



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

“Identificación de virus del papiloma humano asociados a la
edad de presentación en cáncer cervicouterino”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ANA ALFARO CRUZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. JAIME BERUMEN CAMPOS, FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET, INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO, FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	3
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS SECUNDARIOS	22
MATERIAL Y MÉTODO	23
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	59
BIBLIOGRAFÍA	60

INTRODUCCIÓN

DIVERSIDAD DE LOS VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA

Los virus del papiloma humano (VPH) pertenecen a un grupo heterogéneo de virus de doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cápside cerrada de la familia *Papillomaviridae*, que muestran un tropismo distinto hacia la mucosa de epitelio plano estratificado. Hasta ahora, más de 170 tipos de VPH se han aislado y caracterizado [1].

Todos los VPH presentan una estructura y organización genética similar. Se componen de una molécula de ADN circular de doble hebra y de una cápside icosaédrica que no posee envoltura, compuesta de 72 capsómeros, formada por 2 proteínas estructurales. El genoma del VPH es de aproximadamente 8 kb de longitud y se divide en tres regiones, la región larga de control no codificante (LCR, por sus siglas en inglés; ~ 1 kb), la región que codifica a las proteínas tempranas (E, por su sigla en inglés; ~ 4 kb) y la región que codifica a las proteínas tardías (L, por su sigla en inglés; ~ 3 kb) [2]. El genoma viral codifica a seis proteínas E (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos proteínas L (L1 y L2). E5, E6 y E7 están involucradas en la transformación neoplásica y E1 y E2 en la replicación del genoma viral; también E2 regula la expresión de los genes tempranos y en especial, reprime la expresión de los oncogenes E6 y E7 [3]. Los genes L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside. La LCR contiene muchos elementos de regulación de la transcripción y el origen de replicación del virus.

El marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) de L1, es el gen más conservado dentro del genoma viral y por lo tanto, se ha utilizado para la identificación de nuevos tipos de VPH en los últimos 15 años. Un nuevo VPH es reconocido como tal si su genoma completo ha sido clonado y la secuencia de ADN del ORF de L1 difiere por más del 10% del tipo de VPH conocido más cercano. Las diferencias en homología entre el 2% y 10% se definen como subtipo o linaje y

menos del 2% como variante o sublinaje [4]. Estas definiciones se acordaron entre los expertos en la taxonomía y diagnóstico del VPH y el International Papillomavirus Workshop en Quebec en 1995.

La evolución del VPH ha sido predominantemente asexual, aunque los eventos de recombinación extremadamente raros no pueden ser excluidos. Se han aislado y caracterizado genomas de VPH de reptiles [5], aves [6], caballos [7] y varias otras especies de mamíferos [8], sugiriendo una historia evolutiva que abarca más de 300 millones de años [5]. Esto implica que las múltiples mutaciones y variaciones que se han producido en los genomas del VPH no están relacionados con la distancia genética como en los genomas recombinantes, sino a la acumulación de cambios genéticos en la secuencia. Este proceso de especiación se ha denominado fijación de linaje [9, 10]. Es decir, grupos de polimorfismos de un solo nucleótido o inserciones o deleciones tienden a ser fijados dentro de linajes virales. Con el tiempo, un número específico de estas variaciones pueden definir y conducir finalmente a la especiación (tipo viral específico).

Basándose en la homología de la secuencia de nucleótidos de la proteína principal de la cápside L1, se ha generado un árbol filogenético que agrupa los diferentes tipos de VPH en géneros [1, 4]. El género alfa contiene aproximadamente 30 tipos de VPH que infectan la mucosa del tracto genital, así como varios tipos de VPH cutáneos, responsables de las verrugas comunes de la piel. Hay dos tipos de VPH de mucosas: los VPH de bajo riesgo (por ejemplo, los tipos 6 y 11), que están vinculados principalmente a las verrugas genitales benignas y los VPH de alto riesgo que son los agentes etiológicos del cáncer cervicouterino (CC) y un subconjunto de otros cánceres humanos [2]. Un gran grupo de VPH cutáneos forma el género beta y se ha sugerido su relación, junto con la irradiación UV, con el desarrollo de cáncer de piel no melanoma [11, 12]. Los géneros gamma, mu y nu comprenden los tipos de VPH cutáneos vinculados al desarrollo de los papilomas cutáneos y verrugas.

Aunque la participación de VPH y las verrugas benignas ya era conocida, la primera evidencia de la asociación entre el cáncer humano y ciertos tipos de VPH se propuso hace aproximadamente treinta años por zur Hausen [13]. Estudios epidemiológicos y

moleculares posteriores confirmaron el papel principal de varios tipos de VPH en el desarrollo de CC y otros tumores epiteliales [14, 15, 16]. En todo el mundo se ha demostrado que 18 VPH de alto riesgo, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, y 82, están asociados con el CC [15] y están definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como de categoría 1 (Figura 1)[17]; los tipos adicionales 68, 73 como “posiblemente causantes de cáncer”, categoría 2A y los tipos 26, 53, 66 y 82 como “posiblemente causantes de cáncer por su relación filogenética cercana”, categoría 2B, con datos epidemiológicos menores. VPH16 y VPH18 son los tipos más oncogénicos dentro de este grupo, siendo responsable de aproximadamente del 50% y el 20% de los CC, respectivamente [5, 15]. Un subconjunto de carcinomas de ano, pene, vulva, vagina, y orofaringe se han atribuido a la infección con VPH de alto riesgo [18, 19]. En conjunto, estos virus causan aproximadamente medio millón de casos de CC por año en todo el mundo, y aproximadamente la mitad de ellos son mortales (530.000 casos al año con 275.000 muertes) [20].

CICLO DE VIDA VIRAL: FASE PRODUCTIVA

Al igual que con todas las infecciones por VPH, los tipos de alto riesgo se mantienen en la población general debido a infecciones productivas. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG), donde se producen partículas infecciosas, son generalmente planas y discretas, y en la mayoría de los casos éstas tienen regresión espontánea dentro de los 18 meses siguientes [21, 22]. Por razones no del todo concluyentes, los tipos de VPH de alto riesgo han desarrollado la capacidad de persistir en las mucosas, a menudo durante muchos años, y provocar la proliferación celular en las capas de células basales y parabasales [23, 24]. Esto no es un requisito para la replicación viral ya que esto no sucede en las lesiones causadas por los VPH de bajo riesgo. Las lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) son infecciones abortivas en las que se modifica el patrón de expresión normal de los genes virales tempranos (Figura 2) [17]. En general, se cree que los niveles de expresión de los genes E6 y E7 están directamente relacionados con el aumento de la gravedad de la lesión [25],

FIGURA 1. *Alphapapillomavirus* y cáncer cervicouterino.

GÉNERO + ESPECIE	TIPO	CC	CATEGORÍA OMS	CCE	ACC	TROPISMO
Alpha 1	VPH32		3			mucosa
	VPH42					
Alpha 2	VPH3					piel
	VPH10					
	VPH28		3			
	VPH29		3			
	VPH77		3			
	VPH94					
	VPH117					
Alpha 3	VPH125					mucosa
	VPH61	0.01	3			
	VPH62		3			
	VPH72		3			
	VPH81		3	0.4		
	VPH83		3	0.4		
	VPH84		3			
	VPH86		3			
	VPH87		3			
	VPH89		3			
	VPH102					
Alpha 4	VPH114					piel
	VPH2		3			
	VPH27		3			
Alpha 5	VPH57		3			mucosa
	VPH26	0.37	2B	0.22		
	VPH51	1.25	1	0.75	0.54	
	VPH69	0.08	2B			
	VPH82	0.07	2B	0.26		
Alpha 6	VPH30	0.37	2B			mucosa
	VPH53	0.26	2B	0.04		
	VPH56	0.84	1	1.09		
	VPH66	0.08	2B	0.19		
	VPH18	10.28	1	11.27	37.3	
	VPH39	1.67	1	0.82	0.54	
Alpha 7	VPH45	5.68	1	5.21	5.95	mucosa
	VPH59	1.08	1	1.05	2.16	
	VPH68	1.04	2A	0.37		
	VPH70	0.11	2B			
	VPH85		2B			
	VPH97					
Alpha 8	VPH7		3		41.62	piel (mucosa)
	VPH40				1.08	
	VPH43		3		0.54	
	VPH91		3		1.08	
Alpha 9	VPH16	61.35	1	54.38		mucosa
	VPH31	3.35	1	3.82	0.54	
	VPH33	3.83	1	2.06		
	VPH35	1.94	1	1.27		
	VPH52	2.71	1	2.25		
	VPH58	2.22	1	1.72		
	VPH67	0.31	2B			
Alpha 10	VPH6	0.11	3			mucosa
	VPH11	0.02	3	0.07		
	VPH13		3	0.07		
	VPH44	0.01	3			
	VPH74	0.01	3			
Alpha 11	VPH34	0.07				mucosa
	VPH73	0.52		0.49		
Alpha 12	VPH73					mucosa
Alpha 13	VPH54					
Alpha 14	VPH71					
	VPH90		3			
	VPH106		3			

Los tipos virales del género *Alpha* de alto riesgo han estado claramente relacionados con el desarrollo de cáncer cervicouterino epidermoide (CCE) y adenocarcinoma (ACC). Las categorías 1 y 2A de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se clasifican respectivamente como carcinógenos y posiblemente carcinógenos. A pesar de los datos epidemiológicos limitados, se propone la categoría 2B para los tipos probablemente carcinógenos debido a su estrecha relación filogenética con los tipos carcinógenos establecidos. Los tipos de VPH de la categoría 3 se consideran no carcinógenos.

El resto aún no se han clasificado debido a la insuficiencia de datos. Los tipos que están estrechamente relacionados por la evolución (por ejemplo, HPV16 y 31) pueden presentar diferentes grados de riesgo de desarrollar cáncer, relacionado con las diferentes funciones de sus proteínas y sus patrones de expresión génica. HPV16 se asocia predominantemente con CCE originado en la zona de transformación y HPV18 con ACC del endocervix, pero ambos pueden causar cánceres en cualquier tipo de tejido. Aunque la clasificación piel / mucosa no es estricta, las diferentes especies tienen tropismos preferente, indicado a la derecha.

y que la expresión desregulada de estos es directamente responsable de la acumulación de errores genéticos en la célula infectada y la eventual integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped [26, 27]. La progresión del cáncer se facilita cuando la integración preserva la integridad de LCR y los genes E6 y E7 y la porción 5' del gen E1, pero altera la capacidad del genoma viral para expresar la proteína de unión a ADN que reprime el promotor temprano viral, y la integridad del gen E1, que regulan el número de copias episomales.

Que un ciclo de vida viral productivo sea o no completado depende de la naturaleza del epitelio donde se produce la infección, así como de la presencia de factores externos, tales como hormonas [28] y citoquinas [29]. Los modelos experimentales sugieren que la infección requiere del acceso de las partículas del virus (el ADN viral y las dos proteínas de la cápside icosaédrica, L1 y L2) [30, 31] a la membrana basal, y la interacción con proteoglicanos de sulfato de heparina [32, 33] y posiblemente también con laminina [30]. Los cambios estructurales en la cápside del virión, que incluye la escisión de L2, facilita su transferencia a un receptor secundario en el queratinocito basal, necesario para la internalización del virus y la posterior transferencia del genoma viral al núcleo del huésped [34, 35, 36]. Aunque la alfa 6 integrina y los receptores de factores de crecimiento se han implicado en este proceso [37, 38], la naturaleza precisa del receptor de entrada sigue siendo algo controvertida [39, 40]. Una vez interiorizados, los viriones son sometidos a

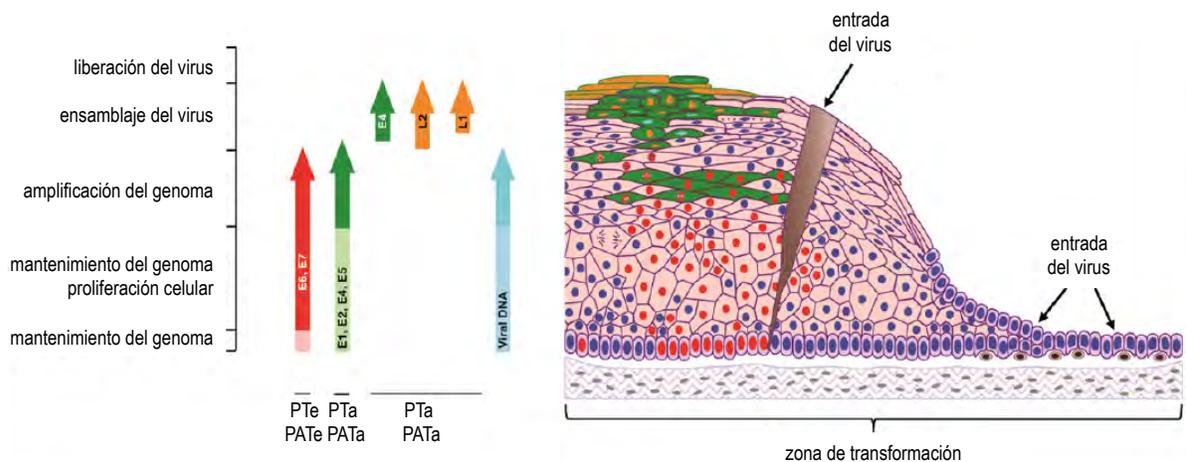
transportación endosomal, a pérdida de la envoltura y a separación dentro de la celular. El complejo ADN-proteína L2 asegura la entrada correcta del genoma viral al núcleo del huésped, mientras que la proteína L1 se retiene en el endosoma y en última instancia, es sometida a degradación lisosomal [41, 42, 42, 44].

Se cree que la infección requiere de la pérdida de la continuidad del epitelio para permitir el acceso del virus a la membrana basal [34], y que la proliferación celular durante la cicatrización permite la expansión de las células infectadas [35]. Por lo que se piensa que la división celular activa es necesaria para la entrada del genoma del virus en el núcleo, y que la infección inicial requiere de una célula mitóticamente activa [45].

FIGURA 2. Ciclo de vida de los VPH de alto riesgo en el epitelio cervical.

En el epitelio plano estratificado del ectocérvix, se cree que la infección requiere la pérdida de la continuidad del mismo para permitir al virus acceder a la membrana basal. Las células basales infectadas forman el reservorio de la infección, y en estas células, el genoma viral se mantiene como un episoma de bajo número de copias. A medida que estas células se dividen, producen células hijas que maduran hacia la superficie epitelial. Diferentes eventos en el ciclo de vida del virus se activan durante esta migración. En las LIEBG causadas por VPH de alto riesgo, como VPH16, las células en las capas inferiores expresan E6 y E7 y son conducidas a través del ciclo celular y estimuladas a dividirse (células marcadas con núcleos rojos). En las capas intermedias, las proteínas necesarias para la amplificación del genoma aumentan en estas células, lo que permite la amplificación del genoma. Estas células expresan la proteína E4 viral (células marcada en verde) y están en las fases S o G2 del ciclo celular (células con núcleos rojos indican replicación competente). En las capas epiteliales superiores, las células abandonan el ciclo celular y en un subconjunto de células E4-positivas, se sintetizan las proteínas L2 y L1 del virus, lo que permite su ensamblaje.

El sitio de expresión de los diferentes productos génicos virales se muestra a la izquierda de la imagen, con las siglas de las etapas clave durante la infección productiva viral (PATE: posición del sitio de poliadenilación temprana; PATa: posición del sitio de poliadenilación tardía; PTe: promotor temprano, también denominado p97; PTa: promotor tardío, también denominado p670).



La susceptibilidad particular de la zona de transformación a la progresión de LIE a cáncer puede estar relacionada con el aumento de la accesibilidad y la proliferación de las células basales en este sitio de epitelio metaplásico, sobre todo en la época de la pubertad y del inicio de la actividad sexual [46, 47]. En este caso, existe la hipótesis de que las células diana primarias para la infección pueden ser células cercanas a la unión escamo-columnar, tales como las células de reserva, que se encuentran inmediatamente por debajo del epitelio columnar del endocérnix [45], y que finalmente al madurar, formarán las capas de epitelio plano estratificado de la zona de transformación. Generalmente, se ha aceptado que la formación de lesiones comienza con la infección de una célula madre basal (en lugar de una célula basal originada por división celular) y que la longevidad de estas células madre es un factor clave en la persistencia de las lesiones [48, 49]. Para los VPH de bajo riesgo, que generalmente no causan LIEAG y que no estimulan la proliferación masiva de células basales, ésta es una hipótesis plausible, aunque todavía no se ha probado formalmente. Para los tipos de alto riesgo, que pueden estimular la proliferación de células basales, no está tan claro si se trata de un factor necesario. La naturaleza de la célula infectada inicialmente y cómo se relaciona con la evolución de la enfermedad, sigue siendo un tema controversial.

Independientemente de la naturaleza de la célula basal infectada, se piensa que la infección es seguida por una fase inicial de la amplificación del genoma y por el mantenimiento del virus de forma episomal con un bajo número de copias [50]. Se cree que las proteínas virales E1 y E2 son esenciales en esta fase inicial de amplificación, pero pueden ser prescindibles para el mantenimiento de la replicación episomal una vez que el número de copias se ha estabilizado [17]. E2 también regula la transcripción viral, y tiene múltiples sitios de unión en el LCR viral y, durante la replicación del DNA viral, puede reclutar la helicasa de E1 a un motivo específico de unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. Se ha especulado que el uso de una helicasa específica para ADN viral, distinta de las helicasas de replicación celular (proteínas MCM), permite la replicación del ADN viral independiente de la replicación del ADN celular durante el establecimiento del genoma viral y su amplificación [51, 52].

El papel exacto de las proteínas del VPH E6 y E7 en las células basales infectadas es incierto, sobre todo para los tipos de VPH de bajo riesgo que no están generalmente asociados con LIEAG, y que se cree que produce LIEBG tras la infección de una célula madre basal en el sitio de pérdida de la continuidad del epitelio. En el caso de los VPH de alto riesgo que causan LIEAG, hay una clara función de las proteínas virales E6 y E7 en la proliferación de las células basales y parabasales, especialmente en los sitios donde las lesiones evolucionan a CC [2]. También está claro que hay muchas diferencias funcionales entre las proteínas E6 y E7 de VPH de alto riesgo y las de VPH de bajo riesgo (Figura 3) [17, 53], y que éstas contribuyen, junto con las diferencias en la actividad del promotor y los patrones de expresión génica, a las diferentes lesiones asociadas a VPH. De hecho, estudios recientes han sugerido que la desregulación de la expresión de E6/E7, incluso en ausencia de la integración del genoma, es un evento crítico en la determinación del grado de las LIE [27].

La proliferación de las células basales y parabasales mediada por E6/E7, después de la infección por los tipos de VPH de alto riesgo, facilita el aumento del tamaño de la lesión. La diferencia funcional entre la proteína viral E7 de VPH de alto y la de VPH de bajo riesgo se centra en gran medida en su diferente capacidad de asociarse con los miembros de la familia de la proteína del retinoblastoma (pRB), de unirse y degradar a p105 y p107, que controlan la entrada del ciclo de células en la capa basal, así como a p130, que está implicado en la reentrada del ciclo celular en las capas epiteliales superiores [23, 54]. En general, la proteína E7 de VPH de bajo riesgo tiene menor afinidad por p105 y p107, pero puede asociarse y degradar a p130 con la finalidad de crear un entorno de replicación competente en las capas epiteliales intermedias que es adecuado para la amplificación del genoma viral [55]. Una característica importante de la proteína E7 de VPH de alto riesgo es su capacidad para estimular la inestabilidad del genoma del huésped, particularmente a través de la desregulación del centrosoma en las células basales en proliferación [56]. El dominio de unión PDZ, localizado en el extremo C-terminal de la proteína E6, proporciona otra diferencia clave entre los VPH de alto y bajo riesgo. La proteína E6 de VPH de alto riesgo es capaz de interactuar con varios blancos a través de este

dominio, muchos de los cuales están involucrados en la regulación de la polaridad celular, la proliferación celular y la señalización celular [23, 54].

