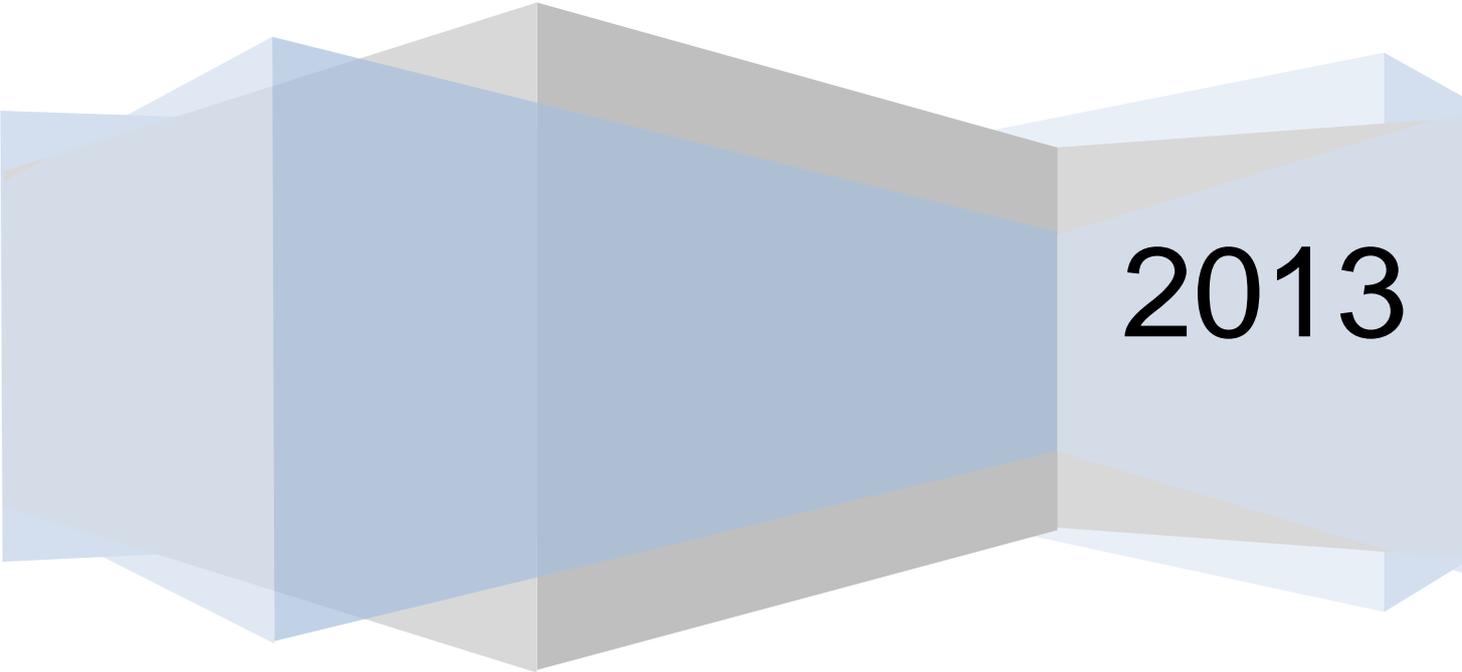


**VARIABILIDAD GENETICA DE VIRUS
PAPILOMA HUMANO TIPO 16
(HPV-16):
UN ESTUDIO MULTICENTRICO**

Jorge Alejandro Basiletti



2013

LUGAR DE REALIZACION: SERVICIO VIRUS ONCOGÉNICOS
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (INEI) –
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS E INSTITUTOS
SALUD (ANLIS) “CARLOS G. MALBRÁN”
BUENOS AIRES, ARGENTINA

VARIABILIDAD GENETICA DE VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 16 (HPV-16): UN ESTUDIO MULTICENTRICO

Maestrando: Bioq. Jorge Alejandro Basiletti

Directora: Dra. María Alejandra Picconi

Tesis presentada para optar por
el grado de magister en microbiología molecular

Buenos Aires, 2013

A mis 2 amores: Flavia y Catalina

Mis gracias totales:

