positivas para VPH 58 se obtuvo un total de 176 exfoliaciones cervicales, incluidas las pertenecientes a la línea de base, estas muestras fueron sometidas a la prueba de tipificación de VPH y se determinó que 54 muestras que corresponde al 30,68% (54 de 176) fueron positivas para VPH 58, de estas se pudo obtener información sobre variantes de ambos ORF en 45 de las 54 (83,3%) muestras, en las restantes 9 (16,6%) no se pudo determinar las variantes presentes debido a la no amplificación de alguno o ambos ORFs por lo que se consideraron no informativas. En la **figura No 11** se resume la información de las mujeres prevalentes.

Figura No 11 Descripción mujeres con infecciones prevalentes en la cohorte de Bogota.

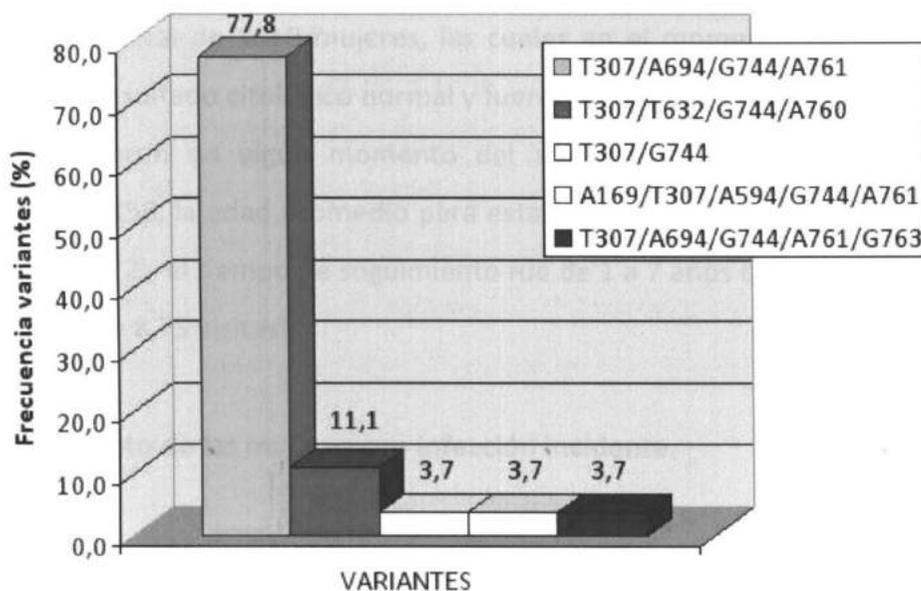


El cuadro en color azul palido indica el numero de mujeres con infecciones prevalentes para VPH58 con citologia normal pertenecientes a la cohorte de Bogota, se indican el numero de mujeres que tuvieron o no seguimiento, luego las mujeres con variantes informativas y no informativas en cada grupo y luego el número de muestras negativas y positivas por grupo. Las mujeres y muestras donde se obtuvo información sobre las variantes de E6/E7 de VPH58 se destacan en los cuadros de color turquesa.

4.4.1.1 Frecuencia de variantes en las mujeres con infecciones prevalentes en la línea de base

De las 34 mujeres con infecciones prevalentes pertenecientes a la línea de base se logró obtener información de variantes en 27 muestras del mismo número de mujeres. Todas las muestras presentaron infección únicamente con una variante, ninguna presentó infección múltiple ni tampoco se observó en ninguna la secuencia referencia del E6/E7 VPH58. Un total de 5 variantes diferentes se observaron en las muestras pertenecientes a la línea de base, la variante de VPH 58 que presentó la mayor frecuencia fue la T307/A694/G744/A761 con una frecuencia del 77,8% (21 de 27), T307/T632/G744/A760 con una frecuencia de 11,1% (3 de 27), y las tres últimas variantes T307/G744, A169/T307/A694/G744/A761 y T307/A694/G744/A761/G763 tuvieron una frecuencia de 3,7% (1 de 27) cada una de ellas. Las variantes reportadas corresponden a las mismas variantes descritas en el ensayo de desarrollo y validación del Reverse Line Blot, ya que corresponde al mismo grupo de muestras (ver Tabla No 9 y Figura 12).

Figura No 12. Frecuencia de variantes presentes en las muestras prevalentes pertenecientes a la línea de base.



Comparación de la frecuencia de variantes las mujeres prevalentes de la línea de base.

4.4.1.2 Frecuencia de variantes en las mujeres con infecciones prevalentes durante el seguimiento.

De las 27 mujeres con más de un seguimiento, un grupo de 19 mujeres fueron VPH58 positivas únicamente durante la primera visita. De estas se pudo obtener información de variantes en 14 mujeres (9 mujeres T307/A694/G744/A761, 3 mujeres C632T T744G G760A, 1 mujer T307/G744, 1 mujer A169/A599/A694/G744/A761) y en las restantes cinco mujeres no se pudo obtener información de la variante. Del grupo de 8 mujeres que fueron VPH 58 positivas en más de una visita, se observó que en siete de ellas se obtuvo información de variante de VPH58. La variante infectante en estas mujeres fue la T307/A694/G744/A761 (25 muestras). En la mujer restante que corresponde a tres muestras (una de la línea de base y dos de seguimiento) no se pudo determinar la variante infectante en ninguna de las muestras.

4.4.2 MUJERES CON INFECCIONES INCIDENTES CON VPH 58.

La incidencia (detección de una nueva infección durante el seguimiento) se determinó como la mitad del intervalo de tiempo entre la última visita con resultado negativo para VPH 58 y la primera visita positiva para la infección. Para determinar la incidencia de infecciones se incluyó en el análisis un total de 1610 mujeres, las cuales en el momento del ingreso a la cohorte presentaron un resultado citológico normal y fueron negativas para la infección. Un total de 71 mujeres presentaron en algún momento del seguimiento un resultado positivo para la infección con VPH58, la edad promedio para estas mujeres fue de 33.66 años (rango de edad entre 16,03 y 67,72), el tiempo de seguimiento fue de 1 a 7 años con un total de visitas entre 2 y 12 (promedio de 8,75 visitas).

4.4.2.1 Seguimiento de las mujeres con infección incidente.

Los análisis de las mujeres incidentes se realizaron de igual forma que con las mujeres prevalentes sin conocer la relación de cada muestra con la paciente y su historia clínica.

Obtenidos los resultados se consignaron dentro de las bases de datos para realizar los análisis de incidencia y persistencia de la infección.

Un total de 71 mujeres incluidas en el estudio presentaron infecciones incidentes durante el seguimiento, que corresponde a 639 exfoliaciones cervicales. El 18,39% (117 de 639) fueron positivas para la infección por VPH 58, y fueron sometidas a la detección de variantes de E6/E7 VPH58. En 17 muestras no fue posible determinar la variante, lo que corresponde al 14,5%, en las 100 muestras restantes que corresponden al 85,47% se pudo determinar la variante presente en cada muestra. Ninguna de las muestras presentó infección con más un de tipo de variante de E6/E7 VPH58. La **figura No 13** describe la información general del seguimiento de las mujeres con infecciones incidentes, indicando el número de mujeres de las que se obtuvo información de las variantes de E6/E7 VPH58, la cantidad de muestra por grupo de mujeres y las muestras positivas y negativas para VPH 58 por grupo.

De las 71 mujeres con infecciones incidentes 50 mujeres fueron positivas para la infección por VPH58 solo en una visita, 10 de estas fueron positivas en la última visita obteniendo información de variantes en 9 de ellas. Al no poseerse datos posteriores estas muestras fueron excluidas en los análisis de la eliminación de la infección. En las otras 40 mujeres que poseían una sola visita positiva para VPH 58 diferente a la última, se pudo obtener información sobre variantes de E6/E7 VPH58 en 26 mujeres, en las 14 restantes no se consiguió la información sobre la variante infectante al no conseguirse la amplificación de alguno o ambos ORF mediante PCR. En las restantes 21 mujeres (21 de 71) que pertenecen al grupo de infecciones incidentes que presentaron más de una muestra positiva para VPH 58 durante el seguimiento se les pudo determinar la variante infectante (65 muestras) y únicamente en dos muestras no se obtuvo información sobre la variante infectante en este grupo (una muestra por mujer).