FIGURA 3. Función de las proteínas de los *Alphapapillomavirus* de alto y bajo riesgo. Principales diferencias en la función de la proteína E6 y E7 de los VPH de alto y bajo riesgo. Se piensa que los diferentes patrones de expresión de los genes virales, así como las diferentes funciones proteicas, juegan un papel importante en la determinación del fenotipo de la enfermedad después de la infección.

	ALPHA DE ALTO RIESGO	ALPHA DE BAJO RIESGO
E6	Codifica productos de E6 Se une y degrada • p53 • proteínas con dominio PDZ (Dig, MAGI-1)	No productos de E6 Se une débilmente (no degrada) • p53
	Interecciona con el ubiquitín ligando E6AP Inhibe la transactivación y acetilación de p53	
	Inhibe la apoptosis	Se desconoce
	Omite el arresto del ciclo por daños al ADN	Arresto normal del ciclo celular por daño al ADN
	Inhibe de diferenciación de los queratinocitos	Se desconoca
	Inhibe la repuesta del interferón	Inhibe levemente la respuesta del interferón
	Activa las vías de señalización • Akt • Wnt • Notch • mTORC1	Se desconoce
	Activa la telomerasa	No activa
	Activa c-myc	No activa
	E7	Se une y degrada • pRB • p107 • p130 Se une y no degrada • E2F1 • Cullin2 • HDAC
Se une a las proteínas de regulación E2F6, p600, HAT, PP2A Induce la entrada al ciclo celular y la la síntesis de ADN Tiene participación en la amplificación del genoma		
Induce la inestabilidad del genoma		No induce la inestabilidad
Suprime la función de STAT-1		No suprime
Tiene función de immortalización y transformación		Sin estas funciones
Activa las vías de señalización • Akt		Se desconoce

Otras características únicas de la proteína E6 de VPH de alto riesgo incluyen su capacidad para aumentar la actividad de la telomerasa [57] y mantener la integridad de los telómeros durante las divisiones celulares repetidas, y su capacidad para mediar la degradación de p53 dentro de la célula. Ambas proteínas E6 de VPH alto y bajo riesgo inactivan a p53, lo que sugiere su importante función en la regulación del ciclo celular, pero sólo E6 de VPH de alto riesgo estimulan su ubiquitinación y su degradación dependiente del proteosoma [58]. Con el avance de la tecnología proteómica, se han encontrado un gran número de sustratos celulares para E6 y E7 y que la identidad de estos sustratos se diferencia entre los VPH de alto y bajo riesgo, así como entre los tipos de VPH de alto riesgo [59].

La expresión de las proteínas E6 y E7 en las capas epiteliales superiores permite a la célula infectada entrar en la fase S y aumentar el número de copias del genoma viral. También hay necesidad de aumentar la cantidad de proteínas virales de replicación E1 y E2, después de la regulación positiva del promotor del VPH “tardío” o “dependiente de diferenciación” [51, 60]. En el VPH16, este promotor (P670) reside dentro del marco de lectura abierto de E7, cerca de la posición del nucleótido 670. Por lo tanto, mientras que el promotor temprano (P97 en VPH6) situado en el LCR puede controlar la expresión de los transcritos de E6 y E7 como el primero y segundo marcos de lectura abierta, parece que el promotor dependiente de la diferenciación (P670) está posicionada para regular positivamente la expresión de E1 y E2 durante la diferenciación para permitir la amplificación del genoma. La célula epitelial que permite la amplificación del genoma viral está sujeta a las señales de diferenciación y puede expresar marcadores tales como queratinas 1 y 10 (epitelios cutáneo) o 4 y 13 (mucosa) y al mismo tiempo expresar marcadores de entrada del ciclo celular, tales como MCM, Ki-67, PCNA, ciclina E y ciclina A. En el caso de los VPH de bajo riesgo, la amplificación del genoma comienza cuando en la célula infectada se reactiva el ciclo celular en las células epiteliales de los estratos medio a superior, en un estado similar a la fase S. Para los VPH de alto riesgo, este estado similar a la fase S marca las células neoplásicas del estrato superior, más que una región en la que se reinició el ciclo celular. La amplificación del genoma del VPH continúa a la par de que la célula “diferenciada” se mueve de la fase S a la fase G2, ya que ésta

ocurre principalmente durante G2 después de que la replicación del ADN celular se completó [17, 45, 61].

Además de las proteínas E1 y E2, se cree que las proteínas E4 y E5 contribuyen indirectamente a la amplificación del genoma viral mediante la modificación del entorno celular, ya que E5 está implicada en la formación de poros [62]. E5 es una proteína transmembranal con un extremo C-terminal citoplasmática [63]; se cree que posee la capacidad de formación de poros e interfiere con la apoptosis y el tráfico intracelular de vesículas endocíticas [64]. Se piensa que la proteína E5 también contribuye en la amplificación del genoma viral a través de su capacidad para estabilizar EGFR, para mejorar la señalización de EGF y la actividad MAP quinasa y para modular ERK 1/2 y p38 independientemente de EGFR [65].

MAP quinasas ERK 1/2 son moduladores críticos de la acumulación nuclear de E1 a través de su fosforilación y activación de la señal de localización nuclear de la proteína E1; su actividad es dependiente de MAPKs río arriba a través de MEK 1/2 y p38. Durante las fases S y G2, la acumulación de las ciclinas A y E y su CDK2 quinasa asociada contribuyen aún más a la fosforilación y a la inhibición de la exportación nuclear de E1 [66]. E4 es una proteína viral que se acumula en niveles muy altos en las células que permiten la replicación viral, y es probable que su función principal sea la liberación del virus, con la amplificación indirecta del genoma [67]. Para VPH16, las funciones de E4 relacionadas con la detención del crecimiento celular contribuyen al éxito de la amplificación viral.

La finalización del ciclo de vida del VPH implica en última instancia, la expresión de la proteína menor de la cubierta L2, la salida de la célula del ciclo celular, y la expresión de la proteína principal de la cubierta L1 para permitir el ensamblaje del virus [17]. Esto requiere un cambio en el sitio de corte y empalme en lugar de activación del promotor, lo que lleva a la transcripción iniciada en P670 (para VPH16) y que termina en el sitio tardío de poliadenilación en lugar del sitio temprano, un evento que es favorecido por los niveles altos de expresión de E2 [51, 52]. Esto se traduce en un cambio en la síntesis de E1[^]E4 para permitir el ensamblaje del virus

[67]. La formación de la cápside del virus implica el reclutamiento de L2 a las regiones de replicación a través de E2, antes de la expresión de L1 y del ensamblaje de la cápside icosaédrica en el núcleo. La maduración del virus se produce en los queratinocitos más superficiales, que han perdido la fosforilación oxidativa mitocondrial y se encuentran en un ambiente oxidativo junto antes de la liberación del virus. Esto permite la acumulación progresiva de enlaces disulfuro entre las proteínas L1, lo que lleva a la producción de viriones infecciosos extremadamente estables [68]. Las partículas ensambladas contienen 360 moléculas de L1 dispuestas en 72 capsómeros pentaméricos, con un número mucho más pequeño y variable de moléculas de L2, que puede formar capsómeros en uno de los ejes de simetría. Aunque no está definido con precisión, se cree que la abundante proteína E4 en esta etapa contribuye a la liberación del virión y la infectividad de las capas epiteliales superiores, ya que se une a las fibras amiloides que modifican la estructura de queratina y el ensamblaje normal de la capa córnea [67].

DESREGULACIÓN DEL CICLO DE VIDA Y PROGRESIÓN A CÁNCER

La expresión ordenada de los diferentes genes virales que conduce a la formación de partículas virales, se modifica cuando se presentan LIE asociadas al VPH. En la progresión de las lesiones a cáncer, se cree que los niveles de expresión de E6 y E7 aumenta conforme avanza la enfermedad, de LIEBG a LIEAG, y que estos cambios en la expresión génica se relacionan directamente con fenotipo neoplásico. En este contexto, las LIEBG típicamente conservan la capacidad de completar el ciclo de vida del VPH y producir partículas virales y tener un nivel de proliferación celular bajo en las células basales y parabasales [27]. El aumento en la expresión de E6 y E7 en las infecciones por VPH de alto riesgo conduce al fenotipo LIEAG y predispone a la célula, a la acumulación de cambios genéticos, que contribuyen cada vez más a la progresión del cáncer. De acuerdo con esta hipótesis, los niveles relativamente bajos de E6 y E7 presentes en LIEBG no ponen en peligro las funciones de las celulares infectadas suficientemente para facilitar la progresión del cáncer. La desregulación viral observada en LIEAG se cree que facilita la integración del episoma viral en el

cromosoma de la célula huésped y que puede desregular aún más la expresión de E6 y E7; genes que se denominan como oncogenes virales.

Aunque no está claro cómo la expresión de los genes virales puede llegar a estar desregulada en LIE iniciales, los estudios de seguimiento han demostrado que las LIEAG pueden ocurrir en mujeres jóvenes justo después de la infección [69, 70]. En estos casos, la expresión génica desregulada puede ser impulsado por cambios en la señalización celular, provocada por ejemplo, por cambios hormonales [28], o por modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN viral, y ambos puede depender de la naturaleza de la célula epitelial infectada [71]. El LCR del VPH16 contiene elementos de respuesta hormonal que pueden ser estimulados por los estrógenos, y hay evidencia de la cooperación entre los estrógenos y el VPH en el desarrollo de CC, tanto en los seres humanos como *in vitro* [28, 72]. En las LIE, se ha reportado de que el LCR está metilado de manera diferente de acuerdo con la gravedad de la lesión, lo que sugiere que los cambios epigenéticos también pueden regular la expresión génica [73] y por lo tanto la enfermedad. También se piensa que para VPH16, la proteína E7 puede inducir cambios epigenéticos que contribuyen a la modificación en la expresión génica celular [74].

Los sitios frágiles comunes (CFS, por sus siglas en inglés) en el genoma de la célula huésped son puntos en los que es más probable que ocurra la integración [75]. En general, la integración viral tiene la probabilidad de dar como resultado la interrupción de los genes virales que regulan la transcripción normal a través de LCR. El gen clave es E2, el cual es un factor de transcripción viral que normalmente regula a la expresión de E6/E7, mediante la unión a sitios de control en LCR. La mayoría de los CC contiene una o varias copias de VPH, integrado más o menos al azar en el cromosoma huésped. El sitio de integración viral con frecuencia se encuentran dentro de los genes reguladores E1 o E2. La integración y la pérdida de la regulación de E6/E7 pueden facilitar la persistencia de niveles altos de expresión de estos genes [3, 27] y la acumulación de alteraciones genéticas que eventualmente conducen al cáncer [2]. En los últimos años, ha habido mucho debate acerca de cual es el evento clave para la progresión de las LIE a cáncer, si es la integración viral al

cromosoma del huésped o la expresión no regulada de los genes virales o la inestabilidad del cromosoma del huésped que facilita la integración. En general, se piensa que la integración se produce en las LIEAG y que una vez que esto ocurre, la expresión ya desregulada de E6 y E7 puede aumentar aún más o bien mantenerse a un nivel constitutivo [25]. El CC puede surgir a partir de células que contienen al virus de forma episomal; alrededor del 30% de los casos de CC positivos a VPH16 se desarrolla de esta manera. El 70% de los CC positivos a VPH16 contienen secuencias del virus integrado, mientras que para el VPH18, el genoma viral siempre se encuentra integrado [76]. En ambos casos, es la expresión a largo plazo y, en particular, la sobreexpresión de E6 y E7 y la acumulación de alteraciones en el genoma, las que en conjunto llevan a la progresión de las LIE a CC.

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 Y SUS VARIANTES

El VPH16 es el VPH oncogénico más frecuente en todo el mundo y la prevalencia de los diferentes subtipos difiere a través de ubicaciones geográficas específicas [77, 78]. El estudio de la variabilidad genética de los VPH comenzó con el análisis del tipo 16, debido al aumento de riesgo que éste presenta para desarrollar CC.

El genoma de VPH16 utilizado como referencia se secuenció por primera vez por Seedorf [79]. El primer estudio de linajes de VPH16 utilizando la región LCR se realizó en 1993 por Ho, quien reportó 4 subtipos principales [80]: el Europeo (E), el Asiático-Americano (AA), y los Africanos 1 (Af1) y 2 (Af2). Posteriormente se propusieron variantes dentro del subtipo Europeo, diferenciando el prototipo Europeo (E-P) y el Europeo de Asia (Ea), debido a una pequeña diferencia (0.5-1%) en las secuencias. Sus nombres se derivan de la procedencia geográfica de las poblaciones en las que son más frecuentes [80]. Considerando esta distribución geográfica, se ha reportado que el subtipo E predomina en las poblaciones europeas y americanas; los Af-1 y Af-2 predominan en África, (rama emergente del linaje europeo), el Asiático (As) predomina en las zonas del sur de Asia y el AA en Europa Central y América del Sur. La distribución geográfica de los tipos y subtipos de

VPH16 puede estar influenciada por varios factores, incluyendo la coevolución del VPH con los seres humanos, los patrones de migración humana y propiedades virales como la transmisibilidad [78].

Numerosos estudios han demostrado también que los subtipos específicos pueden influir en la persistencia de la infección por el VPH16 y la progresión de lesiones precursoras del CC [81]. Los subtipos de VPH16 también pueden afectar el ensamblaje del virus, la respuesta inmunológica, la patogenicidad, la degradación de p53, la actividad de la inmortalización y la regulación de la transcripción. L1 codifica la proteína estructural principal de las partículas virales que se expresa en las etapas finales de la producción viral [33] y las diferencias en sus secuencias de nucleótidos podría estar vinculado a los cambios en la respuesta inmune del huésped [29]. E6 y E7 son las principales oncoproteínas y están involucrados en la tumorigénesis. LCR se ha demostrado que es la región más variable de VPH16 y contiene el promotor temprano y elementos reguladores implicados en la replicación del ADN viral y la transcripción [78]. Varios autores han evaluado la asociación de mutaciones VPH16 específicos con la persistencia viral y el desarrollo de lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales [82].

DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y LA EDAD

El VPH16 es el tipo viral más frecuente en todo el mundo, se encuentra en aproximadamente 50% de los casos de CC, seguido del VPH18, VPH45 y VPH31 [16]. La prevalencia de VPH en las mujeres sanas varía con la edad [15]. En la mayoría de los estudios, el pico más alto se observa en las mujeres jóvenes (<25 años), seguido de una disminución en la frecuencia relacionada inversamente con la edad. En contraste, la distribución del CC sigue una curva normal, con un pico máximo alrededor de los 50 años de edad. Por lo tanto, la mitad de los casos de CC se diagnostican en mujeres jóvenes pre-menopáusicas y la otra mitad en mujeres pos-menopáusicas [83]. Se ha reportado que la mayoría de los casos de CC se desarrollan 15 a 20 años después de la infección inicial por el VPH [84]. De acuerdo

con la distribución de frecuencias del VPH en las mujeres sanas, este período de latencia podría explicar la mayor parte de los casos de CC en las mujeres jóvenes y de mediana edad, pero no los casos en las mujeres mayores de 50 años [85]. Estos datos sugieren que los eventos de carcinogénesis en las pacientes de mayor edad podrían ser diferentes que en las pacientes jóvenes. La edad promedio de las pacientes con CC positivo para los tipos virales 16, 18 o 45 es inferior a la edad promedio de las pacientes infectados con otros VPH [81, 86, 87]. Poco se sabe de la prevalencia y la tendencia de los VPH en los diferentes grupos de edad en las mujeres con CC.

COFACTORES EN LA CARCINIGÉNESIS VIRAL

Actualmente está bien establecido que la infección con tipos de VPH de alto riesgo es la causa necesaria para el desarrollo del CC y las LIEAG. Sin embargo, la infección por sí sola no es suficiente y existen otros factores exógenos o endógenos que, en conjunción con el VPH, influyen en el riesgo de progresión de la infección por VPH cervical a CC.

Los cofactores candidatos se han clasificados en tres grupos: 1) cofactores ambientales o exógenos, incluyendo el uso de anticonceptivos orales, el consumo de tabaco, la dieta, el trauma cervical, y la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otros agentes de transmisión sexual; 2) cofactores virales, como la infección por tipos específicos, la coinfección con otros tipos, variantes de VPH, la carga viral y la integración viral; y 3) cofactores del huésped o endógenos, incluidas las hormonas endógenas, factores genéticos, tales como el antígeno leucocitario humano, y otros factores relacionados con la respuesta inmune del huésped.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA CÁNCER CERVICAL

En las últimas tres décadas, la incidencia de CC ha sido cada vez menor en los países desarrollados, debido a la introducción de los programas nacionales de detección oportuna de CC. Por el contrario, en los países en vías de desarrollo, debido a la falta de programas efectivos de pesquisa, el CC sigue siendo un grave problema de salud en las mujeres [88]. La prueba de Papanicolaou convencional o la citología exfoliativa en base líquida son los métodos más utilizados para la detección oportuna del CC, y se basan en el análisis morfológico de las células exfoliadas del cuello del útero. La efectividad de estos métodos de detección depende en gran medida de la formación del personal. De hecho, en los países en donde la prueba de Papanicolaou no se aplica correctamente como método de pesquisa, puede con frecuencia llevar a un mal diagnóstico [89].

Diferentes estudios han demostrado que la detección de ADN del VPH, que se utiliza como tamizaje primario, tiene una mayor sensibilidad y valor predictivo negativo para la detección de la infección por VPH [90]. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado a que población se está estudiando, ya que esta prueba no determina la presencia o ausencia de LIE. El valor predictivo negativo para la detección de ADN de VPH combinada con las pruebas de citología es muy alta, lo que es de particular interés para la rentabilidad de diagnóstico oportuno de CC. El método de tipificación de VPH no basado en PCR (por sus siglas en inglés, reacción en cadena de la polimerasa) más ampliamente utilizado en estudios clínicos y epidemiológicos es el ensayo comercial de hibridación “Captura Híbrida 2” (HC2, por sus siglas en inglés; Digene) que puede detectar 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 68) y cinco de VPH de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, y 44) [91]. Sin embargo, este método sólo puede detectar la presencia de infección por VPH, sin revelar el tipo de VPH. Otros ensayos adicionales que se han desarrollado y comercializado que puede identificar los tipos de VPH presentes en las muestras cervicales son, por ejemplo, LINEAR ARRAY HPV Genotyping (Roche Molecular Diagnostics) e INNO-LIPA HPV Genotyping (Innogenetics). Una limitación de los métodos de detección del VPH es su bajo valor predictivo positivo, al no ser capaz de discriminar entre las infecciones por VPH con alteraciones morfológicas y las que no [90]. De hecho las infecciones por VPH se pueden encontrar a menudo en mujeres

jóvenes. Sin embargo, en la mayoría de los casos estas infecciones no son persistentes y se eliminarán de forma natural por el sistema inmune sin provocar lesiones cervicales [46].

Debido a esta restricción de los ensayos de detección de la infección por VPH, la interpretación de los datos de “VPH-positivo” requiere una atención particular y nuevos análisis. Ahora está claro que los marcadores adicionales necesitan ser considerados para mejorar el valor predictivo positivo de los ensayos de detección de VPH [92]. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para corroborar los hallazgos iniciales y desarrollar estrategias que se pueden adoptar en los procedimientos clínicos de rutina.

VACUNAS CONTRA EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

Actualmente existen tres vacunas comercializadas contra el VPH y aprobadas por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos: Cervarix (GlaxoSmithKline, Londres, Reino Unido) y Gardasil (Merck & Company, Kenilworth, NJ) bivalente y 9-valente. Estas vacunas protegen contra los tipos de VPH responsables de la mayoría de los casos de cánceres asociados al VPH y contra la mayoría de los tipos asociados a verrugas genitales.