- A mis padres, por todo el esfuerzo para que pueda continuar estudiando y formándome profesionalmente.
- A mis hermanos, sobrinos, tíos, abuelos, suegros, etc, una de las hinchadas más grandes.
- A mi directora, la Dra. María Alejandra Picconi, cuyo estímulo permanente fue muy valioso para que yo pudiera terminar esta tesis.
- A la Dra. Virginia Alonio por sus críticas y comentarios enriquecedores.
- A la Dra. Angélica Teyssié, guía y ejemplo del grupo, del cual orgullosamente formo parte.
- A mis compañeros del Servicio Virus Oncogénicos del Instituto Malbrán por todo el aguante y colaboración: Dolores Fellner, Mariel Correa, Karina Durand, Silvia Núñez, Joaquín González y José Campos.
- A quienes gentilmente colaboraron con las muestras: Gerardo Deluca (Corrientes), Marcelo Ovejero y Pedro Yachelini (Santiago del Estero), Karina Marinic (Chaco), Luciana Caeiro (Córdoba), Javier Liotta e Inés Badano (Misiones), Aida Suárez (Tucumán), Marta Acuña y Carina Sijvarger (Tierra del Fuego).
- Al Servicio Neurovirosis, Dto. Virología (INEI-ANLIS, “Dr. Carlos Malbran”), especialmente a Daniel Cisterna y a Leila Martínez por el servicio de secuenciación.
- A todos mis compañeros del Departamento Virología, especialmente a Mara Russo (Servicio Virosis Respiratorias) por su apoyo en el análisis filogenético y a Sara Vladimirsky (Servicio Hepatitis Virales) por su apoyo en el análisis estadístico.

INDICE DE CONTENIDOS

Introducción	6
El Agente	6
Taxonomía de los Papilomavirus	7
Patogenia	9
Historia natural de la infección por HPV	10
Potencial oncogénico viral	13
Cofactores asociados a la oncogénesis por HPV	15
Epidemiología de la infección por HPV	16
Prevención:	19
- primaria: Vacunas	19
- secundaria: Tamizaje	21
Variabilidad genética del HPV-16	23
Objetivos	25
Materiales y métodos	26
Muestras	26
Detección de variantes en LCR por secuenciación	26
Análisis filogenético de HPV-16	27
Resultados	29
Detección de variantes de HPV-16 por secuenciación de LCR	29
Análisis filogenético de HPV-16 en LCR	35
Discusión	38
Variabilidad genética de HPV-16 y patogenia	38
Análisis filogenético de HPV-16	41
Conclusiones	45
Bibliografía	47

INTRODUCCION

EL AGENTE

El HPV es un virus no envuelto relativamente pequeño de 55 nm de diámetro. Presenta una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros conformados por 2 proteínas: la L1 y la L2. Cada capsómero es un pentámero formado por la proteína mayor de cápside (L1) y cada virión contiene varias copias (alrededor de 12) de la proteína menor de cápside (L2). El genoma del HPV es un ADN bicatenario circular de escasamente 7.900 pares de bases (pb) asociado a histonas y sólo una de las hebras es transcrita activamente (Fields, B.N. et al. 2007), (Bernard, H.U. et al. 2010). Funcionalmente, su genoma se puede dividir en tres regiones distintas:

1. La primera es una región reguladora no codificante de entre 400 a 1000 pb, denominada usualmente región larga de control (del inglés, *Long Control Region, LCR*). Esta región contiene secuencias promotoras y silenciadoras que regulan la replicación del ADN controlando la transcripción de los marcos abiertos de lectura (del inglés, *Open Reading Frames, ORF*). Es la región de mayor variación genómica del virus.
2. La segunda es la región temprana, que contiene los ORF de las proteínas E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7, que están involucradas en la replicación y oncogénesis viral.
3. La tercera es la región tardía, que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2, que conforman la cápside viral.

La Figura 1 representa en forma esquemática la distribución genómica en el HPV.