4.4.2.2 Frecuencia de variantes de E6/E7 VPH58 con infecciones incidentes en la cohorte de Bogota.

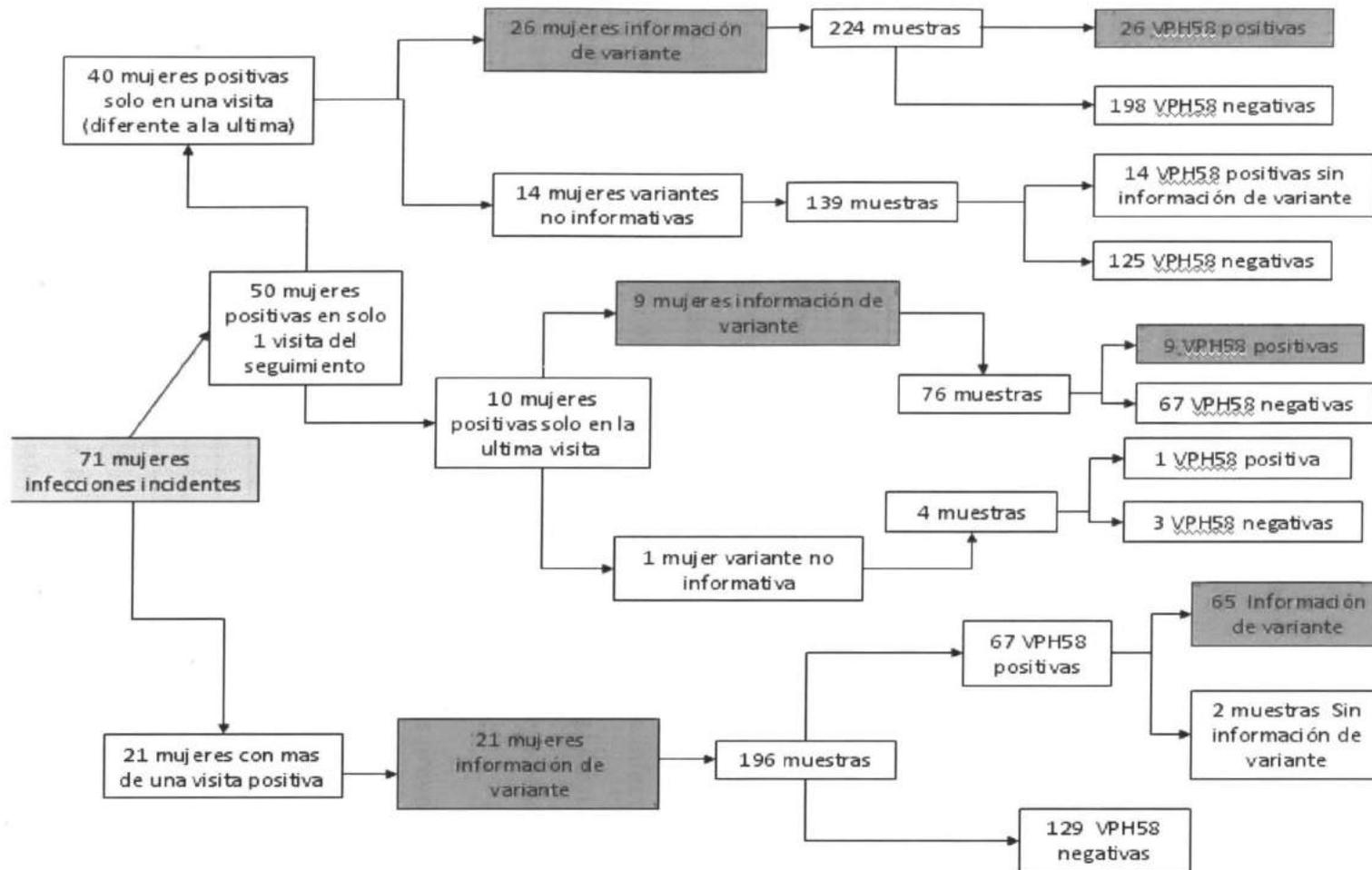
De las 71 mujeres con infecciones incidentes se logró obtener información de variantes de E6/E7 VPH58 en 100 de las 117 muestras positivas para VPH 58 (85,47%). Se identificaron un total de 3 variantes, la variante T307/A694/G744/A761 fue la de mayor frecuencia con el 88%, seguido por la variante T307/G744 con el 8% y finalmente la variante T187/T307/A367/G744/G793/T798/A801/T840/C852 con el 4%, ninguna de las muestras analizadas durante el seguimiento presentó infecciones con mas de una variante para VPH58. Tabla No 10.

Tabla No 10. Variantes E6/E7 VPH58 de mujeres incidentes de la Cohorte de Bogota.

MUESTRAS	HPV 58R	E6										E7										CAMBIO DE A.A		VARIANTE	REFERENCIA							
		1	2	3	3	3	3	4	5	5	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8			8	8	8	E6	E7		
n= 117	HPV 58R	G	C	G	A	C	C	G	A	T	A	G	C	T	G	T	T	T	G	G	A	A	C	C	T	C	T	G	E6	E7		
88		-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	g	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	G41R /G63D		T307 / A694 / G744 / A761	Chan et al. 2002	
9		-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			T307 / G744	Chan et al. 2002	
3		t	-	t	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	G	t	A	-	t	c	-	-	D86E	T74A/D76E	T187/T307/A367/G744/G793/T798/A801/T840/C852	Chan et al. 2002	
17		N	A									N	A																			

Variantes moleculares de los ORF E6/E7 de VPH determinadas por la técnica de RLB en las muestras de infecciones incidentes. Se incluye las diferentes posiciones donde se han reportado cambios de nucleótidos de estos ORF. HPV 58R: secuencia referencia, las letras en minúscula nos indican cambio de nucleótido que no llevan a cambio de aminoácido, las letras en mayúscula son cambios de nucleótidos que llevan a cambio de aminoácidos. En los cambios de aminoácidos la primera letra indican el aminoácido de VPH 58R, la segunda letra indica el aminoácido del cambio, en referencia incluyen los reportes donde se han reportado las secuencias encontradas, N/A (no amplifica).

Figura No 13. Infecciones Incidentes con VPH 58 en la Cohorte.



El cuadro en color azul pálido indica el número de mujeres con infecciones incidentes para VPH58 con citología normal pertenecientes a la cohorte de Bogotá, se indican el número de mujeres por grupo, luego las mujeres con variantes informativas y no informativas en cada grupo y luego el número de muestras negativas y positivas por grupo, las mujeres y muestras donde se obtuvo información sobre las variantes de E6/E7 de VPH58 se destacan en los cuadros de color turquesa.

4.5 ANÁLISIS DE LA CARGA VIRAL.

Para el análisis de la carga viral se determinó que cargas virales inferiores a 0,5 son cargas virales bajas entre 0,6 y 1,5 carga viral media y mayor a 1,5 carga viral alta.

4.5.1 Carga viral en mujeres con infecciones prevalentes

El análisis de la carga viral de las 54 muestras positivas para VPH58 que se recolectaron de las mujeres con infecciones prevalentes (mujeres de línea base y seguimiento) mostró que el 20,37% (11 de 54) presentaron carga viral baja, el 25,92% (14 de 54 muestras) mostraron carga viral media y el 53,70% (29 de 54 muestras) carga viral alta.

El análisis de la carga viral en las 27 mujeres a las que se les pudo detectar variantes (45 muestras) mostró que la variante T307/A694/G744/A761 fue la más prevalente tanto en el grupo de las mujeres con carga viral baja, la cual se presentó en el 100% (8 de 8) de las muestras, como en el grupo de carga viral media y alta, la cual se presentó en el 84,61% (11 de 13) y en el 83,13% (20 de 24) de las muestras respectivamente. La **tabla No 11** presenta la prevalencia de las variantes detectadas de acuerdo a las diferentes cargas virales.

En las nueve muestras que no se obtuvo información de la variante infectante debido a que no se pudo amplificar los ORF E6/E7 el 20,37% (3 de 9) presenta carga viral baja, el 11,11% (1 de 9) presentan carga viral media y el 55,55% (5 de 9) presentaron carga viral alta.