La Sociedad Americana del Cáncer (ACS, por sus siglas en inglés), el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC, por sus siglas en inglés) y los proveedores recomiendan tres dosis en niños de 11 a 12 años [93]. Sin embargo, se calcula que puede tomar 30 años para observar los beneficios deseados de la vacunación en toda la población. Las mujeres mayores de 25 años continuarán siendo un grupo vulnerable a nuevas infecciones por el VPH y a desarrollar LIEAG y CC.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El CC es una causa importante de mortalidad en las mujeres a nivel mundial a pesar de ser la neoplasia con el mayor potencial demostrado de prevención secundaria. Esta enfermedad es totalmente prevenible y curable en etapas tempranas de detección. A pesar de los esfuerzos realizados en nuestro país para promover las campañas de información y detección, las tasas de incidencia y mortalidad no disminuyen de manera considerable. La investigación científica juega un papel muy importante para tratar de explicar la oncogenicidad de los tipos virales que afectan a nuestra población y en la comprensión de los procesos mediante los cuáles las mujeres infectadas por ciertos VPH evolucionan hasta CC.

Si el inicio de vida sexual activa en promedio en México es a los 18 años y la historia natural de la enfermedad indica que la edad promedio del diagnóstico de CC es a los 45 años, qué fenómeno ocurre en las mujeres mayores de 60 años, en quienes ya transcurrieron 40 años o más posterior al inicio de vida sexual. Como ya se mencionó, la edad promedio de las pacientes con CC positivo para los tipos virales más oncogénicos (VPH16, 18 o 45) es inferior a la edad promedio de las pacientes infectadas con otros VPH y poco se sabe de la prevalencia y la tendencia de los VPH en los diferentes grupos de edad en las mujeres con CC. Quizás los eventos de carcinogénesis en las mujeres jóvenes es diferente a los eventos en mujeres de mayor edad.

La incidencia mundial de cáncer en relación a la edad, tiene un aumento exponencial. El modelo de Gorbunova (2007) [94] explica que el cáncer es un círculo vicioso entre la edad y la inestabilidad del genoma, con acumulación de mutaciones, desregulación de la transcripción y disminución de la reparación del ADN.

La distribución de la frecuencia por edad de las mujeres con cáncer cervicouterino, podemos dividirla en tres grupos. En el primer grupo (≤ 40 años), los factores virales, como tipos y variantes, podrían tener mayor importancia que otros factores, mientras que en el tercer grupo (≥ 61 años), el factor daño genómico relacionado con la edad

es quizás más importante que el viral; el segundo grupo (41 a 60 años) es la mayor parte de la población donde los virus más frecuentes actúan.

Entonces, ¿el cáncer en mujeres jóvenes y en mujeres de mayor edad está asociado a factores virales diferentes?

HIPÓTESIS

En las mujeres menores de 40 años, además de los factores genómicos individuales de susceptibilidad de cáncer, los factores virales son los principales factores para el desarrollo del cáncer cervicouterino, mientras que en las mujeres de la tercera edad es el daño genómicos en las células del epitelio cervical el más importante.

OBJETIVO GENERAL

Identificar los factores virales y factores de estilo de vida asociados al cáncer de cérvix en mujeres jóvenes y en mujeres de la tercera edad.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- A. Determinar las características de los factores etiológicos del cáncer cervicouterino en nuestra población:
 - I. Factor viral: tipo y variantes.
 - II. Factores de estilo de vida: edad de inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales, estado civil, número de hijos, edad de primer embarazo, uso

de anticonceptivos, tabaquismo, asistencia al programa de diagnóstico oportuno de CC.

B. Realizar un estudio de casos y controles:

- I. Determinar la relación de los factores virales y estilos de vida para el desarrollo de cáncer cervicouterino en nuestra población agrupada por edad.
- II. Determinar el riesgo de cada uno de ellos para desarrollar cáncer cervicouterino a edad temprana o tardía.

MATERIAL Y MÉTODO

APROBACIÓN DEL PROTOCOLO

El protocolo de estudio fue aprobado por los Comités de Investigación y de Ética del Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga” (número de aprobación DIC / 03/311/04/051) y fue realizado de acuerdo con los principios éticos descritos en la Declaración de Helsinki 1964. El consentimiento informado, se obtuvo de todos los participantes antes de su inclusión en el estudio.

SELECCIÓN DE LAS PACIENTES

El estudio incluyó 462 pacientes con diagnóstico de CC que acudieron al Servicio de Oncología y 462 mujeres con epitelio cervical normal (controles) que acudieron al Servicio de Medicina Preventiva y al Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga”, en la Ciudad de México.

Las muestras de CC fueron un grupo seleccionado de un total de 503 pacientes con CC que fueron reclutadas con los siguientes criterios de inclusión: diagnóstico clínico

de CC invasivo, sin tratamiento previo, con nacimiento y residencia en México, y con una ascendencia mexicana de dos generaciones. Las pacientes fueron reclutadas durante los períodos comprendidos entre noviembre 2003 a abril de 2005 y enero de 2006 a julio de 2007, y representaron el 80% de los pacientes con diagnóstico de CC durante este período. Los criterios de selección para el grupo de CC se basaron en la confirmación del diagnóstico de CC en el estudio histopatológico por tres oncopatólogos, la disponibilidad de ADN de alta calidad extraído de la biopsia del tumor fresco, con más del 70% las células tumorales en el análisis morfológico y que tuvieran más del 90% de los datos en el cuestionario clínico. Cuarenta y dos pacientes fueron excluidas debido a mala calidad en el ADN de la muestra o porque se confirmó una LIEAG en la biopsia. Los casos de CC se clasificaron de acuerdo a los criterios clínicos establecidos por la Federación Internacional de Ginecología Obstetricia (FIGO) [95]. Dos biopsias fueron tomadas de los tumores durante los exámenes de colposcopia. Una muestra se fijó en formalina tamponada para el análisis morfológico, procesada de forma convencional y teñida con hematoxilina y eosina. La segunda muestra fue congelada con hielo seco inmediatamente después de obtenerla y almacenada a -80° C hasta su análisis.

Las muestras de cérvix sano fueron reclutadas durante los mismos períodos y con los criterios de inclusión de diagnóstico citológico negativo de LIE, con nacimiento y residencia en México, y con una ascendencia mexicana de dos generaciones. De un total de 713 mujeres se seleccionaron 462 pareadas individualmente por la edad (± 3 años) de las mujeres con CC. A estas mujeres se le tomaron dos muestras cervicales de citología exfoliativa. Una fue procesada de forma convencional para su análisis con Papanicolaou y la segunda se colocó en solución de extracción (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS) y se almacenó a -20° C hasta su análisis.

Las mujeres incluidas en este estudio fueron comparables a las excluidas (edad, etnia y factores del estilo de vida; tipo histológico del tumor y estadio clínico de la enfermedad en los casos). La tasa de participación de las mujeres sanas y con cáncer fue cercana al 95% [96].

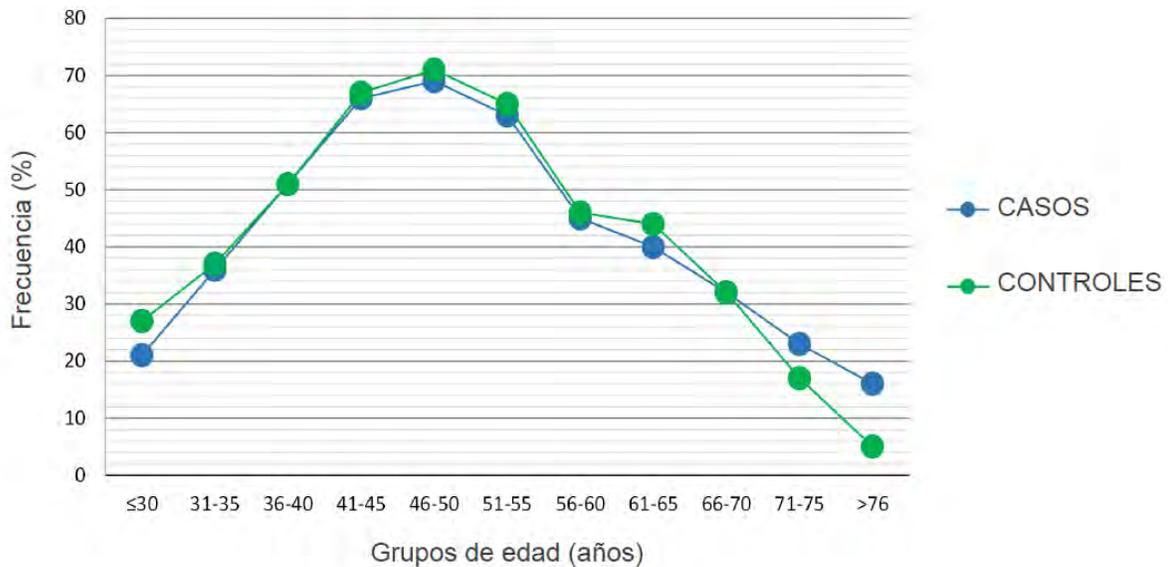


FIGURA 4. Distribución de los casos y controles pareados por edad.

La gráfica muestra la distribución de la frecuencia relativa de la edad de los casos (n = 462) y de los controles (n = 462) incluidos en el análisis en intervalos de 5 años.

EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN se obtuvo a partir de una biopsia de CC y de citología exfoliativa de cérvix normal. Se realizó con el kit Qiagen DNeasy®, el cual se basa en la cromatografía de adsorción cuyo fundamento es la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. Cuando el ADN está en una solución acuosa, se encuentra cubierto de una capa de moléculas de agua que mantienen su solubilidad en esta solución. Al adicionar iones caotrópicos al ADN, se destruye esta capa de moléculas de agua, por lo que las sales crean un entorno hidrofóbico alrededor de ADN. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, el ADN se une a la membrana de sílica gel de las columnas, mientras que las proteínas y otros contaminantes no se unen y son eliminados de las muestras durante el lavado y la centrifugación. Posteriormente, el ADN se eluye de la membrana mediante soluciones tampón de elución con bajas concentraciones de sales (ligeramente alcalinos), que permiten recuperar la capa hidrofóbica alrededor del ADN, liberándolo de la membrana.

El primer paso se realiza con proteinasa K, enzima proteolítica, y la solución AL que ayudan a lisar la membrana celular permitiendo la salida del material genético.

Posteriormente se adiciona una solución con alta concentración de sales caotrópicas (AW1), principalmente cloruro de guanidina, que permite la unión de ADN a la membrana de sílica. Los lavados se realizan con la solución AW2, compuesta principalmente por ázida de sodio a bajas concentraciones. La elusión del ADN se realiza con la solución AE (pH 8.0) que contiene Tris-EDTA, que arrastra al ADN de la membrana para colectarlo purificado.

DETECCIÓN DEL VPH Y VARIANTES DE VPH16 POR PCR

El fundamento de la PCR es la complementariedad de bases de ADN y los 3 cambios de temperatura: 1) temperatura de desnaturalización de la doble hebra, 2) temperatura de hibridación de los oligonucleótidos y 3) temperatura de polimerización de la elongación de la cadena.

En cada ciclo se duplica la cantidad de ADN sintetizado. Cada nuevo fragmento sirve como templado para la siguiente cadena y, luego de varios ciclos, el producto predominante es el fragmento de ADN del tamaño correspondiente a la distancia entre el par de iniciadores.

Para llevar a cabo la reacción, se requiere diseñar un par de iniciadores o cebadores, pequeños fragmentos de ADN (15-25 pb) que proporcionan un extremo 3'-OH libre para que la enzima Taq polimerasa pueda elongar la cadena colocando los dideoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) correspondientes; MgCl₂ como cofactor de la enzima y una solución amortiguadora para controlar el pH y la fuerza iónica durante la reacción.

Para la tipificación de VPH se amplificaron 3 regiones localizadas en el gen L1 del virus, denominadas L1C1, My y GP con oligonucleótidos previamente reportados [96, 97], además de la región β -globina como control de calidad de la muestra. La mezcla de reacción para la región β -globina se preparó con una concentración final de 25mM de solución amortiguadora, 2.0mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTP's, 1 μ M de cada iniciador, 0.5U de enzima Taq polimerasa y 500ng de ADN en un volumen total de

25µl. Para las regiones del virus sólo cambio la concentración de MgCl₂ (2.0mM para MY, 3.0mM para L1C1 y 3.5mM para GP) y 1U de enzima para la región GP.

Oligo	Secuencia	Localización	Región	Tamaño (pb)
P13	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAG-3'	5203130 <i>forward</i>	β-globina	230
P14	5'-CCACTTGACCTACTTCAAC-3'	5203360 <i>reverse</i>		
MY/11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	6582 <i>forward</i>	MY	451
MY/09	5'-CTAGTCAWAGGRRAMCCTGC-3'	7033 <i>reverse</i>		
GP5+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC-3'	6624 <i>forward</i>	GP	141
GP6+	5'-CTYATACTAAATGTCAAATAAAAAG-3'	6765 <i>reverse</i>		
L1	5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT-3'	5609 <i>forward</i>	L1	252
L2	5'-GTTATGTCTCATAAATCCCAT-3'	5861 <i>reverse</i>		

Como control positivo experimental se utilizó una mezcla de muestras ya tipificadas de VPH16 y como control negativo experimental PBS en lugar de ADN.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de ADN (Gene Amp PCR System 9700; Applied Biosystems, Carlsbad, CA) con el siguiente ciclaje:

β-globina y MY	GP	L1C1
94°C – 2:30min	94°C – 5:0min	94°C – 2:30min
40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos
94°C – 0:30min	94°C – 1:00min	94°C – 0:30min
55°C – 0:30min	40°C – 2:00min	45°C – 0:30min
72°C – 0:30min	72°C – 1:30min	72°C – 0:30min
72°C – 5:00min	72°C – 4:00min	72°C – 5:00min

Los fragmentos de ADN obtenidos de la PCR se visualizaron por medio de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y revelado con luz ultravioleta, utilizando el marcador de peso molecular de 1Kb plus de InvitrogenMR. Se cuantificó el ADN utilizando espectrofotómetro a A260 y se evaluó su calidad por la relación A260/A280 mayor de 1.7.

Para confirmar el tipo HPV18 y determinar las variantes del VPH16 se amplificaron 3 regiones utilizaron los siguientes oligos:

Oligo	Secuencia	Localización	Región	Tamaño (pb)
F478	5'-CGACGATTTCAACAACATAGC-3'	478 <i>forward</i>	E6/E7 HPV18	318
R796	5'-TCACACTTACAACACATACAC-3'	796 <i>reverse</i>		
F83	5'-ATGCACCAAAAGAGACTGC-3'	83 <i>forward</i>	E6/E7 HPV16	775
R858	5'-TTATTGTTTCTGAGAACAG-3'	858 <i>reverse</i>		
FMY	5'-GCACAGGGCCACAATAATGG-3'	6584 <i>forward</i>	L1 (MY)	451
RMY	5'-CGTCCTAAAGGAACTGATC-3'	7035 <i>reverse</i>		
FLCR	5'-TATTTTGGAGGACTGGAATTTT-3'	6829 <i>forward</i>	LCR	1188
RLCR	5'-TCTGTGCATAACTGTGGTAACTTTCTG-3'	156 <i>reverse</i>		

Se utilizaron 500 ng de ADN de la muestra para obtener un volumen final de 25µl que contenía 20 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgCl₂, 50 mM de KCl, 1 mM de DTT, 200 mM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP y 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Camarillo, CA, EE.UU.). El termociclador se programó con los parámetros utilizados para β-globina y MY.

SECUENCIACIÓN Y TIPIFICACIÓN

La secuenciación automatizada se basa en el uso de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) marcados con diferentes fluoróforos. Las reacciones de síntesis de cada base se realiza en un mismo tubo y los productos se separan por tamaño a lo largo de una electroforesis capilar. Un láser lee y registra la señal de cada dideoxinucleótido marcado con su fluoróforo correspondiente como picos alternantes, y finalmente una computadora guarda la información de la secuencia nucleotídica y del electroferograma obtenido.

Los tipos de VPH y las variantes de VPH16 fueron identificados utilizando el analizador genético ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) y el kit comercial BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Las secuencias de las muestras positivas se analizaron con el programa SeqScape (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), la herramienta de alineamiento ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y el programa de similitud de secuencia FASTA [98, 99], el cual calcula el porcentaje de similitud de las secuencias

exploradas con las secuencia reportadas de los VPHs. El porcentaje de identidad promedio de estas secuencia para los tipos de VPH fue del 98.7% (91-100%).

Las secuencias obtenidas de las tres regiones de VPH16 se alinearon con las siguientes secuencias de referencia de las variantes específicas: NC_001526.4 [secuencia de referencia (7906 pb), sublinaje A1], AF536179 (sublinaje A2), AY686579 (sublinaje D2) y AF402678 (sublinaje D3). La identificación de los sublinaje de VPH16 se basó en la variante de un solo nucleótido (SNV, por sus siglas en inglés) de las posiciones propuestas por Yamada [100] y Burk [101]. Para la determinación de las variantes D utilizamos los SNV diagnósticos en LCR, posiciones 7507 y 7743 [78], y en MY, posiciones 6803 y 6862 [100]. La reproducibilidad de los ensayos de VPH16 fue del 99.2% y la identidad de sus variantes fue del 97.6% (91-100%).

Cuando se identificaron diferentes tipos virales con los oligos universales y específicos, esas muestras fueron consideradas con doble infección.