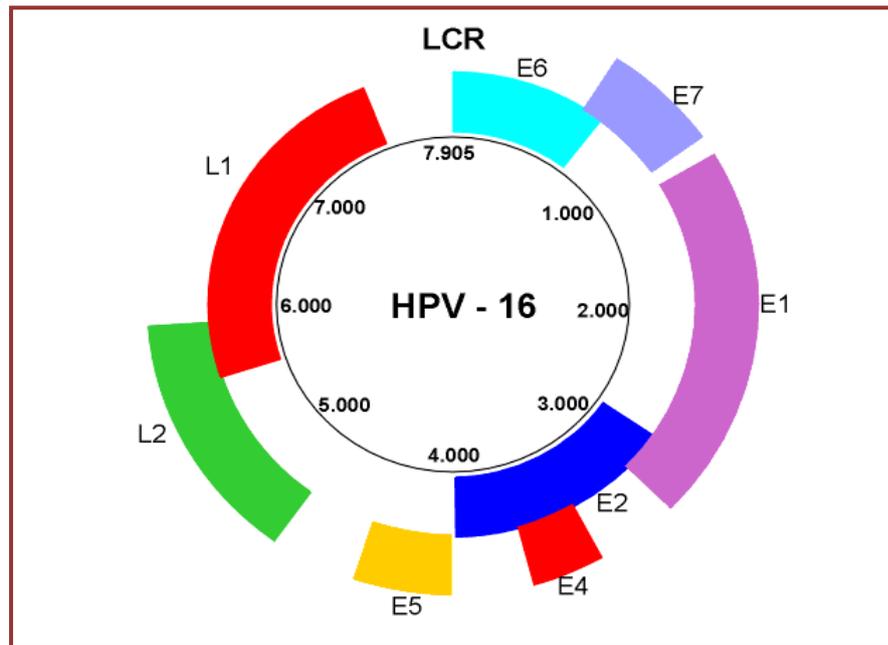


Figura 1. Organización genómica del HPV-16.

TAXONOMIA DE LOS VIRUS PAPILOMA HUMANO

En el año 2004, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (del inglés, *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) reconoció formalmente a la familia Papillomaviridae (de Villiers, E.M. et al. 2004). Actualmente, existen más de 120 VP humanos y animales descritos y cientos de nuevos candidatos que están siendo estudiados y secuenciados.

La familia *Papillomaviridae* incluye géneros, especies, tipos, subtipos y variantes, y cuando se comparan las secuencias de un largo número de PV uno puede observar la formación de un árbol filogenético como el representado en la figura 2. Los géneros se constituyen siguiendo una lógica que asocia los tipos virales que se agrupan en las principales ramas jerárquicas del árbol filogenético. Por lo general, incluyen VP que en la mayoría de los casos tienen características comunes, pero no necesariamente comparten propiedades biológicas.

Las ramas secundarias o menores del árbol se identifican con números que hacen referencia a las especies. En los VP, las especies están constituidas por grupos de genotipos.

El tipo viral también se identifica con un número y actualmente se define como un genoma completo de VP cuya secuencia nucleotídica difiere en la región L1 de cualquier otro en más de un 10%.

El término subtipo se aplica a los genomas de VP que difieren de cualquier otro en 2-10% de su secuencia en la región L1; pero su existencia es escasa, así como su aislamiento e identificación.