Tabla No 11. Carga viral por variante en infecciones prevalentes

VARIANTE	CARGA VIRAL		
	BAJA	MEDIA	ALTA
T307/A694/G744/A761	100% (8 de 8)	84,61% (11 de 13)	83,13% (20 de 24)
T307/T632/G744/A760		7,69% (1 de 13)	8,33% (2 de 24)
A169/T307/A599/G744/A761			4,16% (1 de 24)
T307/G744			4,16% (1 de 24)
T307/A694/G744/A761/G763		7,69% (1 de 13)	

Tabla No 11. Porcentaje de variantes presentes en las muestras de las mujeres con infecciones prevalentes agrupadas según la carga viral. Carga viral Baja: 0.1 a 0.5, media 0.6 a 1.5 carga viral alta mayor a 1,5.

4.5.2 Carga viral en mujeres con infecciones incidentes

El análisis de la carga viral de las 117 muestras positivas para VPH58 que se recolectaron de las mujeres con infecciones incidentes mostró que el 22,22% (26 de 117) presentaron carga viral baja, el 15,38% (18 de 117 muestras) presentaron carga viral media y el 62,39% (73 de 117 muestras) presentan carga viral alta. El análisis de la carga viral de las 56 mujeres en las que se les pudo detectar variantes (100 muestras) mostró que la variante T307/A694/G744/A761 también fue la más prevalente en los diferentes grupos de carga viral; se presentó en el 83,33% (15 de 18) de las muestras con carga viral baja, en el 75% (9 de 12) de carga viral media y en el 91,42% (64 de 70) de las muestras con carga viral alta. La **tabla No 12** presenta la prevalencia de las variantes detectadas de acuerdo a las diferentes cargas virales.

En las 17 muestras que no se obtuvo información de la variante infectante debido a que no se pudo amplificar los ORF E6/E7 el 47% (8 de 17) presenta carga viral baja, el 35,29% (6 de 17) presentan carga viral media y el 17,64% (3 de 17) presentaron carga viral alta.

Tabla No 12. Carga viral por variantes en infecciones incidentes

VARIANTE	CARGA VIRAL		
	BAJA	MEDIA	ALTA
T307/A694/G744/A761	83,33% (15 de 18)	75% (9 de 12)	91,42% (64 de 70)
T187/T307/A367/G744/G793/T798/A801/T840/C852	16,66% (3 de 18)	25% (3 de 12)	4,28% (3 de 70)
T307/G744			4,28% (3 de 70)

Tabla No 12. Porcentaje de variantes presentes en las muestras de las mujeres con infecciones Incidentes agrupadas según la carga viral. Carga viral Baja: 0.1 a 0.5, media 0.6 a 1.5 carga viral alta mayor a 1,5.

4.6 ANÁLISIS DE LA ELIMINACIÓN DE LA INFECCIÓN CON VPH 58 EN LAS MUJERES DE LA COHORTE DE BOGOTA.

Para los análisis de eliminación se realizaron curvas de Kaplan Meier, estas describen la probabilidad de eliminación de una infección en función del tiempo. Estas curvas se realizaron primero teniendo en cuenta solo la infección con el VPH 58 es decir sin incluir la información

obtenida en el estudio sobre variantes, el segundo análisis se realizó teniendo en cuenta la información obtenida de las variantes presentes en las muestras. Los resultados se presentan en términos de proporción de persistencia y el tiempo en meses. El tiempo cero del cual parte la gráfica es equivalente al momento en el cual se detectó la infección para el grupo de las mujeres prevalentes (fecha de la primera visita) y en el grupo de mujeres incidentes equivale a la mitad del intervalo de tiempo transcurrido entre la última visita en la que cada una de las mujeres obtuvo resultado negativo para la detección del ADN del VPH 58 y la primera visita en la que se detectó la presencia de la infección con VPH 58. La eliminación se determinó para este estudio como la mitad del intervalo de tiempo transcurrido entre la última visita en la cual se detectó la presencia del VPH 58 y la visita inmediatamente posterior en la cual no se detectó el ADN del VPH 58.

4.6.1 Análisis de la eliminación de la infección en las mujeres con infección prevalente e incidente con el VPH58 pertenecientes a la cohorte de Bogotá.

Al estimar la eliminación de la infección de forma independiente de las variantes moleculares de E6/E7 VPH58 determinadas en el estudio se excluyeron de estos análisis las mujeres con infecciones prevalentes de las cuales solo se tenía información de una visita positiva y no se poseían mas datos de visitas (7 mujeres). Las 27 mujeres restantes fueron incluidas en el análisis. El mismo procedimiento se realizó con las mujeres con infecciones incidentes que presentaban la ultima visita positiva para la infección (10 mujeres), las restantes 65 mujeres fueron incluidas en el análisis de eliminación de la infección. La **Figura No 14** presenta los resultados consignados de este análisis, observamos que más del 80% de las mujeres habían eliminado la infección con VPH 58 a los 2 años. La comparación entre los datos obtenidos de ambos grupos mostró una media similar de 15,8 meses, al realizar el test de Log Rank no se observó una diferencia significativa entre los grupos ($p= 0,854$),

Figura No 14. Eliminación de la infección en las mujeres con infección prevalente e incidente con el VPH58 pertenecientes a la cohorte de Bogota.

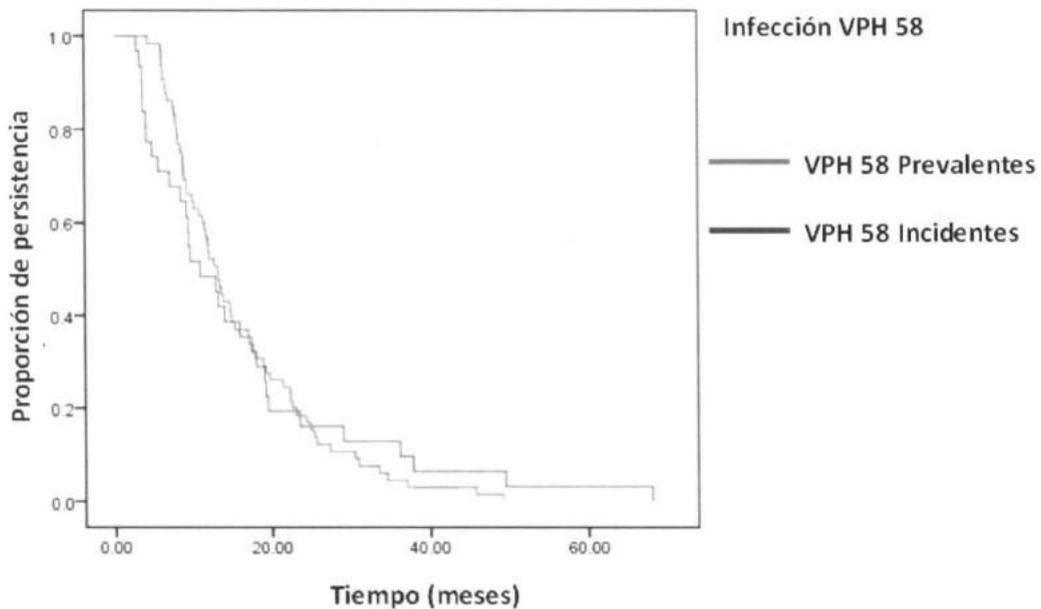


Figura No 14. Estimación de la persistencia y eliminación de la infección con VPH58 en mujeres de la cohorte de Bogotá con Infecciones prevalentes e incidentes, se representa en el eje X el tiempo de eliminación dado en meses y en le eje Y la proporción de persistencia de la infección. Grafica de Kaplan Meier se modela con las variables del tipo de infección.

4.6.2 Análisis de la eliminación o persistencia de la infección en las mujeres con infección prevalente o incidente con variantes de E6/E7 VPH58 pertenecientes a la cohorte de Bogota.

El siguiente análisis se realizó teniendo como variables a modelar el tiempo de eliminación de la infección con las variantes de E6/E7 VPH58, para estos análisis se excluyeron las mujeres que no poseen resultado de variantes informativas y las mujeres de las que no se posee los tiempos de eliminación de la infección como en el punto anterior.

De las 103 mujeres con infecciones incidentes y prevalentes el tipo de variante solo se pudo determinar en 89 casos y de estos casos los que poseen variantes documentadas completamente en el tiempo corresponde a 66 casos (74,15%). Las mujeres restantes corresponden a las infecciones prevalentes de las cuales solo se tiene información de una

visita positiva y no se poseen mas datos de visitas, las infecciones incidentes de las cuales fueron positivas únicamente en la ultima visita y finalmente los casos en los que las variantes no fueron informativas. En la **Tabla No 13** se resume la información de las variantes documentadas en el tiempo, se observa que de la variante T307/A694/G744/A761/G763 no se posee información del tiempo de eliminación y por tanto fue excluida de los análisis de eliminación de las variantes E6/E7 VPH58.