CUESTIONARIO DE DATOS CLÍNICOS

Se aplicó un cuestionario cerrado con respuestas cualitativas, dicotómicas y politómicas, y cuantitativas, para poder obtener los siguientes datos de las pacientes incluidas en el estudio: edad al momento del diagnóstico, edad de inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales, estado civil, número de hijos, edad en el primer embarazo, uso de anticonceptivos orales, consumo de tabaco y asistencia al programa de diagnóstico oportuno de cáncer cervical. Cada una de estas variables se dividió en dos grupos, de acuerdo al riesgo reportado en CC. La variable de menor riesgo se utilizó como referencia (asterisco en las Tablas 3, 4 y 5).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar la edad de las paciente se utilizó la mediana y el rango intercuartil (RIQ = 25-75%), y la prueba U de Mann-Whitney para evaluar la significancia estadística

entre los grupos. El análisis de frecuencia de los VPH y variantes de VPH16 y los factores de estilo de vida entre grupos se hizo mediante la prueba de chi-cuadrada de Pearson o la prueba exacta de Fisher. La frecuencia de los tipos de VPH y variantes de VPH16 por edad de las pacientes se analizó considerando intervalos de edad y la tendencia resultante se comparó mediante la correlación de Spearman o prueba de tendencias Cochran-Armitage. Para investigar si los tipos de VPH y variantes de VPH16 y los factores de estilo de vida se asocian de forma independiente con la edad de presentación del CC, se utilizó un modelo de regresión logística (LRM, por sus siglas en inglés) con resultado dicotómico (grupos de edad) y las variables explicativas (tipos de VPH o variantes de VPH16 y los factores de estilo de vida). Para el análisis de los tipos de VPH se agruparon los tipos 16, 18, 45 y 39 y se consideraron la referencia de la variable explicativa para el diagnóstico tardío de CC; los otros VPH incluyen los casos positivos para otros VPH y los casos negativos. Para el análisis de las variantes de VPH16, los casos VPH16 negativos se consideraron la referencia de la variable explicativa, que incluyeron las muestras negativas y las muestras positivas para otros VPH distintos del tipo 16. La asociación se expresó como razón de riesgo (OR, por sus siglas en inglés) y el intervalo de confianza (IC) del 95%. La diferencia se consideró estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.05$. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando los programas Sigma Plot (Systat Software, Inc., San José, CA, EE.UU.) o SPSS ver. 20 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

RESULTADOS

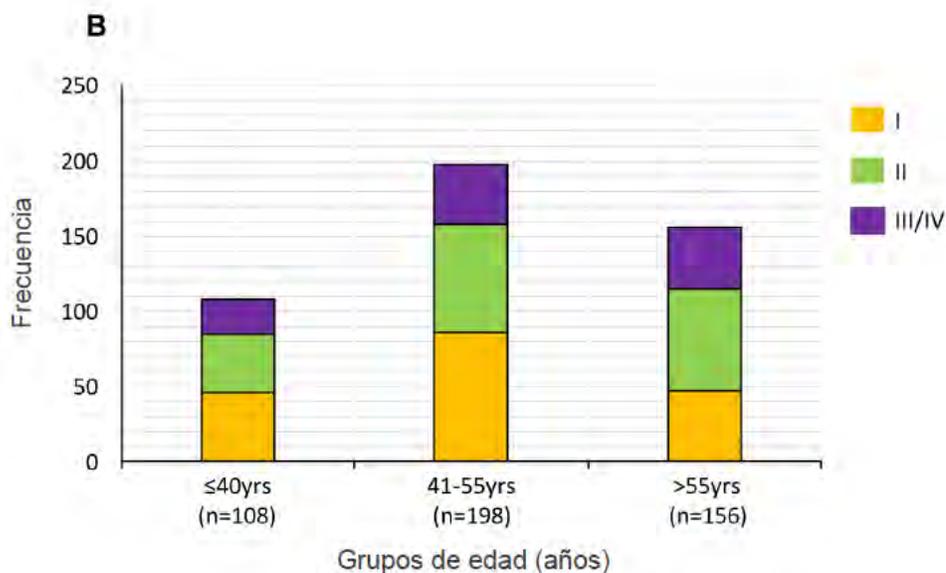
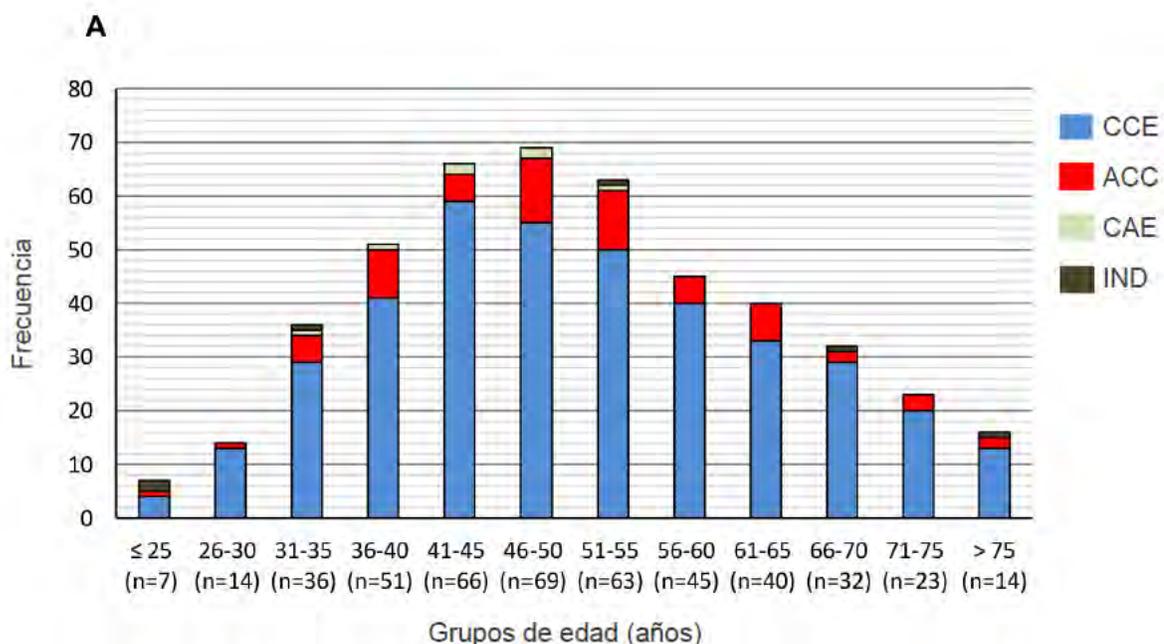
DESCRIPCIÓN DE LA EDAD DE LAS PACIENTES CON CC.

La edad de las pacientes con CC ($n = 462$) varió ampliamente, con una mediana de 49 años (RIQ 41–60). La distribución de la frecuencia en intervalos de 5 años mostró un pico en el intervalos de 46-50 años, sin un distribución normal sesgada

ligeramente a la derecha (Figura 5A). La mayoría de los casos se concentraron entre los intervalos 41 a 55 años (n = 198, 42.9%), 108 casos (23.4%) en los intervalos

FIGURA 5. Distribución por edad de las pacientes con CC.

Distribución de la frecuencia (n) por edad de las pacientes con CC (n = 462) dividido en intervalos de 5 años de acuerdo al tipo histológico (A). La frecuencia de la edad de las pacientes con CC se dividió en tres grupos: ≤ 40 años, 41-55 años y > 50 años, de acuerdo al estadio FIGO (B). Cáncer cervicouterino epidermoide (CCE), adenocarcinoma (ACC), carcinoma adenoescamoso (CAE), carcinoma indiferenciado (IND).



inferiores (≤ 40 años) y 156 casos (33.8%) en los intervalos superiores (≥ 56 años). Aunque la mediana edad de las pacientes con CCE ($n = 386$) y ACC ($n = 63$) fue casi la misma (49 y 49.5 años, respectivamente), las pacientes con CCE alcanzaron un pico antes que las pacientes con ACC (41-45 vs. 46-50 años). Al considerar el estadio FIGO, se observó mayor frecuencia de II y III / IV en las mujeres de mayor edad que en las jóvenes (Figura 5B). La distribución de la edad de las mujeres sanas fue muy similar que la de los casos (mediana 49 años, RIQ 41-58) al tratarse de una muestra pareada.

FRECUENCIA DE LOS TIPOS DE VPH EN CC Y EN CÉRVIX SANO.

De los 462 casos analizados de CC, 455 (98.4%) fueron positivos para al menos un

TABLA 1. Frecuencia de las infecciones por VPH simples y dobles en pacientes con CC ($n = 462$) y en mujeres sanas ($n = 462$).

Tipo de VPH	Frecuencia: n (%)			
	Casos			Controles
	Infección simple	Infección doble	Total	Total
VPH16	214 (46.3)	21 (4.5)	235 (50.9)	19 (4.1)
VPH18	48 (10.4)	14 (3.0)	62 (13.4)	3 (0.6)
VPH45	31 (6.7)	2 (0.4)	33 (7.1)	3 (0.6)
VPH31	19 (4.1)	3 (0.6)	22 (4.8)	12 (2.6)
VPH58	13 (2.8)	3 (0.6)	16 (3.5)	3 (0.6)
VPH59	15 (3.2)	1 (0.2)	16 (3.5)	1 (0.2)
VPH33	13 (2.8)	1 (0.2)	14 (3.0)	0
VPH51	12 (2.6)	1 (0.2)	13 (2.8)	1 (0.2)
VPH56	8 (1.7)	1 (0.2)	9 (1.9)	1 (0.2)
VPH52	7 (1.5)	1 (0.2)	8 (1.7)	0
VPH6	1 (0.2)	5 (1.1)	6 (1.3)	2 (0.4)
VPH53	3 (0.6)	2 (0.4)	5 (1.1)	2 (0.4)
VPH69	3 (0.6)	2 (0.4)	5 (1.1)	0
VPH35	5 (1.1)	0	5 (1.1)	0
VPH39	5 (1.1)	0	5 (1.1)	0
VPH11	5 (1.1)	0	5 (1.1)	3 (0.6)
Otros VPH ^a	16 (3.4)	18 (3.9)	34 (7.3)	22 (4.8)
Negativos			7 (1.5)	390 (84.4)
Todos	417 (90.3)	38 (8.2)	455 (98.5)	72 (15.6)

a. Incluye los tipos VPH 68, 51-like, 66, 26, 39-like, 42, 61, 70, 73, 82, 82-like.

VPH, 417 (90.3%) tenían infección simple y 38 (8.2%) tenían infección múltiple. VPH16 fue el tipo más frecuente (50.9%) tanto en infecciones simples como dobles, seguido en orden decreciente por VPH18 (13.4%), VPH45 (7.1%), VPH31 (4.8%), VPH58 (3.5%), VPH 59 (3.5%), VPH33 (3.0%), VPH51 (2.8) y otros VPH con una frecuencia menor del 2% (Tabla 1). Once mujeres con CC (2.3%) tenían infección simple por un virus de bajo riesgo, incluyendo VPH6 (n = 1), VPH11 (n = 5), VPH42 (n = 1), VPH61 (n = 1) y VPH69 (n = 3).

Sólo 15.6% (n = 72) de la mujeres sanas tuvieron infección por VPH, como infección simple. También HPV16 fue el más frecuente (4.1%), seguido de VPH31 (2.6%); la frecuencia del resto de los tipos de VPH fue menor del 1%.

Se identificaron tres grupos de pacientes con doble infección por VPH. El primer grupo tenía infección por dos de los tres tipos de VPH más frecuentes, 16, 18 o 45. El segundo grupo tenían infección por VPH16, 18 o 45, además de otros VPH. El tercer grupo infección por otros VPH diferentes a 16, 18 y 45 (Tabla 2) que incluye al menos uno de alto riesgo. La frecuencia acumulada de los virus relacionados con la vacuna tetravalente (VPH16, 18, 31 y 45), incluyendo infección simple y doble, fue del 74% (342/462).

ANÁLISIS DE LOS TIPOS DE VPH POR EDAD

La mediana de la edad de las pacientes con CC infectadas por al menos un VPH fue de 49 años (RIQ 41-60). Se observó variación en la edad de las pacientes según el tipo viral (Tabla 2), siendo más jóvenes las pacientes infectadas por VPH 39 (43 años, RIQ 40-50) y de mayor edad las pacientes infectadas por VPH 52 (60 años, RIQ 49-62). Aunque las pacientes infectadas por VPH16 (47 años, RIQ 39-58), VPH18 (47 años, RIQ 40-57.5) y VPH45 (47 años, RIQ 40-55) fueron más jóvenes que las infectadas por VPH 31 (51 años, RIQ 44.5-58.5), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$, prueba U de Mann-Whitney). Sin embargo, cuando la edad de las pacientes infectadas por VPH16, 18, 45 y 39 (n = 298) fue

TABLA 2. Mediana de la edad de las pacientes con CC y el tipo de VPH (n = 462).

Tipo de VPH	Mediana (RIQ; n) ^a
Infección simple	
VPH16	47 (39-58; 214)
VPH18	47 (40-57.5; 48)
VPH45	47 (40-55; 31)
VPH31	51 (44.5-58.5; 19)
VPH59	53 (45-62; 15)
VPH58	55 (49-63; 13)
VPH51	53 (45-60; 12)
VPH33	56 (45-69; 13)
VPH56	57 (46-70.5; 8)
VPH52	60 (49-62; 7)
VPH35	44 (41.5-49.5; 5)
VPH11	43 (36.5-56; 5)
VPH39	43 (40-50; 5)
Otros VPH ^b	55 (45.5-65; 22)
Todos	49 (41-60; 417)
Doble infección	
Dos de cualquiera VPH16, 18 o 45	46 (43-52; 9)
Cualquiera VPH16, 18 o 45 más otro VPH	54.5 (48-65; 20)
Otros VPH diferente a 16, 18 o 45	66 (59.5-74; 9)
Todos	54.5 (48-66; 38)
Negativos	55 (41-65; 7)

a. RIQ = rango intercuartil (25-75%).

b. Otros VPH incluyen 6, 26, 39-like, 42, 51-like, 53, 61, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 82-like.
La mediana del total de casos fue de 49 (41-60; 462)

comparada contra la edad de las pacientes infectadas con el resto de tipos virales (n = 109), con excepción de VPH11 y 35, la diferencia fue estadísticamente significativa (P 0.001, prueba U de Mann-Whitney).

La edad de las pacientes con doble infección (54.5 años, RIQ 48-66) fue mayor que la edad de las pacientes con infección simple (49 años, RIQ 41-60) y estadísticamente significativa (P 0.015, prueba U de Mann-Whitney).

La distribución de la frecuencia de los VPH se estudiaron en tres grupos en relación a la edad de presentación del CC (Figura 6): pacientes jóvenes (≤ 40 años), pacientes de mediana edad (41-55 años), y pacientes mayores (≥ 55 años). La frecuencia de los VPH 16, 18, 45 y 39 (Figura 6A) como infecciones simples disminuyó desde el grupo de pacientes jóvenes hasta el grupo de pacientes mayores; sólo la tendencia del

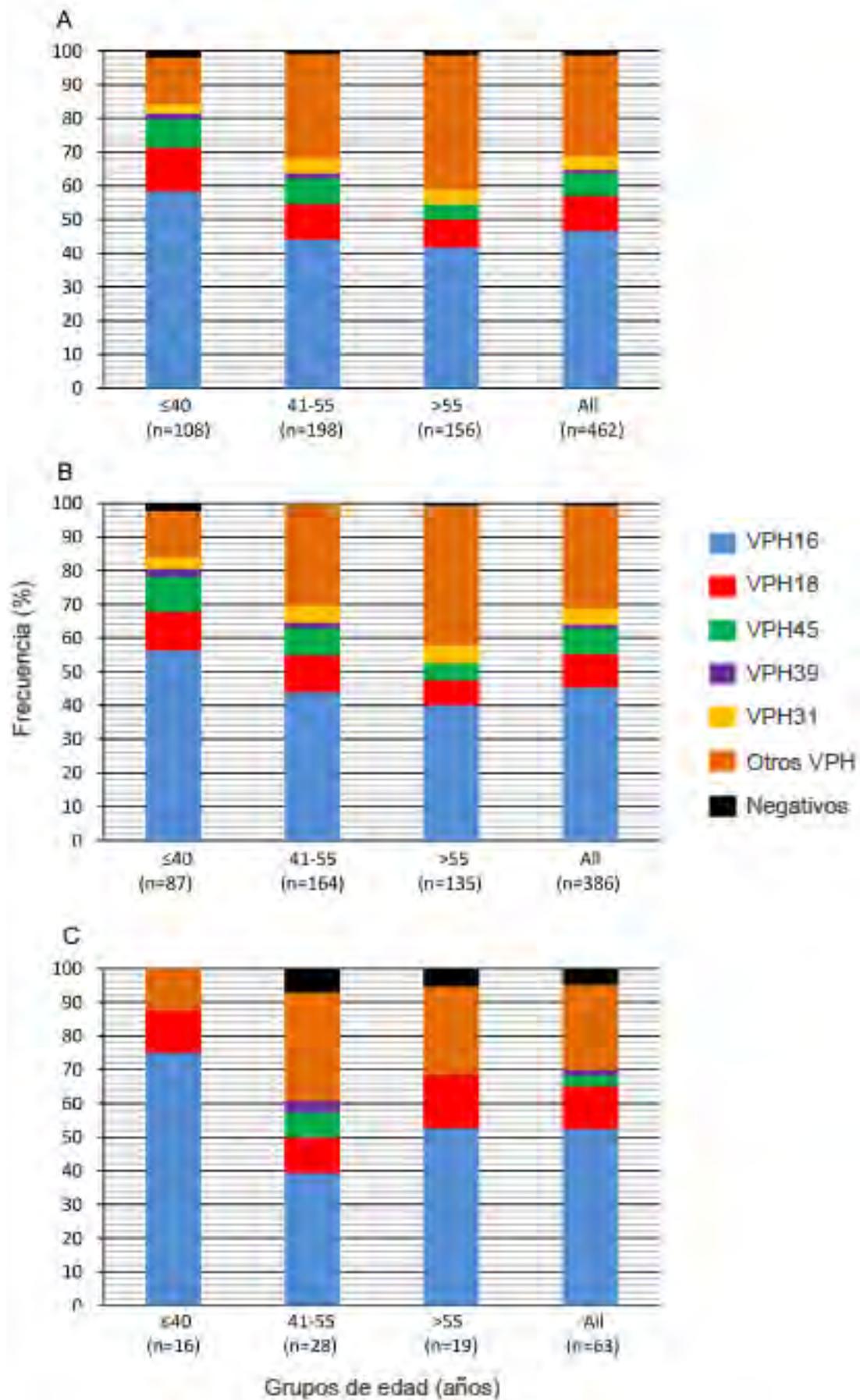
VPH16 fue estadísticamente significativa ($P = 0.01$, prueba de tendencia Cochran-Armitage). La frecuencia agrupada de VPH16, 18, 45 y 39 en las pacientes jóvenes fue de 81.5%, mientras que en las pacientes de mediana edad y mayores disminuyó 63.6% y 54.5% ($P = 0.0001$, prueba de tendencia Cochran-Armitage), respectivamente. Por el contrario, la frecuencia agrupada del resto de tipos de VPH aumentó desde las pacientes jóvenes (16.7%) a las pacientes de mayor edad (44.2%; $P = 0.0001$, prueba de tendencia Cochran-Armitage).

Para observar estas tendencias con más detalle, la distribución de la frecuencia del tipo viral en relación con la edad de presentación del CC fue analizada en intervalos de 5 años. (Figura 7). Para el VPH16 como infección simple, el pico máximo (63.2%) se encontró a los ≤ 35 años, con una disminución gradual hasta los 56 - 60 años (31.1%; $r = -0.899$, $P = 0.017$, correlación de Spearman), con un segundo pico (52.5%) a los 61-65 años, también con una disminución gradual posterior ($r = -0.68$, $P = 0.032$, correlación de Spearman). Por el contrario, la tendencia de la frecuencia de las infecciones únicas distintas a VPH16, 18, 45 y 39 más las infecciones dobles fue creciente, desde las mujeres más jóvenes (15.8%) a las mayores (46.2%) ($r = 0.75$, $P = 0.01$, correlación de Spearman).

FRECUENCIA DE LOS VPH EN RELACIÓN AL TIPO HISTOLÓGICO Y ESTADIO FIGO

Las frecuencias de los tipos de VPH fueron muy similares en el total de casos de CCE y ACC (Figuras 6B, 6C). Sin embargo, en el análisis por grupos de edad, en las mujeres jóvenes con ACC, el VPH16 fue más frecuente que con SCC (75% vs.

FIGURA 6. Frecuencia de los tipos de VPH en las pacientes con CC por edad. La figura muestra la frecuencia relativa (%) de los tipos de VPH en las pacientes con CC de acuerdo a la edad de diagnóstico en los grupos ≤ 40 años, 41-55 años y > 50 años. El panel A incluye todas las muestras, el panel B las pacientes con CC de tipo epidermoide y el panel C las pacientes con CC de tipo adenocarcinoma. Las barras identificadas como VPH16, 18, 45, 31 y 39 incluyen infecciones simples de estos virus. Otros VPH incluyen infecciones simples de los tipos 6, 11, 26, 33, 35, 42, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 39-like, 51-like, 82-like y las infecciones dobles.



56,3%; $P = 0.0001$, prueba exacta de Fisher); no se encontraron casos positivos a VPH45, 39, 31 ni casos negativos y la frecuencia del resto de los tipos virales fue muy baja. Como era de esperarse, la tendencia en los casos de CCE fue muy similar a la observada en el total de las muestras, ya que este tipo histológico representa el 83.5% de los casos estudiados. En los ACC, la tendencia de VPH16 y VPH18 siguieron una curva en U, con mayor frecuencia en las pacientes jóvenes, una disminución en las pacientes de mediana edad y aumento en las pacientes de mayor edad. En los casos de CC estadios FIGO I/II, las frecuencias de los tipos de VPH fueron muy similares a las observadas en el total de las muestras. Mientras que en estadios III/IV, la tendencia de VPH16 cayó drásticamente, inversamente a la tendencia de los tipos virales distintos de VPH16, 18, 45 y 39 (Figura 8).

ANÁLISIS DE FACTORES DE ESTILO DE VIDA SEGÚN EDAD DE PRESENTACIÓN DE CC Y LOS TIPOS DE VPH

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la

FIGURA 7. Distribución de los tipos de VPH en intervalos de 5 años de la edad de las pacientes con CC.

La figura muestra la distribución de la infección simple de VPH16 (círculos azules), de la infección simple de VPH 18, 45 y 39 agrupadas (círculos verdes) y de la infección simple de los otros VPH (ver figura 5), VPH31 y las infecciones dobles (círculos naranjas) en intervalos de 5 años de la edad de las pacientes con CC ($n=462$).