El tiempo de eliminación de la infección de las variantes E6/E7 VPH58 sin tener en cuenta el tipo de infección (prevalente o incidente) se modeló usando el método de Kaplan Meier. En la **Figura No 15**, la variante T307/A694/G744/A761 obtuvo una media de eliminación de 17,59 meses, la variante T307/G744 de 16 meses, la variante T307/T362/G744/A760 de 15,78, la variante T187/T307/A367/G744/G793/T798/A801/T840/C852 de 17,9 meses y finalmente la variante A169/T307/A599/A694/G744/A761 de 3,46, meses. Se observa en la grafica que la mayoría de las infecciones con todas las variantes se han eliminado en mas de un 75% antes de los 2 años, al realizar el test de Log Rank no se observó una diferencia significativa entre los grupos ($p= 7,25$).

Tabla No 13. Variantes E6/E7 VPH58 documentadas

Variantes VPH 58 documentadas

Variante	No	%
C307T G694A T744G G761A	75	84,3
C307T T744G	6	6,7
C307T C362T T744G G760A	3	3,4
C187T C307T C367A T744G A793G C798T C801A C840T T852C	3	3,4
C307T G694A T744G G761A A763G	1	1,1
G169A C307T G599A G694A T744G G761A	1	1,1
Total	89	

Variantes VPH 58 documentadas con tiempo

Variante	No	%
C307T G694A T744G G761A	55	83,30
C307T T744G	4	6,10
C307T C362T T744G G760A	3	4,50
C187T C307T C367A T744G A793G C798T C801A C840T T852C	3	4,50
G169A C307T G599A G694A T744G G761A	1	1,50
total	66	

Casos de los cuales se posee información completa de las variantes documentadas (izquierda) y casos de las variantes de las cuales se encuentran documentadas en el tiempo (derecha), se indican el número de casos (No) y el porcentaje que representa cada variante en los casos con información completa de variantes y en los casos con información documentadas en el tiempo.

Figura No 15. Eliminación de las variantes moleculares de E6/E7 VPH 58 de mujeres infectadas por VPH58 pertenecientes a la cohorte de Bogota.

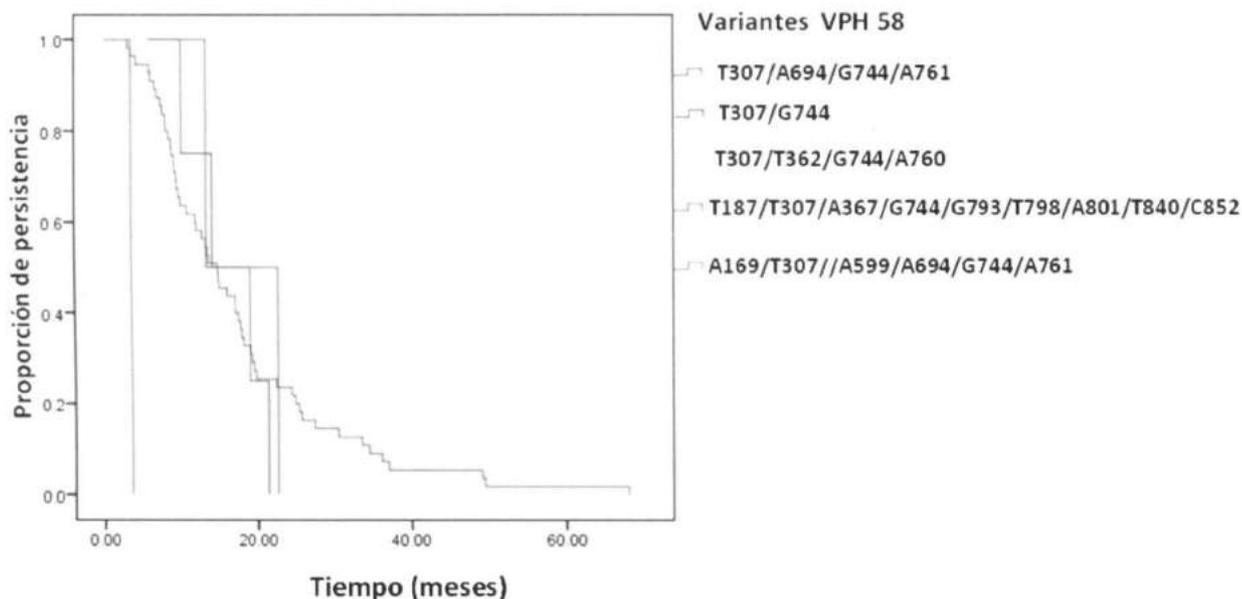
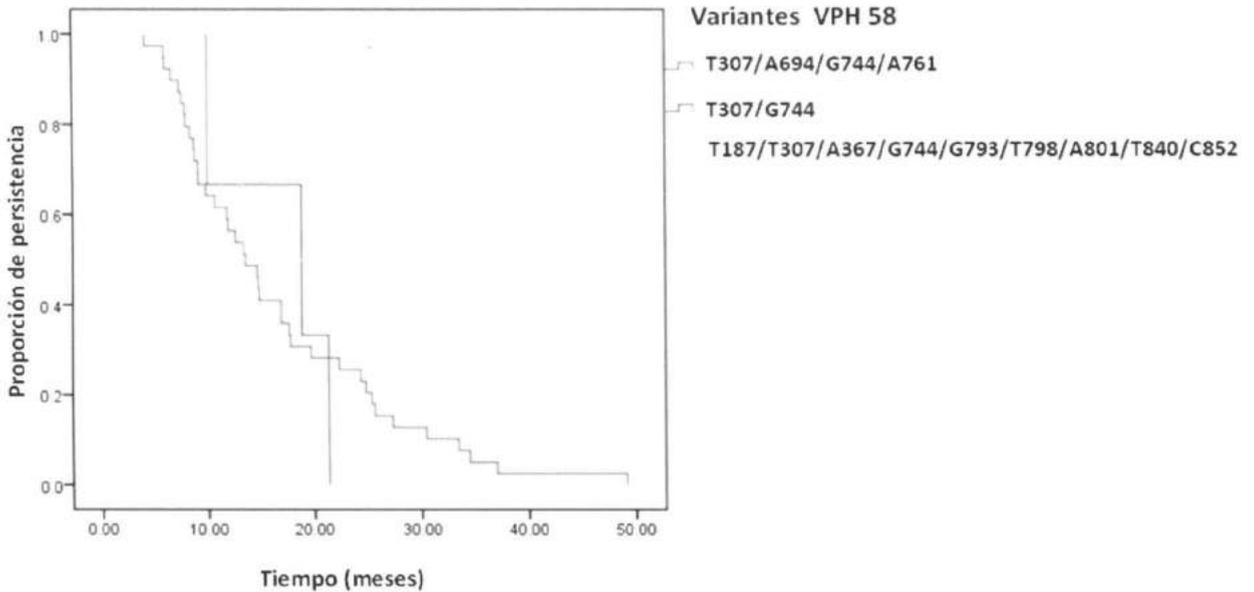


Figura No 15. Estimación de la persistencia y eliminación de la infección con variantes de E6/E7 VPH58 en mujeres de la cohorte de Bogota con Infecciones prevalentes e incidentes, se representa en el eje X el tiempo de eliminación dado en meses y en le eje Y la proporción de persistencia de la infección. Grafica de Kaplan Meier se modela con las variables del tipo de variante E6/E7 VPH58.

Tanto en el grupo de infecciones prevalentes como incidentes en los análisis de eliminación de las variantes de E6/E7 VPH58 no se determinó ninguna diferencia significativa al realizar el test de log rank. Sin embargo la información que se tiene con el análisis de infecciones incidentes es mas puro y real debido a que se conoce exactamente el tiempo de origen de la infección. En la **Figura No 16** se presenta la grafica de Kaplan Meier para las infecciones incidentes donde observamos de forma similar a la grafica número 15 que mas del 70% de las infecciones se han eliminado antes de los 2 años, para la variante T307/A694/G744/A761 menos del 5% de las infecciones persisten después de 40 meses y su media de eliminación en infecciones incidentes fue de 16,65 meses (menos de un mes diferencia con la media de la figura No 15) para la variante T307/G744 de 16,76 meses y de la variante

T187/T307/A367/G744/G793/T798/A801/T840/C852 de 17.9 meses. Con el test de Log Rank no se observó una diferencia significativa ($p=0,98$).

Figura No 16. Eliminación de las variantes moleculares de E6/E7 VPH 58 de mujeres con infecciones incidentes pertenecientes a la cohorte de Bogota.



Estimación de la persistencia y eliminación de la infección con variantes de E6/E7 VPH58 en mujeres de la cohorte de Bogota con Infecciones incidentes, se representa en el eje X el tiempo de eliminación dado en meses y en el eje Y la proporción de persistencia de la infección. Grafica de Kaplan Meier se modela con las variables del tipo de variantes E6/E7 VPH58 en infecciones incidentes.

4.7 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA ELIMINACIÓN DE LA INFECCIÓN CON EL VPH58 EN LAS MUJERES CON INFECCIONES INCIDENTES DE LA COHORTE DE BOGOTA, COLOMBIA.

Se utilizó el modelo de regresión de Cox para estimar los riesgos relativos (RR) y los intervalos de confianza (IC) en la eliminación de la infección con VPH 58 de acuerdo a diferentes factores como la edad, carga viral, infección con un solo tipo viral o varios tipos virales, edad de inicio de relaciones sexuales, uso de anticonceptivos orales, paridad, y la infección con variantes de

E6/E7 VPH 58 en el grupo de mujeres con infecciones incidentes. Variables relacionadas con la probabilidad de eliminación se incluyeron en un modelo de Cox multivariado **Tabla No 14**.

El análisis de eliminación en el modelo multivariado mediante regresión de Cox mostró que las mujeres que iniciaron relaciones sexuales después de los 15 años tiene una tasa de eliminación mas baja (RR= 0.29 IC 95% 0,09 y 0,95) que las mujeres que inician antes de los 15 años. Al analizar el factor de paridad las mujeres que han tenido un hijo o mas tienen una mayor tasa de eliminación (RR= 3,43 IC 95% 1.23 y 9.60)

Tabla No 14. Análisis multivariado de Cox en las mujeres con infecciones incidentes y factores asociados con la eliminación de la infección.

	Factor	No	%	RR	IC 95%	
Edad	< 30 años	30	35,3	1,00		
	≥ 30 años	55	64,7	0,78	0,35	1,73
Edad 1ª relación	≤ 15 años	15	23,1	1,00		
	> 15 años	50	76,9	0,29	0,09	0,92
Paridad	Ninguno	11	16,9	1,00		
	≥ 1 hijo	54	83,1	3,43	1,23	9,60
Uso AO	Nunca	48	75	1,00		
	Alguna vez	16	25	0,63	0,27	1,47
Tipo infección	Simple	52	62,7	1,00		
	Múltiple	31	37,3	0,72	0,32	1,62
Carga Viral	Baja < 0,5	20	24,1	1,00		
	Media ≥ 0,5 a < 1,5	18	21,7	2,58	0,78	8,52
	Alta ≥ 1,5	45	54,2	1,67	0,71	3,93
Variante VPH 58	C307T G694A					
	T744G G761A	54	87,10	1,00		
	C307T T744G	5	8,10	0,54	0,12	2,39
	C187T C307T					
	C367A T744G					
A793G C798T						
C801A C840T						
T852C	2	3,20	0,77	0,15	3,94	

5. DISCUSIÓN.

5.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS ORFs E6 Y E7 DE VPH 58

En la literatura existen reportes de iniciadores usados para amplificar el ORF E6 y el ORF E7 del VPH 58, los cuales han sido desarrollados por Xin et al 2001(17), Chan et al 2002(81) y Calleja-Macias et al 2005(93). Análisis detallados de estos iniciadores mostraron que algunos formaron estructuras secundarias o presentaban un alto grado de similitud con otros tipos de VPH especialmente de la familia Alfa 9 a la cual pertenece el VPH 58. Por esta razón se elaboraron y validaron nuevos iniciadores en el laboratorio, los cuales fueron utilizados en este trabajo; para el ORF E6 se diseñaron los iniciadores: E6F1, E6R4, E7F5, E7R1, E7R10, E7F10 y para el ORF E7 se diseñaron los iniciadores: E7F10 y E7R10. Adicionalmente se utilizaron los iniciadores (E7P1 y E7 P2) utilizados por Chan P 2002 en su trabajo.

Los resultados que se obtuvieron en las pruebas de sensibilidad y especificidad demostraron un alto nivel de detección y especificidad en la amplificación de ambos ORFs de VPH 58 para las seis PCRs desarrolladas en este trabajo. Sin embargo se observó que un grupo de muestras no presentaron amplificación para el ORF E6 y/o el ORF E7 y por tanto no se pudo determinar la variante infectante en estas muestras, provenientes de mujeres con infecciones prevalentes como incidentes, y en las cuales se les había detectado con anterioridad la presencia del ADN del VPH58. Dentro de las razones que pudieron influir en este resultado encontramos el hecho de que la técnica utilizada para la detección y tipificación del VPH (PCR-EIA y RLB) utiliza un amplimero del ORF L1 de un tamaño de 145pb(5) mientras que los fragmentos amplificados en las PCRs en el trabajo fueron de 521pb, 293pb y 301pb para el ORF E6 y de 335pb, 222pb y 216pb para el ORF E7 por lo que las eficiencias de las PCRs pudo ser mucho menor(94). Otra posible explicación se debe a que las muestras utilizadas pueden tener procesos de degradación o fragmentación del ADN viral como una consecuencia de la manipulación y los

periodos de congelamiento y descongelamiento debido a que previamente habían sido utilizadas para la detección y tipificación del VPH, para la PCR para β -globina y ensayos para la determinación de la carga viral. Además de acuerdo a los ensayos realizados para la determinación de la carga viral se pudo observar que la mayoría de las muestras en las que no se pudo realizar la amplificación presentan una carga viral baja lo que concuerda con la observación del trabajo de Van den Brule 1990, donde se afirma que al utilizar cepillados cervicales se puede afectar la eficiencia de la PCR ya que la cantidad de ADN viral puede ser baja dependiendo del número de células infectadas que se pueden recolectar en el cepillado cervical(94). Wu En-qi 2009 sugiere que en algunos casos la baja carga viral dificulta la detección de algunos fragmentos de su genoma. Finalmente es posible que algunos fragmentos del ADN viral presenten integración o exista disrupción y pérdida de fragmentos del genoma viral(95).

En cada ensayo se utilizaron controles positivos y negativos para validar cada PCR realizada, y el desarrollo de diferentes PCRs para amplificar los dos ORFs evidenciaron que la falta de amplificación se debió a un factor intrínseco de la muestra.

5.2 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES MOLECULARES DE LOS ORFs E6/E7 VPH 58.

Para la determinación de variantes moleculares existen gran cantidad de técnicas las cuales en muchos casos son dispendiosas, requieren de gran cantidad de tiempo, son costosas en su ejecución y necesitan de equipo especializado como ocurre con la técnica de secuencia automática. Para la detección de variantes en los VPH16 se han descrito técnicas basadas en el principio de hibridación en los cuales se utilizan amplímeros obtenidos por PCR y oligosondas acopladas a membrana, sin embargo en estas técnicas es limitado el número de muestras que se pueden analizar en el mismo ensayo, así como el número de variantes que se pueden identificar en el mismo(96). Para el análisis de variantes del VPH 58 no se han descrito técnicas de hibridación, por lo que se necesita del desarrollo de técnicas altamente efectivas, de fácil

implementación, que permitan el análisis de un alto volumen de muestras por ensayo y de costos no muy elevados.

El método de RLB desarrollado en este trabajo no solo permite la determinación de variantes de 44 muestras en un solo ensayo sino además de todas las variantes moleculares descritas para los ORF E6/E7 VPH58 descritas hasta el momento en la literatura. En el ensayo de RLB las sondas están pareadas es decir se encuentra un control y un mutante, la hibridación se presenta exclusivamente en una de las dos sondas y depende de la configuración de los nucleótidos en la muestra, de esta forma se establece si existen cambios para esa posición o si se comporta como la referencia. Cuando no se presenta hibridación en ninguna de las dos sondas se determina de forma indirecta la presencia de una mutación adicional a las registradas. En este trabajo ninguna de las muestras del estudio presentó patrones de hibridación atípicos. El ensayo posee la ventaja que las membranas pueden ser sometidas a un proceso de lavado lo que permite la reutilización de la membrana para nuevos ensayos sin que exista pérdida de la capacidad de hibridación en la membrana.