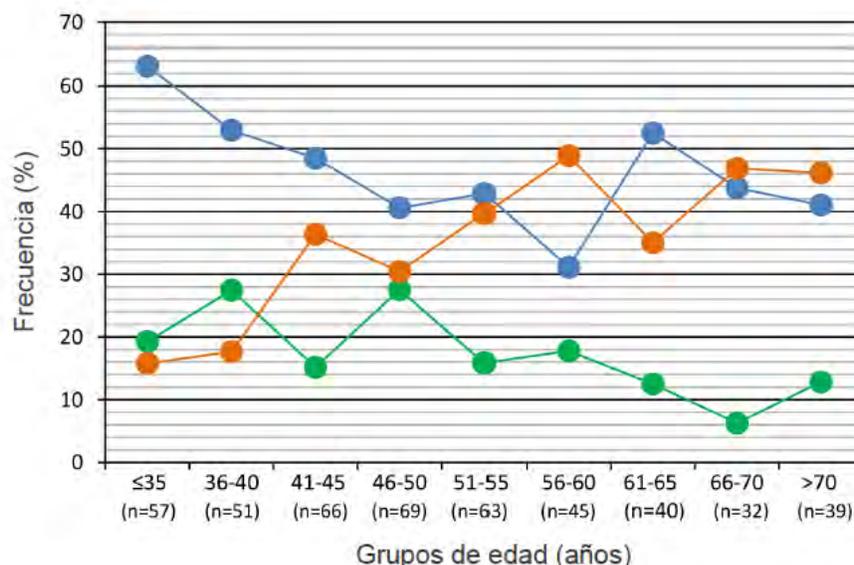
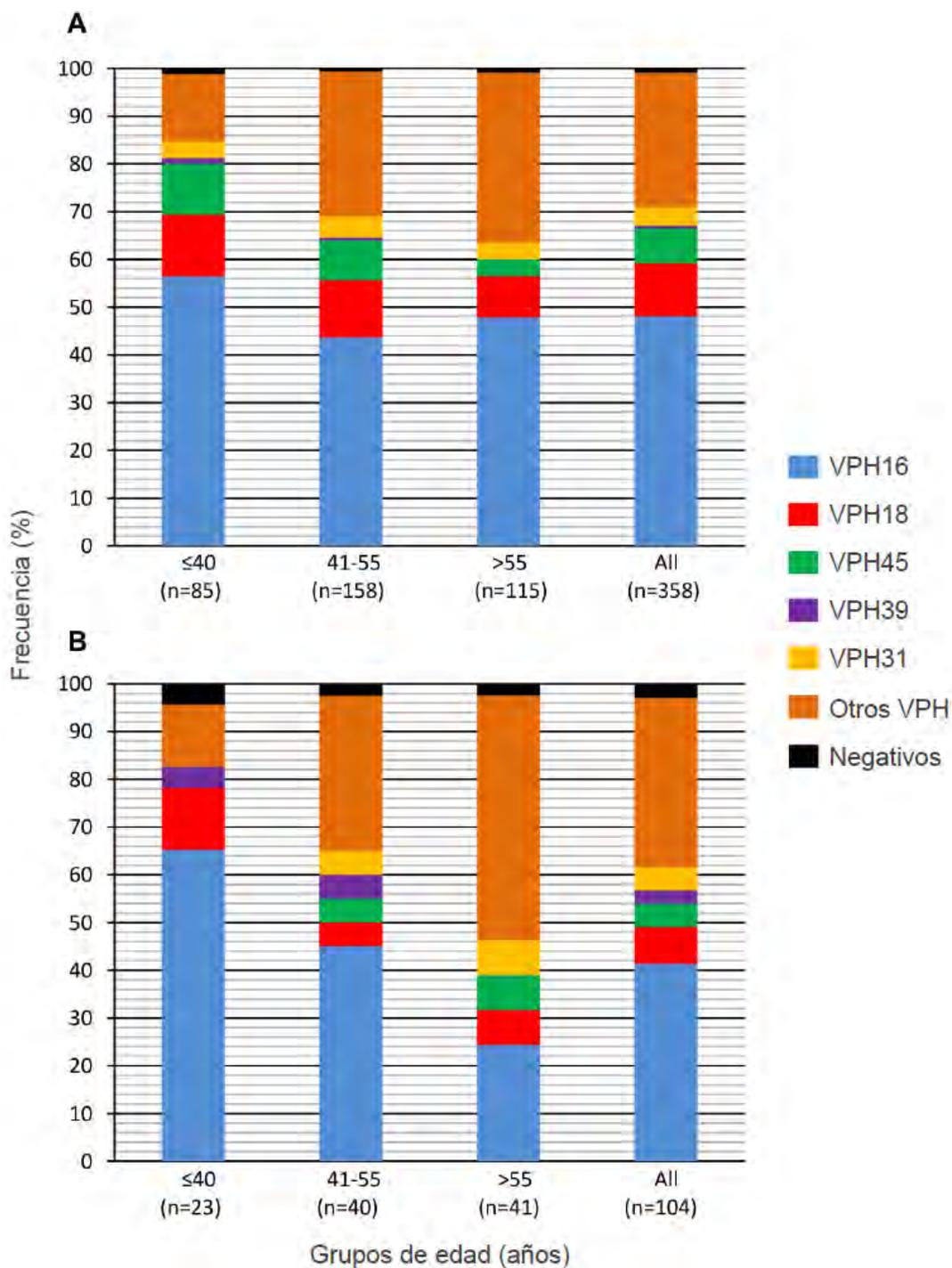


FIGURA 8. Frecuencia de los tipos de VPH en las pacientes con CC por edad y estadio FIGO.

La figura muestra la frecuencia relativa (%) de los tipos de VPH en las pacientes con CC de acuerdo a la edad de diagnóstico en los grupos ≤ 40 años, 41-55 años y >50 años y al estadio FIGO. El panel A incluye las pacientes con estadio FIGO I/II y el panel B las pacientes con estadio FIGO III/IV. Las barras identificadas como VPH16, 18, 45, 31 y 39 incluyen infecciones simples de estos virus. Otros VPH incluyen infecciones simples de los tipos 6, 11, 26, 33, 35, 42, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 39-like, 51-like, 82-like y las infecciones dobles.



frecuencia de los siguientes factores de alto riesgo de estilo de vida de las pacientes con CC (Tabla 3): edad de inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales, edad del primer embarazo, uso de anticonceptivos y asistencia al programa DOC. En

TABLA 3. Factores del estilo de vida de las pacientes con CC por edad (n = 462).

Factores de estilo de vida	Grupos de edad: % (n)			Total	valor de P
	≤40	41-55	>55		
Edad de inicio de vida sexual activa^b					
>18*	10.2 (11)	28.4 (55)	31.8 (49)	25.2 (115)	
≤18	89.8 (97)	71.6 (139)	68.2 (105)	74.8 (341)	<0.0001
Total	100 (108)	100 (194)	100 (154)	100 (456)	
Número de parejas sexuales^b					
1*	32.7 (35)	40.5 (79)	53.2 (82)	43 (196)	
≥2	67.3 (72)	59.5 (116)	46.8 (72)	57 (260)	0.003
Total	100 (107)	100 (195)	100 (154)	100 (456)	
Estado civil^c					
Casada*	47.2 (51)	45.4 (89)	40.6 (63)	44.2 (203)	
Otros ^d	52.8 (57)	54.6 (107)	59.4 (92)	55.8 (256)	0.51
Total	100 (108)	100 (196)	100 (155)	100 (459)	
Número de hijos^e					
3 ^f	57.1 (60)	33 (64)	14.7 (22)	32.5 (146)	
≥4	42.9 (45)	67 (130)	85.3 (128)	67.5 (303)	0.55
Total	100 (105)	100 (194)	100 (150)	100 (449)	
Edad del primer embarazo					
>19 ^f	38.9 (42)	50 (99)	63.5 (99)	51.9 (240)	
≤19	61.1 (66)	50 (99)	36.5 (57)	48.1 (222)	<0.0001
Total	100 (108)	100 (198)	100 (156)	100 (462)	
Uso de anticonceptivos					
No*	73.1 (79)	75.8 (150)	87.8 (137)	79.2 (366)	
Sí	26.9 (29)	24.2 (48)	12.2 (19)	20.8 (96)	0.004
Total	100 (108)	100 (198)	100 (156)	100 (462)	
Tabaquismo					
No*	81.5 (88)	78.3 (155)	76.9 (120)	78.6 (363)	
Sí	18.5 (20)	21.7 (43)	23.1 (36)	21.4 (99)	0.67
Total	100 (108)	100 (198)	100 (156)	100 (462)	
Asistencia al programa DOC					
Sí ^g	40.7 (44)	40.9 (81)	22.4 (35)	34.6 (160)	
No	59.3 (64)	59.1 (117)	77.6 (121)	65.4 (302)	<0.0001
Total	100 (108)	100 (198)	100 (156)	100 (462)	

a. Prueba chi-cuadrada de Pearson.

b. Falta la información de 6 pacientes.

c. Falta la información de 3 pacientes.

d. Incluyen divorciadas, solteras, viudas y en unión libre. Falta la información de 4 pacientes.

e. Falta de información de 13 pacientes.

f. Incluye nulíparas.

g. Pacientes que han asistido por lo menos una vez al programa de diagnóstico oportuno de cáncer (DOC).

* Factor con menor riesgo y de referencia.

todos estos factores, excepto asistencia al programa DOC, la mayor frecuencia del factor de riesgo se presentó en las mujeres ≤ 40 años, siguiendo una tendencia decreciente a medida que aumenta el rango de edad; mientras que el factor de bajo riesgo (variable con asterisco en la Tabla 3) tuvo una tendencia inversa. Por lo tanto, la ausencia de los factores de alto riesgo pudieran estar asociados con el inicio tardío del CC.

TABLA 4. Asociación de los factores del estilo de vida y los tipos de VPH para retrasar la edad de presentación del CC.

Factor	Grupos de edad: % (n)		OR (95% IC) ^a	valor de P
	≤ 40	≥ 41		
Infección por VPH				
Otros VPH ^{b*}	16.9 (18)	41.2 (146)	2.9 (1.6-5)	22x10 ⁻⁴
VPH16,18,45,39	83.1 (88)	58.8 (208)	1	
Total	100 (108)	100 (354)		
Edad de inicio de vida sexual activa^c				
>18*	10.2 (11)	29.9 (104)	2.5 (1.2-5.2)	0.02
≤ 18	89.8 (97)	70.1 (244)	1	
Total	100 (108)	100 (348)		
Número de parejas sexuales^c				
1*	32.7 (35)	46.1 (161)	1.7 (1.1-2.8)	0.03
≥ 2	67.3 (72)	53.9 (188)	1	
Total	100 (107)	100 (349)		
Edad del primer embarazo				
>19 ^d	38.9 (42)	55.9 (198)	1.5 (0.9-2.4)	0.13
≤ 19	61.1 (66)	44.1 (156)	1	
Total	100 (108)	100 (354)		
Uso de anticonceptivos				
No*	73.1 (79)	81.1 (287)	1.2 (0.7-2.1)	0.48
Sí	26.9 (29)	18.9 (67)	1	
Total	100 (108)	100 (354)		
Asistencia al programa DOC				
Sí ^e	40.7 (44)	22.4 (35)	0.77 (0.5-1.2)	0.28
No	59.3 (64)	77.6 (121)	1	
Total	100 (108)	100 (156)		

a. El grupo de pacientes ≤ 40 años fue considerado el de referencia y la razón de riesgo (OR) fue calculada utilizando un modelo de regresión logística incluyendo todos los factores significativos de la Tabla 3; variable de referencia (OR = 1); IC = intervalo de confianza del 95%.

b. Otros VPH incluyen las infecciones simples de otros tipos diferentes a VPH16,18, 45 y 39, las infecciones dobles y los casos negativos.

c. Falta la información de 6 pacientes.

d. Incluye nulipatas.

e. Pacientes que han asistido por lo menos una vez al programa de diagnóstico oportuno de cáncer (DOC).

* Factor con menor riesgo y de referencia.

Para investigar si estos 5 factores del estilo de vida de las pacientes y los tipos virales diferentes a VPH16, 18, 45 y 39 estaban asociados independientemente con el retraso del inicio de CC, se utilizó el LRM. Ya que los cambios en la frecuencia de los tipos de VPH y factores del estilo de vida fueron más notorios entre los dos primeros grupos de edad (≤ 40 y 41-55 años), el análisis se realizó en dos grupos: ≤ 40 y ≥ 41 años; el primer se consideró el grupo de referencia (Tabla 4). Sólo la infección por los tipos virales diferentes de VPH16, 18, 45 y 39 (OR: 2.9, IC 95%: 1.6-5), la edad ≤ 18 años del inicio de vida sexual activa (OR: 2.5, IC 95%: 1.2-5.2) y ≥ 2 parejas sexuales (OR: 1.7, IC del 95%: 1,1-2,8) se asociaron significativamente al inicio tardío de CC ($P < 0.05$, chi-cuadrada de Wald).

FRECUENCIA DE LAS VARIANTES DE VPH16 EN CC Y EN CÉRVIX SANO.

Como ya se mencionó, la frecuencia de VPH16 en CC fue del 50.9% (235/462), incluyendo sólo los sublinajes europeos A1/2 (31.1%), y los sublinajes asiáticos-americanos D2 (10.8%) y D3 (8.9%) (Figura 9A). Estas frecuencias fueron similares a las reportadas anteriormente en CC [96]. La frecuencia de VPH16 en el cérvix de mujeres sanas fue del 3.7%, 2.8% correspondió a A1/2 y 0.4% a cada variante D2 y D3 (Figura 9D). No se encontró alguna muestra positiva para más de una variante de VPH16.

La identificación de los sublinajes se realizó inicialmente de acuerdo con Yamada [100] utilizando las regiones de E6 y MY (Figura 10). Posteriormente, confirmamos estos hallazgos analizando la mayoría de las posiciones en E6 ($n = 13$) y LCR ($n = 21$) propuesta por Burk [101]. Encontramos algunas novedades interesantes en E6 y LCR de los linajes AA. Las 13 posiciones en E6 de los linajes AA en nuestras muestras fueron idénticas a las reportadas por Burk. Sin embargo, la posición 183, no incluida en la clasificación de Burk, era una posición variable en D2 pero no en D3. La mayoría (92%, 46/50) de los casos positivos a D2 cambió T por G (Figura 10) en esta posición, resultando isoleucina a arginina en la proteína (I27R). En LCR,

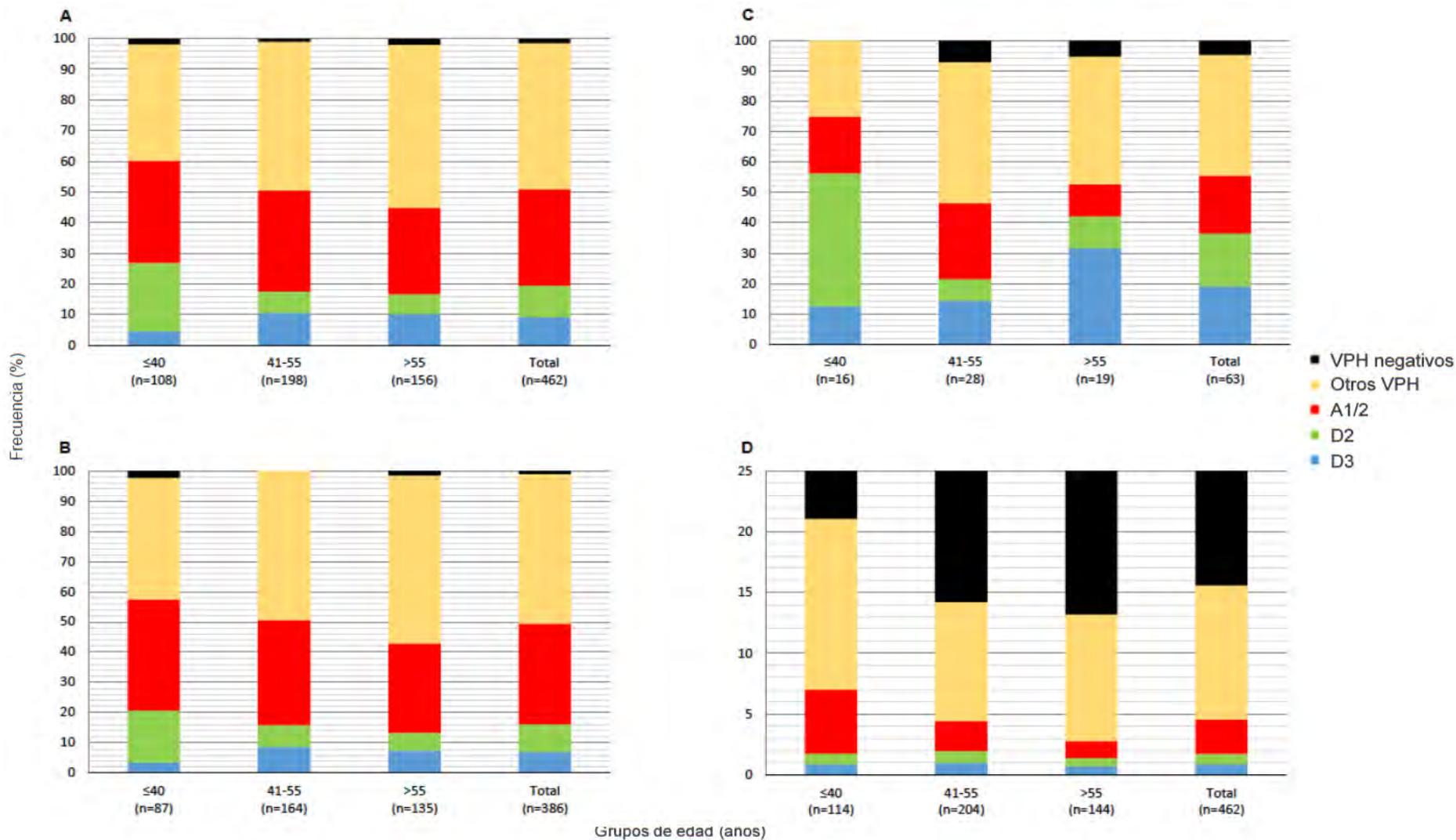


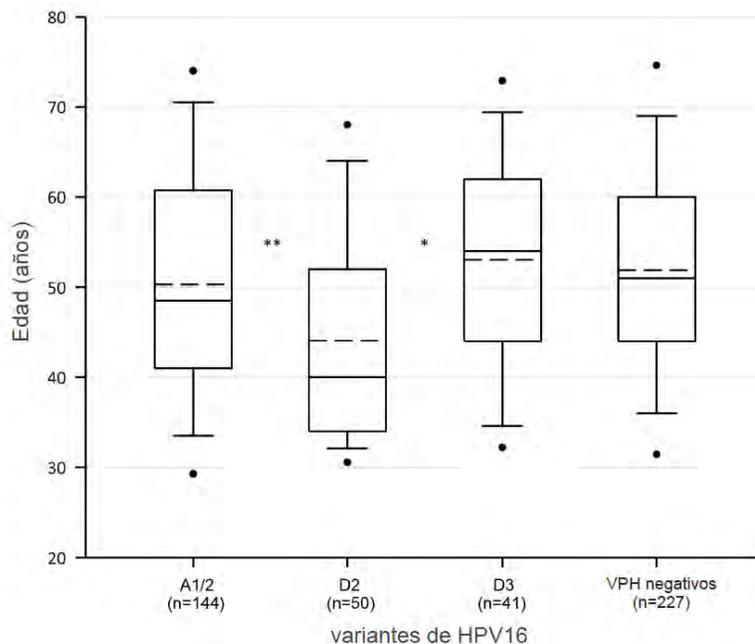
FIGURA 9. Frecuencia de las variantes de VPH16 en las pacientes con CC y las mujeres sanas de acuerdo con la edad. La figura muestra la frecuencia relativa (%) de las variantes de VPH16 en las pacientes con CC y las mujeres sanas en tres grupos de edad ≥40, 41–55, y >55 años. Panel A, todas las pacientes; panel B, pacientes con carcinoma epidermoide; panel C, pacientes con adenocarcinoma; y panel D, mujeres sanas. Las barras identificadas como otros VPH incluyen los casos positivos a otros VPH diferentes del tipo 16

todas las posiciones excepto una (7729) estuvieron de acuerdo con la secuencia propuesta por Burk y Yamada. En esta posición, encontraron un cambio de A a C en los sublinajes D2 y D3. En el presente estudio, todos los casos positivos a D3 tuvieron el mismo cambio (41/41). Sin embargo, en la mayoría de los aislados D2 (72%, 36/50) esta posición cambió de A a T en lugar de A a C (28%, 14/50). Las variaciones en estas dos posiciones no fueron diferentes entre los casos y los controles.