La técnica de secuencia automática fue utilizada para la validación de la técnica de RLB y se desarrolló primero con las muestras correspondientes a la línea de base, esta técnica permitió identificar dos cambios de nucleótidos A169 y G763 de los cuales no existen reportes a la fecha y que pudieron ser incluidos en el desarrollo de las sondas para el ensayo de RLB. Los ensayos de validación, se determinaron a partir de un análisis de concordancia (valores Kappa), tomando como base los resultados obtenidos con RLB y secuencia automática, con los que se obtuvo un coeficiente de 1 (100%) de concordancia entre las técnicas. Este resultado es sobresaliente pues demuestra la eficiencia y confiabilidad del Reverse Line Blot como método de detección de variantes moleculares.

5.3 VARIANTES MOLECULARES DE LOS ORF E6/E7 VPH58 PRESENTES EN LAS MUJERES CON CITOLOGÍA NORMAL PERTENECIENTES A LA COHORTE DE BOGOTA COLOMBIA.

Para el virus del papiloma humano tipo 58 los estudios sobre variantes son pocos y se centran

principalmente en poblaciones asiáticas donde se ha reportado una alta frecuencia de infecciones por este tipo viral. Actualmente existen solamente cuatro estudios publicados donde se analizan variantes de los ORFs E6 y E7 del VPH58 y fueron realizados en poblaciones asiáticas y en términos generales incluyen análisis de mujeres diagnosticadas con algún grado de lesión ó cáncer cervical. Además, únicamente los trabajos de Chan P. 2002 y Wu En-qi 2009 reportan variantes para ambos ORFs(81;95). En Latinoamérica solamente existe un reporte de casos para el ORF L1 en una muestra de Brasil(97) proveniente de una neoplasia y no hay ningún estudio de seguimiento en el que se haya evaluado el papel de las variates moleculares en relación a la persistencia de la infección. Tomando en cuenta que este tipo viral es considerado de alto riesgo para la progresión a cáncer cervical, la poca información existente a nivel mundial, la ausencia de estudios para Suramérica donde este tipo viral ocupa una alta frecuencia en mujeres positivas para VPH, los resultados presentados en este trabajo confieren un gran valor para el conocimiento de las variantes moleculares debido a su importancia como posibles agentes relacionados con la expresión de las oncoproteínas E6 y E7.

Al analizar la frecuencia de las variantes observadas en las mujeres prevalentes como incidentes se pudo determinar que la variante T307/A694/G744/A761 fue la de mayor frecuencia en ambos grupos con el 77% y 85,47% respectivamente. La alta frecuencia de esta variante en nuestro estudio se correlaciona con el estudio de Chan et al, 2002, en donde esta misma variante también se presentó con la mayor frecuencia. Las frecuencias restantes en las infecciones prevalentes corresponden a las variantes T307/T632/G744/A760 con el 11,1%, T307/G744, T307/A694/G744/A761/G763 y A169/T307/ A599/A694/G744/A761 con el 3,7% cada una (Figura No. 14). T307/T632/G744/A760 se encuentra como la segunda variante más frecuente y de acuerdo con Chan et al., 2002 y Wu et al., 2009 puede ser asociada con el riesgo de progresión hacia cáncer cervical, por lo cual reviste gran importancia su detección dentro de la población. Aunque este trabajo se realizó en mujeres con citología normal se resalta la presencia de esta variante ya que puede llegar a ser un factor de riesgo. Comparando las frecuencias obtenidas en las mujeres con infecciones prevalentes con los

resultados obtenidos en el trabajo de Chan P., et al 2002, las dos variantes de mayor frecuencia en infecciones prevalentes corresponde también a las de mayor frecuencia reportadas por Chan P, podemos establecer que el comportamiento que presenta las variantes de los ORFs E6/E7 VPH58 en la población China (provincia de Cantón) y Colombiana (Bogotá) responden a un patrón muy similar.

La frecuencias de los casos de mujeres con infecciones incidentes fueron similares a las frecuencias observadas para los casos de infecciones prevalentes, la variante T307/A694/G744/A761 es la de mayor frecuencia con el 88% seguida de la variante T307/G744 con el 9% y finalmente la variante T187/T307/A367/G744/G793/T798/A801/T840/C852 con el 3% estas variantes presentan un comportamiento similar de frecuencia que en los trabajos desarrollados por Chan P. et al. 2002 y Wu En-qi 2009(81;95).

En ninguna de las muestras analizadas en ambos grupos se obtuvo la secuencia del VPH58 que se utiliza como referencia en estos estudios (Gen Bank no. D90400), lo que se correlaciona con la baja frecuencia del VPH 58 referencia en los estudios desarrollados en las poblaciones asiáticas, (17;81;93;95). Esto podría sugerir la reevaluación de esta secuencia como el prototipo de VPH 58 dada su baja frecuencia en las poblaciones estudiadas. Sin embargo hacen falta un mayor número de estudios en diferentes poblaciones para poder determinar esta sugerencia.

Es importante resaltar que de acuerdo con los trabajos existentes a nivel mundial sobre variantes moleculares del VPH58 en los marcos abiertos de lectura de E6 y E7, las variantes T307/A694/G744/A761/G763 y A169/T307/A599/A694/G744/A761 no han sido reportadas con anterioridad, lo cual da gran relevancia al trabajo pues se establece la presencia de dos nuevas variantes a nivel mundial para estas regiones del VPH58. Adicionalmente el cambio de nucleótido A763G genera cambio en la secuencia de aminoácidos T64A de E7.

Se detectaron un total de 15 cambios de nucleótidos en las seis variantes encontradas en las mujeres de la cohorte, de los cuales tres se localizan en el ORF E6 y las restantes en el ORF E7. La mayor frecuencia de mutaciones son los cambios T307 en el ORF E6 y G744 en el ORF E7 que se encuentran en la totalidad de las muestras analizadas, los cambios que siguen en frecuencia son A694 y A761 en el 84.5% de las muestras, luego los cambios T632/A760, T187/A367/G793/T798/A801/T840/C852 cada uno en tres muestras lo que corresponde al 2,11% cada uno y finalmente los cambios A169 y G763 con una muestra cada uno que corresponde al 0.70%. Se observó una mayor frecuencia en el número de cambios en el ORF E7 comparado con el ORF E6 esto ha sido observado en los estudios realizados en las poblaciones asiáticas donde se indica que la mayor variabilidad de nucleótidos en el genoma viral del VPH 58 se encuentra en el ORF E7(81;95).

Algunos autores consideran que la presencia del mismo tipo viral no significa un fenómeno de persistencia de la infección, sino que se puede tratar de una nueva infección con el mismo tipo viral, aunque se realice la detección en periodos cortos (77) por lo que la determinación de la variante constituye la única manera de realizar la evaluación de persistencia. Los resultados obtenidos en este estudio permitió corroborar que todas las infecciones con el VPH58 persistentes realmente lo eran, ya que se detectó la misma variante a lo largo de la infección.

En este estudio no se observó ningún caso de coinfección con variantes del VPH 58, lo que se correlaciona con los trabajos de las poblaciones asiáticas y en los trabajos sobre variantes del VPH 16 donde se reporta una baja frecuencia de coinfecciones con variantes de VPH 16, lo que parece indicar que las coinfecciones entre variantes a nivel mundial es muy baja(35;98;99). Este aspecto también puede ser explicado en parte por la técnica utilizada ya que dependiendo de la cantidad de ADN presente de una variante frente a otra puede favorecerse su amplificación por PCR y por tanto su detección.

Finalmente y como los aspectos más relevantes del trabajo, se pudo establecer el desarrollo y validación de una nueva técnica altamente específica y sensible para la detección de variantes moleculares en los marcos abiertos de lectura de E6 y E7 del VPH58, se identificaron seis variantes de las cuales dos son reportadas por primera vez a nivel mundial y se detectaron quince mutaciones en las que se identificaron dos que no habían sido reportadas por la literatura.

5.4 CARGA VIRAL

La estandarización y validación de la técnica PCR Gp5+/Gp6+-EIA como método para la estimación semicuantitativa de la carga viral del VPH, se realizó con 118 muestras, las cuales fueron sometidas no solo a este método, sino que además fueron analizadas con dos métodos cuantitativos basado en tecnología la PCR en tiempo real como son Taqman descrito previamente(101) y LightCycler, este se desarrolló para el análisis de las muestras de la cohorte, los datos obtenidos por las tres técnicas fueron comparadas y se evaluó la concordancia entre las técnicas obteniendo con valores Kappa de 0.61 a 0.69(102) que corresponde a un nivel de concordancia alto. Otros estudios también han comparado métodos cuantitativos y semi – cuantitativos como técnicas para la determinación de la carga viral en muestras citológicas encontrando también una buena correlación entre los resultados obtenidos por ambas técnicas(103). En un estudio de seguimiento desarrollado en Estados Unidos la carga viral de las muestras se determinó mediante Hybrid Capture II, una técnica también semi - cuantitativa(104). En este trabajo se realizó la determinación semi - cuantitativa de la carga viral por PCR – EIA, los resultados mostraron altas cargas virales para la mayoría de las muestras, sin embargo la categorización en rangos de alta, intermedia y baja carga viral fue arbitraria. No obstante esta manera de categorización también ha sido utilizada en otros estudios, aunque con valores diferentes dependiendo de la técnica y tipo de muestra utilizada, por lo cual estos valores son establecidos por los investigadores(105).

Las cargas virales de la mayoría de muestras utilizadas en el estudio corresponden a cargas virales altas tanto en el grupo de mujeres con infecciones prevalentes como incidentes. Al

realizar la correlación de la carga viral con la variante en la infección no se observaron diferencias significativas y no se puede realizar una asociación entre una variante específica con la carga viral.

Al revisar las cargas virales de las muestras de las cuales no se pudo obtener amplificación se observó que la mayoría de estas presentaban cargas virales bajas 46%, cargas intermedias el 30% y cargas virales altas el 23%, observando los resultados anteriores se puede sugerir que la no amplificación en la mayoría de los casos se puede relacionar con las cargas virales bajas y en los casos de las cargas virales intermedias y altas puede deberse a causas adicionales como conservación y manipulación anterior de las muestras.

5.5 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A ELIMINACIÓN DE LA INFECCIÓN CON EL VPH 58.

El análisis multivarido sobre la eliminación de la infección con los factores asociados se realizaron en las mujeres con infecciones incidentes debido a que en las infecciones prevalentes se desconoce el tiempo total de la duración de la infección ya que no se sabe la fecha real del comienzo de la infección, lo que puede llevar a sesgos en la interpretación de los resultados. El análisis mostró que las mujeres que iniciaron relaciones sexuales después de los 15 años tienen una tasa de eliminación más baja que las mujeres que inician antes de los 15 años mientras que las mujeres que han tenido uno o más hijos poseen una tasa de eliminación mayor que aquellas que no han tenido hijos en el momento de la infección.

6. CONCLUSIONES

- Este trabajo constituye un estudio pionero pues se reporta por primera vez datos sobre la presencia y persistencia de variantes moleculares en los ORFs E6 y E7 del VPH 58 en mujeres con citología normal para la cohorte de Bogotá, Colombia.
- La revisión de la literatura permitió establecer que a la fecha se han reportado un total de 24 variantes para los ORF E6/E7 de VPH 58 que corresponden a dos estudios en poblaciones del sur este asiático.
- La técnica de reverse line blot desarrollada y validada en este estudio permite la detección e identificación de 20 diferentes variantes para los ORF E6/E7 incluyendo las dos variantes encontradas en dos muestras pertenecientes a la línea de base. Esta técnica presenta ventajas frente a otros métodos de detección utilizados para el mismo fin tales como: facilidad de realización, el bajo costo, cantidad de muestra requerida, número de variantes detectadas en un solo ensayo, número de muestras que se pueden procesar en un solo ensayo así como la posibilidad de ser aplicado en estudios de tipo epidemiológicos.
- En las muestras analizadas se identificaron en total 6 variantes de las cuales las variantes más frecuentes son T307/A694/G744/A761 y T307/T632/G744/A760, esta última es importante pues se asocia con el riesgo de progresión hacia cáncer cervical como ha sido reportado en poblaciones asiáticas.
- En este trabajo se presenta el reporte de dos nuevas variantes (T307/A694/G744/A761/G763 y A169/T307/A599/A694/G744/A761) y dos nuevas mutaciones

(A169 y G763) lo cual permite aumentar la cifra de cambios y variantes presentes en las regiones E6 y E7 del VPH 58 reportadas a nivel mundial.

- La detección de nuevas variantes y la información sobre variantes del VPH 58 es un importante recurso para estudios filogenéticos, debido a que existe muy poca información en cuanto a la taxonomía y coevolución del virus del papiloma humano tipo 58.

- No se observaron diferencias significativas en los tiempos de eliminación de la infección entre las infecciones incidentes y la infección con las diferentes variantes infectantes.

- El análisis de la eliminación de la infección por el VPH 58 mostró que las mujeres que inician sus relaciones sexuales después de los 15 años tienen una tasa de eliminación más baja que las menores de 15 años, por otra parte el tener uno o más partos aumenta la tasa de eliminación de la infección. Finalmente ninguna de las variantes reportadas en este estudio se asocia con una menor o mayor tasa de eliminación de la infección.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de casos y controles sobre variantes moleculares con mujeres de la población colombiana con resultado citológico normal, LEIAG y cáncer cervical para observar las variantes infectantes en estas poblaciones.
- Validar la técnica de reverse line blot mediante ensayos en otros laboratorios, para confirmar su eficiencia en diferentes condiciones.
- Hacer un análisis de variantes moleculares en mujeres provenientes de otras regiones del país, para hacer una aproximación más completa del comportamiento de las variantes de VPH 58 E6/E7 en la población colombiana.
- Realizar el análisis de variantes en otras regiones del VPH 58 para unificar la información acerca de las variantes presentes en el genoma y determinar las variantes moleculares en otras regiones como la región E2, importante en la supresión y expresión de los oncogenes virales E6 y E7.
- Realizar ensayos donde se implemente la técnica de RLB para la detección de mutaciones puntuales en diferentes genes y en diferentes organismos.

8. REFERENCIAS

- (1) FERLAY J BFPPPD. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, mortality and prevalence Worldwide, IARC CancerBase No. 5 version 2.0. Lyon. 229. IARC Cancer Base 2004;5.
- (2) Piñeros M, Ferlay J, Murillo R. Incidencia estimada y mortalidad por cancer en Colombia 1995 - 1999. Instituto Nacional de Cancerología, Imprenta Nacional 2005.
- (3) Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002 Jan;3(1):11-6.
- (4) Berrington dG, Green J. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2007 Feb 15;120(4):885-91.
- (5) Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* 2002 Jul 29;87(3):324-33.
- (6) Munoz N, Mendez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004 Dec 15;190(12):2077-87.
- (7) Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995 Jun 7;87(11):796-802.
- (8) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999 Sep;189(1):12-9.
- (9) Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999 Nov;180(5):1415-23.
- (10) Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the

International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005 Sep 17;366(9490):991-8.

- (11) Molano M, Van den BA, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2003 Sep 1;158(5):486-94.
- (12) Mendez F, Munoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, van den Brule AJ, et al. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis* 2005 Oct 1;192(7):1158-65.
- (13) zur HH. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer 4. *Virology* 1991 Sep;184(1):9-13.
- (14) Kammer C, Tommasino M, Syrjanen S, Delius H, Hebling U, Warthorst U, et al. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer* 2002 Jan 21;86(2):269-73.
- (15) Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999 Jul 3;354(9172):20-5.
- (16) Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997 Jun 4;89(11):796-802.
- (17) Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, et al. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential 1. *Cancer Lett* 2001 Sep 10;170(1):19-24.
- (18) Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 2002 Sep 16;21(18):4754-62.
- (19) Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 2000 Mar;5(3):557-67.
- (20) Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FP. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1997 May;4(5):413-20.
- (21) Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and

are highly amplified in cervical carcinomas
7. *Int J Cancer* 1999 Nov 12;83(4):449-55.