ANÁLISIS DE LAS VARIANTES DE VPH16 POR EDAD

La mediana de la edad de las pacientes con CC positivas a VPH16 fue de 49 años (RIQ = 41-60). Sin embargo, se observaron grandes variaciones en la edad de las

FIGURA 11. Distribución de la edad de las pacientes con CC y variantes de VPH16. El diagrama de cajas muestra la distribución por edad de las pacientes con CC clasificadas por las variantes de VPH16. Los bordes superiores e inferiores de las cajas representan los cuartiles 75 y 25 respectivamente. La línea sólida y la línea punteada dentro de las cajas representan los valores de la mediana y la media, respectivamente. Los bigotes representan los valores máximos y mínimos que se encuentran 1.5 veces del rango intercuartil del límite de la caja. Los valores fuera de rango están representados por círculos negros. La significancia estadística de la diferencia de las medianas entre el grupo D2 y los otros grupos se determinó con la prueba U de Mann-Whitney (*P < 0.001, **P < 0.002). Las cajas etiquetadas como VPH16 negativos incluyen las muestras positivas para otros virus diferentes a VPH16 (n = 220) y los casos negativos (n = 7).

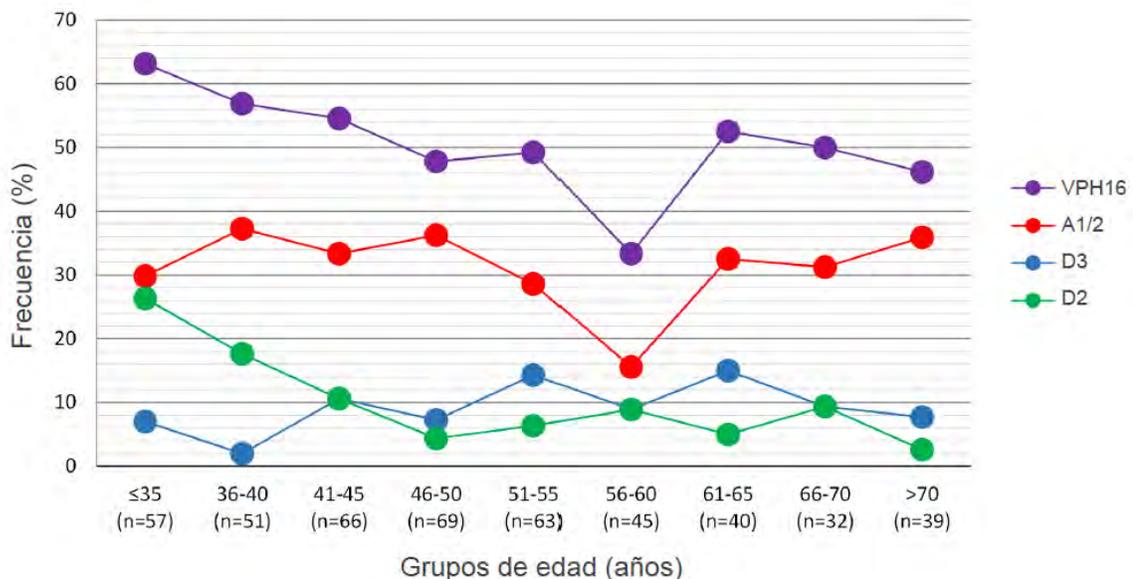


pacientes en relación a las variantes. La mediana de la edad de las pacientes positivas para D2 (40, RIQ = 34-52 años) fue de 9 y 14 años inferior a la de las pacientes positivas para A1/2 (49, RIQ = 41-61 años; $P < 0.002$, prueba U de Mann Whitney) y D3 (54, RIQ = 44-62 años; $P < 0.001$, prueba U de Mann Whitney), respectivamente (Figura 11).

También se estudió la frecuencia por edad de las variantes de VPH16 en las pacientes con CC divididos en los tres grupos de edad: pacientes jóvenes (≤ 40 años), pacientes de mediana edad (41-55 años) y pacientes mayores (≥ 56 años) (Figura 9A). La frecuencia de las variantes A1/2 fue relativamente constante ($\sim 32\%$) en los tres grupos de edad, con una pequeña disminución no significativa en el grupo de mayor edad. En contraste, la frecuencia de las variantes del linaje D no fue uniforme entre los grupos, y la tendencia fue inversa para las variantes D2 y D3. Si bien la frecuencia de D2 fue muy alta en las pacientes jóvenes (24.1%) y muy baja en pacientes mayores (6.4%), la frecuencia de D3 fue muy baja en pacientes jóvenes (4,6%) y aumentó en pacientes mayores (10.9%).

FIGURA 12. Frecuencia de las variantes de VPH16 en intervalos de 5 años.

La figura muestra la frecuencia relativa (%) de las infecciones por VPH16 en todos los casos ($n = 462$) de CC y segregados por las variantes D (D2 y D3) y A1/2, en intervalos de 5 años de la edad de las pacientes. La disminución en la frecuencia de los casos VPH16 y D2 positivos hasta el intervalo de 51-55 años fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$, correlación de Spearman).



Para investigar si los diferentes componentes de la curva de VPH16 (círculos azules en Figura 7) se asociaron con alguna variante específica, la tendencia de las frecuencias también se analizó en intervalos de 5 años (Figura 12). En el pico más alto (≤ 35 años), la frecuencia de las variantes D fue mayor que la de las variantes A1/2 (33.3% vs. 29.8%), debido principalmente a la alta frecuencia de D2 (26.3%). La disminución gradual de la frecuencia de VPH16 hasta el intervalo de 51-55 años ($r = 0.89$, $P < 0.05$, correlación de Spearman) se debió esencialmente a la disminución de la frecuencia D2 ($r = 0.94$, $P < 0.05$, correlación de Spearman), ya que la frecuencia de D3 y A1/2 se mantuvo relativamente constante (~ 28 y $\sim 14\%$, respectivamente) en estos intervalos. La disminución de la frecuencia de VPH16 en el intervalo de 56-60 años y el aumento en el intervalo de 61-65 años fue provocada por el cambio en la frecuencia de A1/2. La frecuencia de A1/2, D2 y D3 permaneció relativamente constante ($\sim 32\%$, 6% y 11% , respectivamente) en los últimos intervalos. En la muestra de mujeres con cérvix sano, la frecuencia de VPH16 y las variantes individuales, principalmente A1/2, disminuyó del grupo de mujeres jóvenes al de mujeres de mayor edad (Figura 9D). Sin embargo, no pudimos examinar la distribución en intervalos de 5 años debido al pequeño número de controles positivos para VPH16 ($n = 17$).

FRECUENCIA DE VARIANTES DE HPV16 SEGÚN EL TIPO HISTOLÓGICO

La distribución de las variantes de VPH16 fue radicalmente diferente entre los grupos de ACC y CCE (Tabla 5; $p < 0.001$, prueba de chi-cuadrada de Pearson). La frecuencia de las variantes D fue mayor que la de las variantes A1/2 en ACC (36.5% vs. 19%), mientras que el inverso se observó en SCC (16.6% vs 32.9%). La mediana de edad de las pacientes positivas para diferentes variantes fue similar entre CCE y ACC. En ambos grupos, las pacientes positivas para D2 fueron más jóvenes que las pacientes positivas para otras variantes. Aunque la mediana de la edad de las pacientes con ACC y D2 (40, IQR: 33-49 años) fue dos años menor que la de los pacientes con CCE (42, IQR: 35-55 años), la diferencia no fue estadísticamente significativa.

ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES DE VPH16 CON LA EDAD DE PRESENTACIÓN DE CC

Para este análisis, se consideró la mediana de la edad de las pacientes con CC positivas a VPH16 para determinar la asociación las variantes de este tipo viral de la edad de presentación temprana de CC (≤ 49 años de edad). Las pacientes mayores (≥ 50 años de edad) fue el grupo de referencia y los casos VPH16 negativos como la

TABLA 5. Asociación de las variantes de VPH16 con la edad de presentación de CC.

Variantes VPH16	Grupos de edad: % (n)			OR (95% IC)	valor de P
	≤ 49	$\geq 50^a$	Total		
Todos los casos					
VPH16 negativos ^{b*}	45.1 (105)	53.3 (122)	49.1 (227)	1	
VPH16 positivos	54.9 (128)	46.7 (107)	50.9 (235)	1.4 (1-2)	0.078
A1/A2	33.0 (77)	29.3 (67)	31.2 (144)	1.3 (0.9-2)	0.176
D2	15.9 (37)	5.7 (13)	10.8 (50)	3.3 (1.7-6.6)	0.001
D3	6.0 (14)	11.8 (27)	8.9 (41)	0.6 (0.3-1.2)	0.154
Total	100 (233)	100 (229)	100 (462)		
Carcinoma epidermoide					
VPH16 negativos ^{b*}	46.6 (90)	54.4 (105)	50.5 (195)	1	
VPH16 positivos	53.4 (103)	45.6 (88)	49.5 (191)	1.4 (0.9-2)	0.127
A1/A2	35.2 (68)	30.6 (59)	32.9 (127)	1.3 (0.9-2.1)	0.195
D2	13.5 (26)	5.7 (11)	9.6 (37)	2.8 (1.3-5.9)	0.009
D3	4.7 (9)	9.3 (18)	7 (27)	0.6 (0.2-1.4)	0.213
Total	100 (193)	100 (193)	100 (386)		
Adenocarcinoma					
VPH16 negativos ^{b*}	37.5 (12)	51.6 (16)	44.4 (28)	1	
VPH16 positivos	62.5 (20)	48.4 (15)	55.6 (35)	1.8 (0.7-4.9)	0.261
A1/A2	18.8 (6)	19.4 (6)	19 (12)	1.3 (0.3-5.2)	0.678
D2	28.1 (9)	6.5 (2)	17.5 (11)	6 (1.1-33)	0.039
D3	15.6 (5)	22.6 (7)	19 (12)	1 (0.2-3.7)	0.944
Total	100 (32)	100 (31)	100 (63)		
Casos HPV16 positivos					
A1/A2*	60.2 (77)	62.6 (67)	61.3 (144)	1	
D2	28.9 (37)	12.1 (13)	21.3 (50)	2.5 (1.2-5.0)	0.013
D3	10.9 (14)	25.2 (27)	17.4 (41)	0.45 (0.2-0.9)	0.031
Total	100 (128)	100 (107)	100 (235)		

La razón de riesgo (OR) fue calculada utilizando un modelo de regresión logística; variable de referencia (OR = 1), IC intervalo de confianza del 95%.

a. El grupo de edad ≥ 50 años se consider el grupo de referencia.

b. VPH16 negativos incluyen los casos o controles negativos y los casos positivos a otros VPH diferentes de VPH16.

referencia de la variable explicativa (Tabla 5).

D2 aumentó 3.3 veces el riesgo de desarrollar CC antes de los 50 años de edad (OR = 3.3, IC 95% = 1.7-6.6, P <0.001), en relación con los casos que no eran positivos a VPH16. Separando los casos de CCE y ACC, el riesgo fue mayor para ACC (OR = 6, IC 95% = 1.1-33, P <0.05) que para CCE (OR = 2.8, IC 95% = 1.3-5.9, P <0.01). Por el contrario, A1/2 y D3 no se asociaron con mayor riesgo para desarrollar CC antes de los 50 años de edad en relación con los casos HPV16 negativos. Cuando se evaluaron sólo los casos positivos a VPH16 considerando la variante A1/2 como la referencia de la variable explicativa, D2 aumentó el riesgo (OR = 2.5, IC 95% = 1.2-5, P <0,05) y D3 disminuyó el riesgo (OR = 0.45, IC 95% 0.2-0.9, P <0,05) de desarrollar CC a temprana edad.

ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES DE VPH16 Y LOS FACTORES DE ESTILO DE VIDA CON LA EDAD DE PRESENTACIÓN DE CC: ANÁLISIS DE CASOS Y CONTROLES

Considerando todos los casos de CC (n = 462) y los controles (n = 462) como grupo de referencia (Tabla 6), VPH16 aumentó 27.1 veces el riesgo de desarrollar CC (IC 95% 16.2-45.5, P <0.0001). El linaje D confirió mayor riesgo que el linaje A (OR = 44.6 vs 21.7). Cuando D2 y D3 se compararon por separado, el riesgo para D2 aumentó hasta 49 veces (P <0.0001) y de D3 disminuyó a 40.2 veces (P <0,0001). Al hacer el análisis por grupos de edad, el riesgo de cada variante se modificó radicalmente (Figura 13). El riesgo conferido por D2 mostró una tendencia opuesta en comparación con A1/2 y D3. El OR de D2 alcanzó su máximo punto en el grupo de mujeres jóvenes (78.9) y disminuyó en el grupo de mayor edad (23.5); mientras que el OR de A1/2 y D3 mostró una tendencia inversa, disminuyendo en las mujeres jóvenes (16.4 y 29.9, respectivamente) y aumentando en las mujeres de mayor edad (40.5 y 48.9, respectivamente).

Se investigó si los factores de estilo de vida de las pacientes contribuyeron con la

Tabla 6. Asociación de los factores del estilo de vida y las variantes de VPH16 con la edad de presentación de CC.

Variantes VPH16	Grupos de edad: % (n)								Total			
	≤49				≥50				Casos	Controles	OR (95% IC) ^a	Valor P
Factores estilo de vida	Casos	Controles	OR (95% IC) ^a	Valor P	Casos	Controles	OR (95% IC) ^a	Valor P	Casos	Controles	OR (95% IC) ^a	Valor P
VPH16 negativos^b	45.1 (105)	94.9 (224)	1		53.3 (122)	97.8 (221)	1		49.1 (227)	96.3 (445)	1	
VPH16 positivos	54.9 (128)	5.1 (12)	22.8 (12.1-43)	<0.0001	46.7 (107)	2.2 (5)	38.8 (15.4-97.6)	<0.0001	50.9 (235)	3.7 (17)	27.1 (16.2-45.5)	<0.0001
A1/A2	33.0 (77)	4.2 (10)	16.4 (8.2-33)	<0.0001	29.3 (67)	1.3 (3)	40.5 (12.5-131.3)	<0.0001	31.2 (144)	2.8 (13)	21.7 (12-39.2)	<0.0001
D	21.9 (51)	0.8 (2)	54.4 (13-227.7)	<0.0001	17.5 (40)	0.9 (2)	36.2 (8.6-152.5)	<0.0001	19.7 (91)	0.9 (4)	44.6 (16.2-122.9)	<0.0001
D2	15.9 (37)	0.4 (1)	78.9 (10.7-583.1)	<0.0001	5.7 (13)	0.4 (1)	23.5 (3-182.2)	<0.005	10.8 (50)	0.4 (2)	49 (11.8-203.2)	<0.0001
D3	6.0 (14)	0.4 (1)	29.9 (3.9-230.1)	<0.005	11.8 (27)	0.4 (1)	48.9 (6.6-364.3)	<0.0001	8.9 (41)	0.4 (2)	40.2 (9.6-167.6)	<0.0001
Total	100 (233)	100 (236)			100 (229)	100 (226)			100 (462)	100 (462)		
Edad de la primera relación sexual^c												
>18	18.2 (42)	49.2 (116)	1		32.4 (73)	57.1 (129)	1		25.2 (115)	53 (245)	1	
≤18	81.8 (189)	50.8 (120)	4.3 (2.9-6.6)	<0.0001	67.6 (152)	42.9 (97)	2.8 (1.9-4.1)	<0.0001	74.8 (341)	47 (217)	3.3 (2.5-4.4)	<0.0001
Total	100 (231)	100 (236)			100 (225)	100 (226)			100 (456)	100 (462)		
Número de parejas sexuales^c												
1	36.5 (84)	53 (125)	1		49.6 (112)	59.3 (134)	1		43 (196)	56.1 (259)	1	
≥2	63.5 (146)	47 (111)	2.0 (1.4-2.8)	<0.0005	50.4 (114)	40.7 (92)	1.5 (1-2.2)	<0.05	57 (260)	43.9 (203)	1.7 (1.3-2.2)	<0.0001
Total	100 (230)	100 (236)			100 (226)	100 (226)			100 (456)	100 (462)		
Estado civil^d												
Casada*	46.6 (108)	56.4 (133)	1		41.9 (95)	56.2 (127)	1		44.2 (203)	56.3 (260)	1	
Otros ^e	53.4 (124)	43.6 (103)	1.5 (1.0-2.1)	<0.05	58.1 (132)	43.8 (99)	1.8 (1.2-2.6)	<0.005	55.8 (256)	43.7 (202)	1.6 (1.3-2.1)	<0.001
Total	100 (232)	100 (236)			100 (227)	100 (226)			100 (459)	100 (462)		
Número de hijos^f												
3 ^g	45.6 (104)	80.1 (189)	1		19 (42)	47.3 (107)	1		32.5 (146)	64.1 (296)	1	
≥4	54.4 (124)	19.9 (47)	4.8 (3.2-7.2)	<0.0001	81 (179)	52.7 (119)	3.8 (2.5-5.9)	<0.0001	67.5 (303)	35.9 (166)	3.7 (2.8-4.9)	<0.0001
Total	100 (228)	100 (236)			100 (221)	100 (226)			100 (449)	100 (462)		
Edad del primer embarazo												
>19 ^g	43.8 (102)	69.1 (163)	1		60.3 (138)	75.2 (170)	1		51.9 (240)	72.1 (333)	1	
≤19	56.2 (131)	30.9 (73)	2.9 (2-4.2)	<0.0001	39.7 (91)	24.8 (56)	2.0 (1.3-3)	<0.001	48.1 (222)	27.9 (129)	2.4 (1.8-3.1)	<0.0001
Total	100 (233)	100 (236)			100 (229)	100 (226)			100 (462)	100 (462)		
Uso de anticonceptivos												
No*	73.4 (171)	80.5 (190)	1		85.2 (195)	80.5 (182)	1		79.2 (366)	80.5 (372)	1	
Sí	26.6 (62)	19.5 (46)	1.5 (1.0-2.3)	0.07	14.8 (34)	19.5 (44)	0.7 (0.4-1.2)	0.19	20.8 (96)	19.5 (90)	1.1 (0.8-1.5)	0.62
Total	100 (233)	100 (236)			100 (229)	100 (226)			100 (462)	100 (462)		
Tabaquismo												
No*	80.7 (188)	83.5 (197)	1		76.4 (175)	84.5 (191)	1		78.6 (363)	84 (388)	1	
Sí	19.3 (45)	16.5 (39)	1.2 (0.8-1.9)	0.43	23.6 (54)	15.5 (35)	1.7 (1.1-2.7)	<0.05	21.4 (99)	16 (74)	1.4 (1.0-2.0)	<0.05
Total	100 (233)	100 (236)			100 (229)	100 (226)			100 (462)	100 (462)		
Asistencia al programa DOC												
Sí ^h	39.5 (92)	80.5 (190)	1		29.7 (68)	79.2 (179)	1		34.6 (160)	79.9 (369)	1	
No	60.5 (141)	19.5 (46)	6.3 (4.2-9.6)	<0.0001	70.3 (161)	20.8 (47)	9.0 (5.9-13.8)	<0.0001	65.4 (302)	20.1 (93)	7.5 (5.6-10.1)	<0.0001
Total	100 (233)	100 (236)			100 (229)	100 (226)			100 (462)	100 (462)		

a. El grupo Control fue considerado como grupo de referencia; la razón de riesgo (OR) fue calculada utilizando un modelo de regresión logística; variable de referencia (OR = 1), IC intervalo de confianza del 95%. *Factor con menor riesgo y de referencia.

b. VPH16 negativos incluyen los casos o controles negativos y los casos positivos a otros VPH diferentes de VPH16.

c. Falta la información de 6 pacientes.

d. Falta la información de 3 pacientes.

e. Incluyen divorciadas, solteras, viudas y en unión libre. Falta la información de 4 pacientes.

f. Falta la información de 13 pacientes.

g. Incluye nulíparas.

h. Pacientes que han asistido por lo menos una vez al programa de diagnóstico oportuno de cáncer (DOC).