- (22) Lee D, Kim HZ, Jeong KW, Shim YS, Horikawa I, Barrett JC, et al. Human papillomavirus E2 down-regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. *J Biol Chem* 2002 Aug 2;277(31):27748-56.
- (23) Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer* 2006 Nov 1;119(9):2105-12.
- (24) Huibregtse JM, Beaudenon SL. Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Semin Cancer Biol* 1996 Dec;7(6):317-26.
- (25) Jones DL, Munger K. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Semin Cancer Biol* 1996 Dec;7(6):327-37.
- (26) Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989 Dec 20;8(13):4099-105.
- (27) Myers G, Lu H, Calef C, Leitner T. Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 1996 Dec;7(6):349-58.
- (28) Stanley M, Lowy DR, Frazer I. Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3-106-S3/113.
- (29) Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Dec 15;89(24):12180-4.
- (30) Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993 Dec;67(12):6929-36.
- (31) Alvarez-Salas LM, Lopez-Bayghen E. [Genetic regulation of human genital papillomaviruses]. *Salud Publica Mex* 1995 May;37(3):241-7.
- (32) de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur HH. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004 Jun 20;324(1):17-27.
- (33) Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006 Mar 1;118(5):1071-6.
- (34) Nindl I. HPV variants and risk of cervical cancer. *Papillomavirus Report* 2002;13(1):1-6.

- (35) Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000 Dec;81(Pt 12):2959-68.
- (36) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003 Feb 6;348(6):518-27.
- (37) Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992 Apr;66(4):2057-66.
- (38) Chan SY, Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* 1992 Oct;66(10):5714-25.
- (39) Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia 223. *J Natl Cancer Inst* 1995 Sep 20;87(18):1365-71.
- (40) Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 1995 Dec;69(12):7743-53.
- (41) Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001 Feb 21;93(4):315-8.
- (42) Buonaguro FM, Tornesello ML, Salatiello I, Okong P, Buonaguro L, Beth-Giraldo E, et al. The uganda study on HPV variants and genital cancers 4. *J Clin Virol* 2000 Oct;19(1-2):31-41.
- (43) Harlpen AL. Assessing recombination in HPV, Part I. *Human Papillomaviruses 1995: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences 1995;III - 124-III - 138.*
- (44) Bosch FX, Munoz N, de SS, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, et al. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992 Nov 11;52(5):750-8.
- (45) Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002 Nov;89(2):183-90.
- (46) Molano M, van den Brule AJ, Posso H, Weiderpass E, Ronderos M, Franceschi S, et al. Low grade squamous intra-epithelial lesions and human papillomavirus infection in Colombian women. *Br J Cancer* 2002 Dec 2;87(12):1417-21.

- (47) Silins I, Kallings I, Dillner J. Correlates of the spread of human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Sep;9(9):953-9.
- (48) Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Clifford GM, et al. Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 Feb;15(2):326-33.
- (49) Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002 Apr;55(4):244-65.
- (50) Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000 Oct;19(1-2):1-5.
- (51) Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002 Nov;89(2):213-28.
- (52) zur HH. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002 May;2(5):342-50.
- (53) Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006 Mar;16(2):83-97.
- (54) Tao M, Kruhlak M, Xia S, Androphy E, Zheng ZM. Signals that dictate nuclear localization of human papillomavirus type 16 oncoprotein E6 in living cells. *J Virol* 2003 Dec;77(24):13232-47.
- (55) Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell* 2004 Jan 23;116(2 Suppl):S67-9, 1.
- (56) Morris SM. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res* 2002 Mar;511(1):45-62.
- (57) zur HH. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000 May 3;92(9):690-8.
- (58) Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989 Dec 1;8(12):3905-10.
- (59) Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Iftner T. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 Jul;15(7):1262-7.

- (60) Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990 Apr 6;248(4951):76-9.
- (61) Massimi P, Gammoh N, Thomas M, Banks L. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 2004 Oct 21;23(49):8033-9.
- (62) Magal SS, Jackman A, Ish-Shalom S, Botzer LE, Gonen P, Schlegel R, et al. Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *J Gen Virol* 2005 Mar;86(Pt 3):611-21.
- (63) Duerksen-Hughes PJ, Yang J, Schwartz SB. HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. *Virology* 1999 Nov 10;264(1):55-65.
- (64) Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002 Jun 14;277(24):21730-9.
- (65) Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 2007 Oct;98(10):1505-11.
- (66) Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Jul 8;100(14):8211-6.
- (67) McMurray HR, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol* 2003 Sep;77(18):9852-61.
- (68) Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 2004 Sep 15;18(18):2269-82.
- (69) Katzenellenbogen RA, Egelkrout EM, Vliet-Gregg P, Gewin LC, Gafken PR, Galloway DA. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol* 2007 Apr;81(8):3786-96.
- (70) Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004 Nov;78(21):11451-60.
- (71) Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001 Nov 26;20(54):7888-98.

- (72) Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci* 2009 Mar;34(1):113-23.
- (73) Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3-1-S310.
- (74) Cogliano V, Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El GF. Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. *Lancet Oncol* 2005 Aug;6(8):552-3.
- (75) Smith JS, Green J, Berrington de GA, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003 Apr 5;361(9364):1159-67.
- (76) Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005 Jun 20;337(1):76-84.
- (77) Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, Lapointe N, Forest P, de Ladurantaye M, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol* 2000 Sep;38(9):3388-93.
- (78) Zehbe I, Tommasino M. The biological significance of human papillomavirus type 16 variants for the development of cervical neoplasia. *Papillomavirus Report* 1999;10(5):105-16.
- (79) Giannoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 2001 Mar;193(3):295-302.
- (80) Matsumoto K, Yoshikawa H, Nakagawa S, Tang X, Yasugi T, Kawana K, et al. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett* 2000 Aug 11;156(2):159-65.
- (81) Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, et al. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002 Aug 21;94(16):1249-53.
- (82) Lillo FB, Lodini S, Ferrari D, Stayton C, Taccagni G, Galli L, et al. Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection. *Clin Infect Dis* 2005 Feb 1;40(3):451-7.
- (83) Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 2000 Aug;81(Pt 8):1975-81.

- (84) Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC, Jr. The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician* 2003 Nov 15;68(10):1992-8.
- (85) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002 Apr 24;287(16):2114-9.
- (86) Mitchell HS. Longitudinal analysis of histologic high-grade disease after negative cervical cytology according to endocervical status. *Cancer* 2001 Aug 25;93(4):237-40.
- (87) Noller KL. Incident and demographic trends in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1996 Oct;175(4 Pt 2):1088-90.
- (88) Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskeva E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol* 2007 Jan;104(1):232-46.
- (89) Kirii Y, Iwamoto S, Matsukura T. Human papillomavirus type 58 DNA sequence. *Virology* 1991 Nov;185(1):424-7.
- (90) van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 2002 Mar;40(3):779-87.
- (91) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van AM, van SD, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997 Apr;35(4):907-14.
- (92) Jacobs MV, van den Brule AJ, Snijders PJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A non-radioactive PCR enzyme-immunoassay enables a rapid identification of HPV 16 and 18 in cervical scrapes after GP5+/6+ PCR. *J Med Virol* 1996 Jul;49(3):223-9.
- (93) Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, et al. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol* 2005 Nov;79(21):13630-40.
- (94) van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990 Dec;28(12):2739-43.
- (95) Wu EQ, Zha X, Yu XH, Zhang GN, Wu YG, Fan Y, et al. Profile of physical status and gene variation of human papillomavirus 58 genome in cervical cancer. *J Gen Virol* 2009 May;90(Pt 5):1229-37.

- (96) Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, et al. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res* 2001 Jan 15;61(2):608-11.
- (97) Veras VS, Cerqueira DM, Martins CR. L1 sequence of a new human papillomavirus type-58 variant associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Braz J Med Biol Res* 2005 Jan;38(1):1-4.
- (98) Schlecht NF, Burk RD, Palefsky JM, Minkoff H, Xue X, Massad LS, et al. Variants of human papillomaviruses 16 and 18 and their natural history in human immunodeficiency virus-positive women. *J Gen Virol* 2005 Oct;86(Pt 10):2709-20.
- (99) Da Costa MM, Hogeboom CJ, Holly EA, Palefsky JM. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J Infect Dis* 2002 May 1;185(9):1229-37.
- (100) van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000 Feb;81(Pt 2):317-25.
- (101) van DM, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002 Apr 1;98(4):590-5.
- (102) Hesselink AT, van den Brule AJ, Groothuismink ZM, Molano M, Berkhof J, Meijer CJ, et al. Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *J Clin Microbiol* 2005 Sep;43(9):4868-71.
- (103) Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, et al. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Jun;12(6):477-84.
- (104) Castle PE, Schiffman M, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, et al. Semiquantitative human papillomavirus type 16 viral load and the prospective risk of cervical precancer and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 May;14(5):1311-4.
- (105) Fontaine J, Gravitt P, Duh LM, Lefevre J, Pourreaux K, Hankins C, et al. High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens
3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Sep;14(9):2200-7.