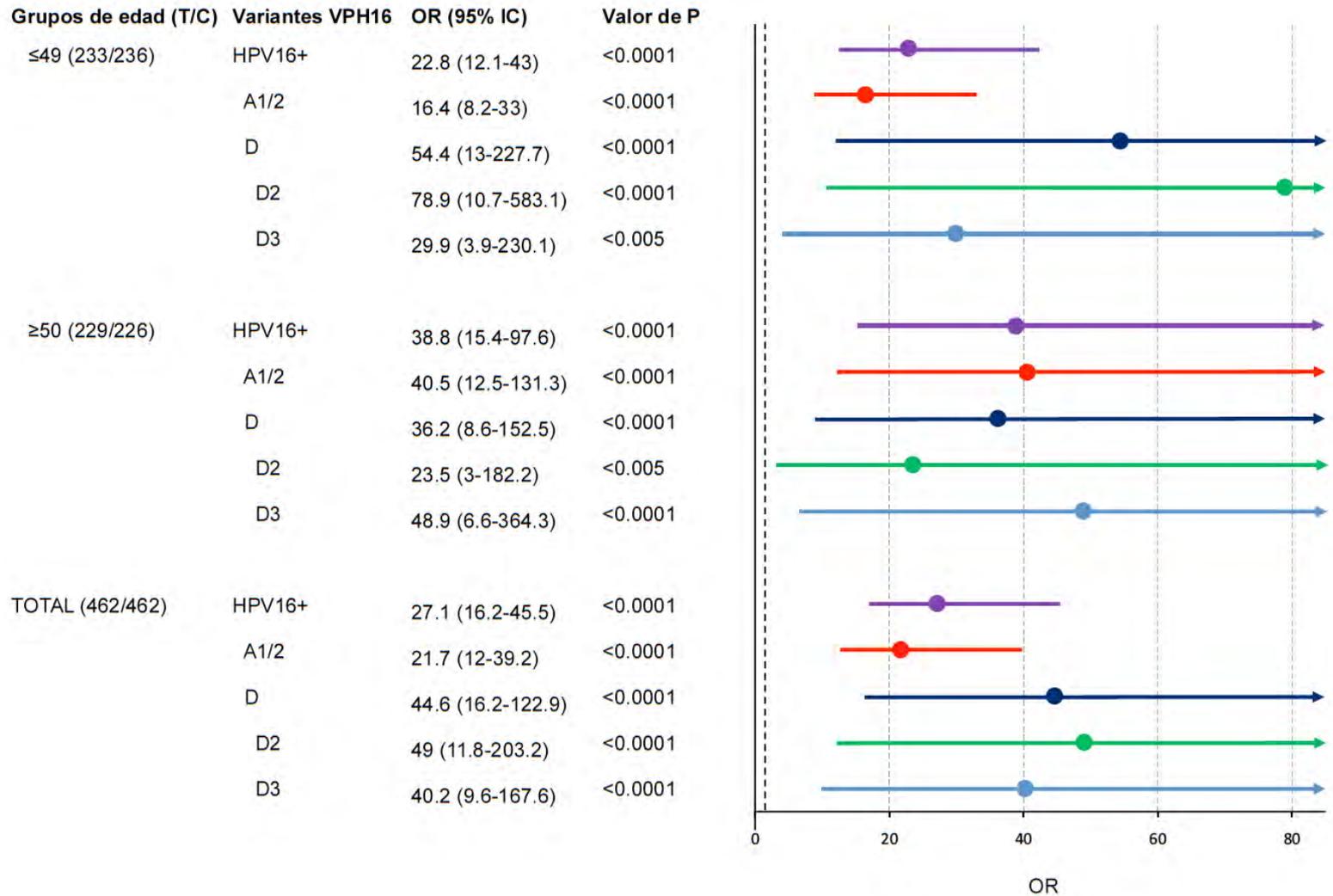


FIGURA 13. Asociación de variantes de VPH16 con la edad de presentación de CC.

La gráfica representa el resultado del modelo de regresión logística. Los círculos representan la razón de riesgo (OR). La primera línea vertical punteada, a la derecha del eje de las y indica el OR de 1. Las flechas indican que el intervalo de confianza (IC) estimado excede la escala de la gráfica. T = casos, C = controles.

aparición temprana o tardía de CC. Todos los factores de estilo de vida, excepto los dos (uso de anticonceptivos y tabaquismo), se asociaron con CC en ambos grupos de edad cuando se analizaron individualmente (Tabla 6). Fumar se asoció con CC sólo en los pacientes mayores. El OR de estos factores varió ligeramente entre los grupos de edad la no asistencia al programa DOC confirió el mayor riesgo en ambos grupos de edad. Para investigar si estos factores de estilo de vida y variantes de VPH16 se asociaron independientemente con CC, se utilizó un LRM (resultados en negritas en Tabla 6). Además de las variantes del VPH16, la edad en la primera relación sexual, el número de niños y la no asistencia al programa DOC se asociaron independientemente con CC en ambos grupos de edad. El número de parejas sexuales se asoció independientemente sólo a las mujeres jóvenes. Sin embargo, la contribución de los factores de estilo de vida en ambos grupos de edad es mínimo en comparación con la variante de VPH16. De hecho, el OR de la variante D2 (78.9) se calculó muy por encima del OR más grande de los factores de estilo de vida en mujeres jóvenes (6.3 para no asistencia al programa DOC); igualmente el OR de las variantes D3 y A1/2 en relación al OR más grande en mujeres de mayor edad (36.2 y 48.9 vs 9.0 para no asistencia al programa DOC).

DISCUSIÓN

Aunque existen numerosas publicaciones sobre la frecuencia de VPH en mujeres con CC, poco se ha publicado sobre la frecuencia del virus en relación a la edad [81, 87, 102, 103]. En este estudio, analizamos en detalle la relación de los tipos de VPH y la edad de presentación de CC. La mediana de la edad de las mujeres diagnosticadas con CC y con infecciones simples por VPH16, 18, 45 y 39 fue 5 años menor que la mediana de la edad de las mujeres infectadas por otros virus. La frecuencia de los tipos virales mostraron 3 tendencias particulares: una para el tipo VPH16, otra para VPH18, 45 y 39 y otra para el resto de VPH. VPH16 siguió la

tendencia típica con dos picos como se ha publicado en numerosos estudios de mujeres sanas, especialmente en América Latina y países asiáticos [84, 104, 105]. El primer pico se observó en pacientes jóvenes (≤ 35 años), seguido de una tendencia decreciente hasta los 55-60 años; el segundo pico a los 61-65 años, igualmente seguido de una tendencia decreciente. La tendencia de VPH18, 45 y 39 tuvo una tendencia inicial similar, disminuyó paulatinamente con la edad, pero sin el segundo pico. Por el contrario, la tendencia del resto de los tipos de VPH aumentó con la edad de las pacientes. También demostramos que las variantes de VPH16 se asociaron de manera diferente entre las mujeres jóvenes y las mujeres mayores con CC. La variante D2 se asoció con las pacientes ≤ 49 años de edad y la variante D3 con pacientes ≥ 50 años, mientras que A1/2 se distribuyó uniformemente entre los dos grupos de edad. Mientras que en el estudio de casos y controles, algunos factores del estilo de vida se asociaron a la edad de presentación de CC temprana o tardía, el riesgo conferido por estos factores fue muy por debajo del conferido por las variantes de VPH16. Estos datos sugieren que el papel del virus, en especial las variantes de VPH16 juegan un papel mucho más importante en la presentación temprana o tardía del CC que los factores de estilo de vida de las pacientes.

Encontramos una gran diferencia en la frecuencia de los tipos de VPH en los grupos de edad. La frecuencia agrupada de VPH16, 18, 45 y 39 como infección simple en toda la muestra fue de 64.5%; esta aumenta a 81.5% en las pacientes jóvenes y disminuye a 54.5% en las pacientes de mayor edad. Esta diferencia (27 puntos) fue similar pero en sentido opuesto para la frecuencia del resto de los virus: de 16.7% en pacientes menores de 41 años a 44.2% en pacientes mayores de 55 años. Estas frecuencias contrastan con la mayoría de estudios publicados en países desarrollados, donde la frecuencia agrupada de los VPH16, 18 y 45 está entre 75-80% [16, 106]. Sin embargo, esta frecuencia es consistente con publicaciones anteriores en población mexicana [107]. Estas diferencias pudieran estar relacionadas con la edad de diagnóstico de CC; en los países desarrollados es 5 a 10 años antes [108, 109].

Teniendo en cuenta los VPH incluidos (16 y 18) en las vacunas comerciales disponibles en México, el porcentaje de cobertura sería del 74.1% en mujeres jóvenes y el 55.8% en mujeres mayores de 55 años. Estas cifras deben ser consideradas para desarrollar mejores estrategias de prevención de CC en México e incluir a mujeres pre y post menopáusicas. En México, la cobertura de la citología exfoliativa es todavía baja (66%) en comparación con los países desarrollados [110]. Con la introducción de estas vacunas en las niñas se espera una disminución significativa en la incidencia de CC [111, 112] que quizás se vea reflejada en nuestro país dentro de 30 años. Sin embargo, las mujeres vacunadas deben continuar asistiendo al programa DOC, ya que sólo protege contra ciertos tipos virales y aún se desconoce el tiempo que permanece la inmunidad contra ellos [113, 114].

Se ha demostrado que los VPH más oncogénicos son 16 y 18, seguido de 45 [115, 116]. La infección persistente por estos tipos virales puede evolucionar rápidamente a CC [16, 76]. Esto podría explicar el mayor porcentaje de estos VPH en las mujeres jóvenes con CC, pero no en las mujeres de mayor edad, quienes son 15-60 años mayores. No se sabe si estas pacientes adquirieron la infección 10 a 15 años antes de ser diagnosticadas con CC o fueron infectadas muchos más años antes en su juventud y el virus permaneció latente [17, 117, 118]. De acuerdo con la tendencia de las frecuencias de VPH observadas en este estudio, este fenómeno no podría ser el mismo para VPH16, 18 y 45 que para los otros VPH.

En el caso de VPH16, su curva de frecuencia bimodal se explica por las variantes. El primer pico (≤ 35 años) es claramente resultado por la alta frecuencia de D2 en estas pacientes. Mientras que el segundo pico (61-65 años), es el resultado de la disminución en la frecuencia de A1/2 cinco años antes. Eliminando esto último por el pequeño número de pacientes ($n = 45$), la frecuencia de las variantes D3 y A1/2 se mantuvo relativamente constante en todos los intervalos de edad. Aunque pocos estudios han demostrado la prevalencia de VPH16 en relación a la edad de las pacientes con CC, la frecuencia de VPH16 y 18 es alta en las mujeres más jóvenes en todo el mundo [119]. Sin embargo, debido a que D2 no existe o es poco frecuente

fuera de México y tal vez otros países de Latinoamérica [101], otras variantes de VPH16 podrían contribuir a esta alta frecuencia en la mayoría de países.

La disminución en la frecuencia de VPH16, 18 y 45, y en particular de la variante D2 de HPV16, con la edad de las mujeres con CC podría estar relacionado con la disminución de los niveles hormonales, quizás no para los otros VPH. Hay secuencias consenso para receptores de estrógenos en LCR de estos virus, que juega un papel importante en la regulación de los genes de VPH [120]. Inferir una asociación causal entre las hormonas y la infección por VPH es difícil [72]. Sin embargo, las secuencias consenso de LCR, incluyendo algunas asociados con la respuesta hormonal, tienen varios sitios mutados en el linaje D. Uno de ellos (A7729T), está situado en un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE por sus siglas en inglés) [121, 122, 123], el cual se presenta en LCR de D2. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que la respuesta inmunológica tenga un papel importante en la distribución de VPH, ya que los tipos virales no comunes de VPH tienen tasa de replicación más baja [124] y pudieran permanecer ocultos al sistema inmune. Además, la respuesta inmune disminuye en la postmenopausia de las mujeres [125]. Todo esto podría producir un ambiente adecuado para la latencia de los VPH o permitir la adquisición de nuevas infecciones, incluso por otras variantes de VPH16.

El genoma del linaje D y A difieren aproximadamente en un 1% [101], aunque algunos genes como E2 [126], difieren en un 2%. Esta diferencia en el genoma es suficientemente grande para esperar cambios funcionales entre dos entidades biológicas. De hecho, se han reportado diferencias biológicas en relación a la transformación celular entre el linaje D y A [82, 127, 128]. Sin embargo, D2 y D3 son muy similares, difiriendo solamente por algunas bases. La evidencia experimental ha ayudado a explicar los mecanismos que facilitan el desarrollo de cáncer invasor mediado por D2 en un período considerablemente corto. La unión de la proteína E2 de las variantes del linaje A a los cuatro sitios de unión de E2 en LCR disminuye la expresión de E6 y E7 [129]. Sin embargo, en experimentos comparativos *in vitro*, E2 de la variante D2, en contraste con E2 de la variante A1/2, no reprime

significativamente la transcripción de los oncogenes E6 y E7 [130]. Además, la región de control de D2 (LCR) es menos susceptible a la represión de la proteína E2 en experimentos *in vitro* [131]. Si esto ocurre *in vivo*, la expresión de oncogenes virales en las infecciones de D2 puede ocurrir inmediatamente después de la infección, ya que ninguna proteína E2 reprime el LCR viral. En contraste, en las infecciones del linaje A, la progresión a etapas más avanzadas puede tener lugar más lentamente, ya que la transcripción de los oncogenes E6 y E7 es reprimida por la proteína E2 [130, 132]. El gen E2 del linaje A se puede perder durante la integración viral en el genoma del huésped con más frecuencia que el gen E2 del linaje D [97, 126, 130, 133]. Sin embargo, esto parece ocurrir en etapas tardías del proceso oncogénico [134, 135]. Basado en experimentos *in vitro* comparativos, la proteína E2 de D3, que difiere en cinco posiciones con la proteína E2 de D2, reprime la expresión de los oncogenes virales de manera similar a la proteína E2 del linaje A [130]. Por lo tanto, como ocurre con el linaje A, esto también podría explicar el retraso en la progresión de CC.

Otro factor que podría estar involucrado en la presentación de CC relacionado con la edad es el número de copias virales en el tumor [136, 137]. En casi todos los CC, el linaje D conserva los genes E1/E2 y la carga viral es muy alta; en promedio, el doble de la carga viral presente en los tumores infectados por el linaje A [82]. A medida que aumenta la carga viral, la expresión de los oncogenes viral aumenta linealmente [130]. Sin embargo, esto no parece ser un factor clave en el desarrollo de CC, ya que D3 también tiene una carga viral alta. Por el contrario, el oncogén E6 del linaje D tiene más habilidades de immortalización, transformación y tumorigénesis que E6 del linaje A [82, 127, 129]. Estas habilidades aumentadas se han explorado utilizando el gen E6 de D3. Puesto que D2 y D3 comparten las mutaciones Q14H, H78Y y L83V en E6 [101, 138], que están relacionados con la unión y la degradación de p53, asumimos que D2 también tiene estas habilidades. Sin embargo, no se sabe si el otro cambio en E6 (I27R), encontrado exclusivamente en D2 y relacionado con los epítomos de células T [139], podría contribuir en la diferencia de edad de presentación y riesgo de desarrollar CC asociado a este variante en este estudio. Este cambio, que se encuentra en el 92% de los casos de CC positivos a D2

explorado en este estudio, ha sido poco informado en otros estudios debido a la muy baja frecuencia de D2 [78, 140, 141, 142].

Por otra parte, en este trabajo encontramos que 2.4% de los casos de CC estaban relacionados con un VPH de bajo riesgo, principalmente 6 y 11. Esta misma proporción se ha encontrado en otras publicaciones donde se han explorado grandes muestras [16, 143, 144, 145]. Aunque estos tipos virales tienen bajo o nulo potencial oncogénico, existen datos aislados que describen mutaciones en los oncogenes de estos tipos que podrían aumentar su oncogenicidad [40, 41]. Por otra parte, este hallazgo podría estar relacionado con el muestreo de los tumores. Se ha reportado que frecuentemente los tumores invasores de CC tienen LIEBG contiguas relacionadas por VPH de bajo riesgo [146, 147]. Aunque el método de tipificación de VPH en este estudio tiene limitaciones para detectar múltiples infecciones, la frecuencia que encontramos en este estudio es similar a la reportada en la mayoría de publicaciones de CC [16, 76, 116,].

Se han reportado con frecuencia las coinfecciones de VPH16, 18 o 45 con otros virus de alto riesgo, pero con menor potencial oncogénico. Se hecho, sólo un pequeño porcentaje (<3%) de estas infecciones progresan a LIEAG en un tiempo de 10 años [115, 116]. Por lo tanto, en el caso de coinfecciones en mujeres mayores, VPH16, 18 o 45 podrían infectar tardíamente el cuello uterino y ser el tipo viral que realmente conduce el proceso carcinogénico. Por otro lado, como era de esperarse, la conducta sexual de bajo riesgo (>18 años de edad de la primera relación sexual, 1 pareja sexual) y los tipos de VPH con un potencial oncogénico reducido (VPH distintos a 16, 18 y 45) se asociaron independientemente con el inicio tardío de CC.

La frecuencia de las variantes D2 y D3 en esta serie fue muy similar a las ya reportadas en un estudio anterior [96], sin embargo el riesgo de desarrollar CC en ese estudio de casos y controles en relación a la infección por estas variantes fue 9 veces mayor al del riesgo por las variantes A1/2. Esto se debe a la diferencia en la frecuencia de las variantes en ese grupo control. Las poblaciones analizadas en cada estudio fueron diferentes. En el primero, la población tenía seguridad social, mientras que en el presente estudio, las pacientes no contaban con este servicio y eran de un

menor estrato socioeconómico. Existen evidencia moleculares de que la población mexicana más pobre tiene un componente genético amerindio mucho mayor que las de clase media y alta [148]. Se piensa que el linaje D no se generó en América, por su ancestría. Investigaciones recientes sobre el origen de VPH16 sugieren un antepasado de la variante D que evolucionó antes de que los primeros pobladores de América cruzaran el estrecho de Bering. Sin embargo, el origen de las variantes de D2 y D3 no está completamente claro, ya que la distribución de las mismas en todo el mundo es diferente. Mientras que la distribución de D2 es mucho más común en América [100, 101], D3 tiene una distribución global [141]. Además, es muy interesante que la población estudiada tenga una mutación diferente en la posición 7729 (T) de LCR en D2, posiblemente representando una variante fundadora que se ha diseminado en México. La distribución de las variantes de VPH16 en más países pudiera revelar su origen. Para determinar cómo la frecuencia de las variantes de D está relacionada con la mezcla poblacional amerindia, será necesario realizar un estudio detallado que incluya mapeo genético [149].

El CC es una complicación poco frecuencia de la infección por VPH. Las infecciones son transitorias y no evolucionan a LIE [114, 115]. Esto sugiere que la infección por VPH por sí sola no causa CC. Otros factores, tales como duplicación, delección, mutación puntual o regulación epigenética de los genes del huésped, contribuyen a la oncogénesis. Es ese escenario, se espera que los tumores positivos a tipos distintos de VPH16, 18 y 45, en las mujeres mayores, evolucionan a un estado invasivo a través de la acumulación de un mayor número de alteraciones genómicas que las necesarias para los tumores positivos para VPH16, 18 o 45. En el análisis de 330 casos de esta misma serie con secuenciación de próxima generación [150], se demostró que el número de mutaciones aumentaba con la edad de las pacientes con CC. Los datos sugieren que en las mujeres mayores de 50 años, especialmente CCE en estadios avanzados, el papel de VPH parecería ser secundario y otros factores podrían desempeñar el papel principal en el proceso de oncogénesis.

Finalmente, se puede afirmar que una de las fortalezas de este estudio fue el número de casos de VPH16 asociados con CC positivos para el linaje D que fueron

analizados, especialmente la variante D2. En el estudio de casos-casos y casos-controles demostramos estadísticamente el mayor riesgo conferido por D2 para el desarrollo de CC antes de los 50 años, tanto en CCE como en ACC, en comparación con el grupo de mayor edad y con el grupo control, respectivamente.

CONCLUSIONES

- Existe diferencia en la frecuencia de los tipos virales y la edad de presentación de CC.
- La infección simple de los tipos virales más oncogénicos 16, 18, 45 y 39 es más frecuente en las mujeres jóvenes (35 años). Sólo VPH16 sigue la tendencia típica de dos picos (61-65 años).
- Las mujeres de mayor edad, tienen infecciones por virus de menor potencial oncogénico. El papel de VPH parecería ser secundario y otros factores podrían desempeñar el papel principal en el proceso de oncogénesis.
- Las variantes de VPH16 se asocian de manera diferente con la edad de presentación de CC: D2 se asocia con las pacientes ≤ 49 años de edad y D3 con pacientes ≥ 50 años, mientras que A1/2 se distribuye uniformemente entre los dos grupos de edad.
- En el estudio de casos y controles, demostramos que los factores del estilo de vida se asocian a la edad de presentación de CC temprana o tardía; sin embargo, el riesgo conferido por estos factores es muy por debajo del conferido por el factor viral. La edad de la primera relación sexual, el número de niños y la no asistencia al programa DOC se asocian con CC independientemente del tipo viral en ambos grupos de edad. El número de parejas sexuales se asocia independientemente sólo con las mujeres jóvenes.

PERSPECTIVAS

- Al demostrar que existe diferencia en la frecuencia de los tipos virales más oncogénicos (VPH16 y VPH18), la cobertura de las vacunas comerciales disponibles en México sería del ~75% en mujeres jóvenes y el ~55% en mujeres mayores de 50 años. No existe aún evidencia de competencia entre los tipos de VPH y las mujeres ya vacunadas podrían estar en riesgo de adquirir infecciones por los otros tipos virales y desarrollar posteriormente CC. Estos resultados demuestran la necesidad de continuar analizando la frecuencia de los tipos virales diferentes a VPH16/18 en la población vacunada.
- En el análisis de 330 casos de esta misma serie con secuenciación de próxima generación, se demostró que el número de mutaciones aumentaba con la edad de las pacientes con CC. Sería importante determinar la asociación de el número de mutaciones y genes relacionados con el tipo y variante viral.
- La variante D2 de VPH16 no existe o es poco frecuente fuera de México. En este estudio encontramos dos mutaciones que no son consideradas SNV diagnósticos por Burk, quizás por los pocos casos analizados por el autor. Dado que en este estudio contamos con 50 muestras positivas para esta variante, sería importante secuenciar el virus en su totalidad para verificar si hay mutaciones en otras posiciones no reportadas con cambios funcionales importantes.
- El origen de las variantes de D2 y D3 no está completamente claro, ya que la distribución de las mismas en todo el mundo es diferente. Para determinar cómo la frecuencia de las variantes de D está relacionada con la mezcla poblacional amerindia, será necesario realizar un estudio detallado que incluya mapeo genético.

REFERENCIAS

1. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-9.
2. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25 Suppl 1:2-23.
3. Bernard HU. Regulatory elements in the viral genome. *Virology*. 2013;445(1-2):197-204.
4. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
5. Bravo IG, Félez-Sánchez M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health*. 2015;2015(1):32-51.
6. Varsani A, Kraberger S, Jennings S, Porzig EL, Julian L, Massaro M, et al. A novel papillomavirus in Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*) faeces sampled at the Cape Crozier colony, Antarctica. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 6):1352-65.
7. Nasir L, Brandt S. Papillomavirus associated diseases of the horse. *Vet Microbiol*. 2013;167(1-2):159-67.
8. Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology*. 2013;445(1-2):213-23.
9. Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol*. 2005;79(11):7014-23.
10. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*. 2011;6(5):e20183.
11. Haedicke J, Iftner T. Human papillomaviruses and cancer. *Radiother Oncol*. 2013;108(3):397-402.

12. Smola S. Human papillomaviruses and skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;810:192-207.
13. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50.
14. Bosch FX, Manos MM, Muñoz 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;87(11):796-802.
15. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
16. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1048-56.
17. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F55-70.
18. Udager AM, McHugh JB. Human Papillomavirus-Associated Neoplasms of the Head and Neck. *Surg Pathol Clin.* 2017;10(1):35-55.
19. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Goodman MT, Sudenga SL, et al. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer.* 2015;136(12):2752-60.
20. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer. 2013. <http://globocan.iarc.fr>
21. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 10:K1-16.

22. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16086.
23. Doorbar J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. *J Pathol*. 2016;238(2):166-79.
24. Guillaud M, Buys TP, Carraro A, Korbelik J, Follen M, Scheurer M, et al. Evaluation of HPV infection and smoking status impacts on cell proliferation in epithelial layers of cervical neoplasia. *PLoS One*. 2014;9(9):e107088.
25. Magaldi TG, Almstead LL, Bellone S, Prevatt EG, Santin AD, DiMaio D. Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. *Virology*. 2012;422(1):114-24.
26. Evans MF, Peng Z, Clark KM, Adamson CS, Ma XJ, Wu X, et al. HPV E6/E7 RNA in situ hybridization signal patterns as biomarkers of three-tier cervical intraepithelial neoplasia grade. *PLoS One*. 2014;9(3):e91142.
27. Smith SP, Scarpini CG, Groves IJ, Odle RI, Coleman N. Identification of host transcriptional networks showing concentration-dependent regulation by HPV16 E6 and E7 proteins in basal cervical squamous epithelial cells. *Sci Rep*. 2016;6:29832.
28. Gariglio P, Gutiérrez J, Cortés E, Vázquez J. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res* 2009;40(6):449–65.
29. de Araujo Souza PS, Maciag PC, Ribeiro KB, Petzl-Erler ML, Franco EL, Villa LL. Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:246.
30. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, et al. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol*. 2013;87(11):6062-72.
31. Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013;445(1-2):175-86.

32. Richards KF, Bienkowska-Haba M, Dasgupta J, Chen XS, Sapp M. Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2013;87(21):11426-37.
33. Cerqueira C, Liu Y, Kühling L, Chai W, Hafezi W, van Kuppevelt TH, et al. Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure. *Cell Microbiol.* 2013;15(11):1818-36.
34. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(48):20458–63.
35. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* 2010;118(1 Suppl):S12–7.
36. Bienkowska-Haba M, Patel HD, Sapp M. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS pathogens* 2009;5(7):e1000524.
37. Aksoy P, Abban CY, Kiyashka E, Qiang W, Meneses PI. HPV16 infection of HaCaTs is dependent on β 4 integrin, and α 6 integrin processing. *Virology.* 2014;449:45-52.
38. Surviladze Z, Dziduszko A, Ozbun MA. Essential roles for soluble virion associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog* 2012;8(2):e1002519.
39. Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 2009;276(24):7206-16.
40. Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, et al. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002657.
41. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res.* 2009;88(4):307-17.
42. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J* 2010;7:11.

43. Bergant Marušič M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic*. 2012;13(3):455-67.
44. Schäfer G, Blumenthal MJ, Katz AA. Interaction of human tumor viruses with host cell surface receptors and cell entry. *Viruses*. 2015;7(5):2592-617
45. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*. 2009;5(2):e1000318.
46. Plummer M, Peto J, Franceschi S; International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. *Int J Cancer*. 2012;130(11):2638-44.
47. Hwang LY, Scott ME, Ma Y, Moscicki AB. Higher levels of cervicovaginal inflammatory and regulatory cytokines and chemokines in healthy young women with immature cervical epithelium. *J Reprod Immunol*. 2011 Jan;88(1):66-71.
48. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):10516-21.
49. Herfs M, Crum CP2. Cervical cancer: squamocolumnar junction ablation--tying up loose ends? *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(7):378-80.
50. McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*. 2008;72:155-205.
51. McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*. 2013;445(1-2):57-79.
52. Graham SV. Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing. *J Virol*. 2016;90(19):8384-8.
53. Klingelhutz AJ, Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology*. 2012;424(2):77-98.
54. Songock WK, Kim SM, Bodily JM. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. *Virus Res*. 2017;231:56-75.

55. Tomaić V. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers (Basel)*. 2016 Oct 19;8(10).
56. Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett*. 2011;305(2):113-22.
57. Katzenellenbogen RA. Activation of telomerase by HPVs. *Virus Res*. 2017;231:50-55.
58. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS*. 2010;118(6-7):471-93.
59. White EA, Sowa ME, Tan MJ, Jeudy S, Hayes SD, Santha S, et al. Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(5):E260-7
60. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*. 2011;19(1):33-9.
61. Banerjee NS, Wang HK, Broker TR, Chow LT. Human papillomavirus (HPV) E7 induces prolonged G2 following S phase reentry in differentiated human keratinocytes. *J Biol Chem*. 2011;286(17):15473-82.
62. Krawczyk E, Supryniewicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol*. 2008;173(3):682-8.
63. Krawczyk E, Supryniewicz FA, Sudarshan SR, Schlegel R. Membrane orientation of the human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *J Virol*. 2010;84(4):1696-703.
64. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology*. 2013;445(1-2):99-114.
65. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*. 2011;10:140.
66. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology*. 2013;445(1-2):35-56.

67. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013;445(1-2):80-98.
68. Cardone G, Moyer AL, Cheng N, Thompson CD, Dvoretzky I, Lowy DR, et al. Maturation of the human papillomavirus 16 capsid. *MBio*. 2014;5(4):e01104-14.
69. Insinga RP, Perez G, Wheeler CM, Koutsky LA, Garland SM, Leodolter S, et al. Incident cervical HPV infections in young women: transition probabilities for CIN and infection clearance. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(2):287-96.
70. McKenna M, McMenamin M, McDowell A. HPV16 and HPV18 genotyping triage in young women with borderline cytology or mild dyskaryosis: effect of age on genotype-specific risk of high-grade CIN. *Cytopathology*. 2016;27(4):261-8.
71. Mazumder Indra D, Singh RK, Mitra S, Dutta S, Chakraborty C, Basu PS, et al. Genetic and epigenetic changes of HPV16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and associate with disease progression. *Gynecol Oncol*. 2011;123(3):597-604.
72. Moodley M, Sewart S, Herrington CS, Chetty R, Pegoraro R, Moodley J. The interaction between steroid hormones, human papillomavirus type 16, E6 oncogene expression, and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2003;13(6):834-42.
73. Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One*. 2011;6(9):e24451.
74. Yang HJ. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. *Chin J Cancer*. 2013;32(1):42-8.
75. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004;64(11):3878-84.
76. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*. 2008;68(1):307-13.

77. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.
78. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, et al. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012;86(12):6855-61.
79. Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 1985;145(1):181-5.
80. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 1993;67(11):6413-23.
81. Tjalma WA, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM, Kirschner B, et al. Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int J Cancer*. 2013;132(4):854-67.
82. Niccoli S, Abraham S, Richard C, Zehbe I. The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes. *J Virol*. 2012;86(22):12384-96.
83. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F12-23.
84. Chan PK, Chang AR, Yu MY, Li WH, Chan MY, Yeung AC, et al. Age distribution of human papillomavirus infection and cervical neoplasia reflects caveats of cervical screening policies. *Int J Cancer*. 2010;126(1):297-301.
85. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*. 2005;191(11):1808-16.
86. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a

- retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1048-56.
87. Kasamatsu E, Cubilla AL, Alemany L, Chaux A, Tous S, Mendoza L, et al. Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in Paraguay. A study of 432 cases. *J Med Virol.* 2012;84(10):1628-35.
 88. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/estadistica/>
 89. Sankaranarayanan R. Screening for cancer in low- and middle-income countries. *Ann Glob Health.* 2014;80(5):412-7.
 90. Tota JE, Bentley J, Blake J, Coutlée F, Duggan MA, Ferenczy A, et al. Introduction of molecular HPV testing as the primary technology in cervical cancer screening: Acting on evidence to change the current paradigm. *Prev Med.* 2017;98:5-14.
 91. Luu HN, Dahlstrom KR, Mullen PD, VonVille HM, Scheurer ME. Comparison of the accuracy of Hybrid Capture II and polymerase chain reaction in detecting clinically important cervical dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 2013;2(3):367-90.
 92. Espinosa AM, Alfaro A, Roman-Basaure E, Guardado-Estrada M, Palma Í, et al. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer. *PLoS One.* 2013;8(2):e55975.
 93. Saslow D, Andrews KS, Manassaram-Baptiste D, Loomer L, Lam KE, Fisher-Borne M, et al. Human papillomavirus vaccination guideline update: American Cancer Society guideline endorsement. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(5):375-85.
 94. Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(22):7466-74.
 95. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(2):103-4.
 96. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(17):1325-30.

97. Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer*. 1994;56(5):640-5.
98. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, et al. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:W695-9.
99. Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W580-4.
100. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997 Mar;71(3):2463-72.
101. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013;445(1-2):232-43.
102. Berois N, De Cremoux P, Mazal D, Sica A, Cedeira M, Caserta B, et al. Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus genotypes in invasive carcinoma of the uterine cervix in Uruguay. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(3):527-32
103. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(1):46-52.
104. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1:S1-15.
105. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010;202(12):1789-99.
106. Bernard E, Pons-Salort M, Favre M, Heard I, Delarocque-Astagneau E, Guillemot D, et al. Comparing human papillomavirus prevalences in women with normal cytology or invasive cervical cancer to rank genotypes according to their oncogenic potential: a meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis*. 2013;13:373.

107. Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce EC, Berumen-Campos J, Cruz-Valdéz A, Alonso de Ruíz PP, González-Lira G. Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-control study. *Arch Med Res.* 1997;28(2):265-71.
108. Cancer Research UK, Available: <http://www.cancerresearchuk.org/cancerinfo/cancerstats/types/cervix/incidence>.
109. Kane MA, Serrano B, de Sanjosé S, Wittet S. Implementation of human papillomavirus immunization in the developing world. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F192-200.
110. Lazcano-Ponce E, Palacio-Mejia LS, Allen-Leigh B, Yunes-Diaz E, Alonso P, Schiavon R, et al. Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of Papanicolaou coverage, birthrate, and the importance of diagnostic validity of cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(10):2808-17.
111. Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, et al. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009;2(10):868-78.
112. Wheeler CM, Skinner SR, Del Rosario-Raymundo MR, Garland SM, Chatterjee A, Lazcano-Ponce E, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the human papillomavirus 16/18 AS04-adjuvanted vaccine in women older than 25 years: 7-year follow-up of the phase 3, double-blind, randomised controlled VIVIANE study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(10):1154-68.
113. Herrero R, González P, Markowitz LE. Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):e206-16.
114. Cuzick J. Long-term cervical cancer prevention strategies across the globe. *Gynecol Oncol.* 2010;117:S11-4.
115. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(14):1072-9.

116. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(10):2349-59.
117. Maglennon GA, Doorbar J. The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J*. 2012;6:190-7.
118. Gravitt PE. Evidence and impact of human papillomavirus latency. *Open Virol J*. 2012;6:198-203.
119. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J. Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016;138(12):2795-803.
120. Kim CJ, Um SJ, Kim TY, Kim EJ, Park TC, Kim SJ, et al. Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer*. 2000;10(2):157-164.
121. Chansaenroj J, Theamboonlers A, Junyangdikul P, Swangvaree S, Karalak A, Poovorawan Y. Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(2):599-606.
122. Gurgel AP, Chagas BS, do Amaral CM, Nascimento KC, Leal LR, Silva Neto Jda C, et al. Prevalence of human papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil. *Biomed Res Int*. 2015;130828.
123. Pientong C, Wongwarissara P, Ekalaksananan T, Swangphon P, Kleebkaow P, Kongyingyoes B, et al. Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer. *Virol J*. 2013;10:30.
124. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Arbyn M, et al. Prevalence and viral load of 51 genital human papillomavirus types and three subtypes. *Int J Cancer*. 2013 May;132(10):2395-403.
125. García-Piñeres AJ, Hildesheim A, Herrero R, Trivett M, Williams M, Atmetilla I, et al. Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. *Cancer Res*. 2006;66(22):11070-6.

126. Casas L, Galvan SC, Ordoñez 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. *Int J Cancer*. 1999;83(4):449-55.
127. Richard C, Lanner C, Naryzhny SN, Sherman L, Lee H, Lambert PF, et al. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene*. 2010;29(23):3435-45.
128. Jackson R, Togtema M, Lambert PF, Zehbe I. Tumourigenesis driven by the human papillomavirus type 16 Asian-American E6 variant in a three-dimensional keratinocyte model. *PLoS One*. 2014;9(7):e101540.
129. Smith JA, Haberstroh FS, White EA, Livingston DM, DeCaprio JA, Howley PM. SMCX and components of the TIP60 complex contribute to E2 regulation of the HPV E6/E7 promoter. *Virology*. 2014;468-470:311-21.
130. Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendáriz-Borunda J, Berumen J. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 6):1433-44.
131. Hubert WG. Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol*. 2005;79(10):5914-22.
132. Hang D, Gao L, Sun M, Liu Y, Ke Y. Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of human papillomavirus 16 European and Asian variants. *J Med Virol*. 2014;86(4):618-26.
133. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*. 1991;65(2):606-12.
134. Lu X, Lin Q, Lin M, Duan P, Ye L, Chen J, et al. Multiple-integrations of HPV16 genome and altered transcription of viral oncogenes and cellular genes are associated with the development of cervical cancer. *PLoS One*. 2014;9(7):e97588.

135. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 2004;92(3):873-80.
136. Boulet GA, Benoy IH, Depuydt CE, Horvath CA, Aerts M, Hens N, et al. Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(11):2992-9.
137. Broccolo F, Fusetti L, Rosini S, Caraceni D, Zappacosta R, Ciccocioppo L, et al. Comparison of oncogenic HPV type-specific viral DNA load and E6/E7 mRNA detection in cervical samples: results from a multicenter study. *J Med Virol.* 2013;85(3):472-82.
138. Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, et al. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology.* 2006;350(1):216-27.
139. Pillai MR, Hariharan R, Babu JM, Lakshmi S, Chiplunkar SV, Patkar M, et al. Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population. *Int J Cancer.* 2009;125(1):91-103.
140. Huertas-Salgado A, Martín-Gómez DC, Moreno P, Murillo R, Bravo MM, Villa L, et al. E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: an updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology.* 2011;410(1):201-15.
141. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, et al. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2011;121(1):32-42.
142. Badano I, Totaro ME, Culasso AC, Sanabria DJ, Schurr TG, Balette IC, et al. Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. *Infect Genet Evol.* 2015;29:103-9.

143. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621-32.
144. Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(10):e25493.
145. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011;128(4):927-35.
146. Bekkers RL, Bulten J, Wiersma-van Tilburg A, Mravunac M, Schijf CP, Massuger LF, et al. Coexisting high-grade glandular and squamous cervical lesions and human papillomavirus infections. *Br J Cancer*. 2003;89(5):886-90.
147. Guimerà N, Lloveras B, Alemany L, Iljazovic E, Shin HR, Jung-II S, et al. Laser capture microdissection shows HPV11 as both a causal and a coincidental infection in cervical cancer specimens with multiple HPV types. *Histopathology*. 2013;63(2):287-92.
148. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet*. 2014;10(9):e1004572.
149. Goetz LH, Uribe-Bruce L, Quarless D, Libiger O, Schork NJ. Admixture and clinical phenotypic variation. *Hum Hered*. 2014;77(1-4):73-86.
150. Lou H, Villagran G, Boland JF, Im KM, Polo S, Zhou W, et al. Genome Analysis of Latin American Cervical Cancer: Frequent Activation of the PIK3CA Pathway. *Clin Cancer Res*. 2015;21(23):5360-70.