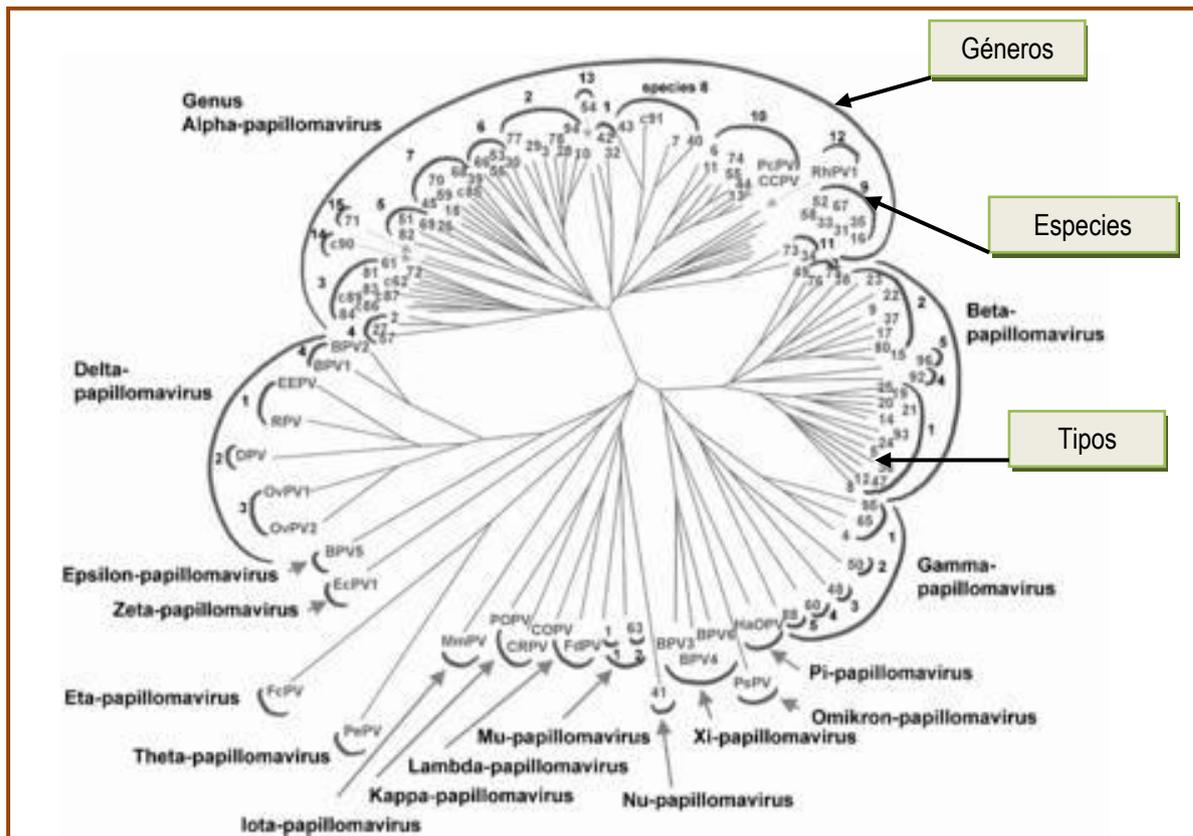


Figura 2. Árbol filogenético de los virus papiloma (Adaptado de E.M. de Villers y col., Virology 2004).

En un nivel análisis más detallado de estos virus, se ha podido observar la existencia de variantes intratípicas, que se definen como genomas con variaciones de hasta un 2% en la secuencia nucleotídica del gen L1 y/o 5% de las regiones no codificantes (Bernard, H.U. et al. 2006), (Bernard, H.U. et al. 2010), (Van Doorslaer, K. et al. 2011) respecto de la secuencia prototipo o genoma de referencia (Primer aislamiento secuenciado de un tipo viral dado) (de Villiers, E.M. et al. 2004).

PATOGENIA

La infección por HPV es muy común y puede afectar tanto la piel como las mucosas, mostrando una especial predilección por células del epitelio escamoso, columnar, cuboidal o de los epitelios de transición (Munger, K. et al. 2004), (Schiffman, M. et al. 2007).

Los HPV cutáneos constituyen un grupo con propiedades biológicas y patogénicas diferentes a las de los HPV mucosos.

Los HPV mucosotropos, se subagrupan según su potencial oncogénico en genotipos de *alto riesgo oncogénico* (HPV-AR) los cuales bajo la forma de infección persistente pueden conducir a la transformación neoplásica; *bajo riesgo oncogénico* (HPV-BR) comúnmente presentes en las lesiones benignas con mínimo riesgo de progresión maligna, y aquéllos de probable alto riesgo oncogénico (HPV-PAR) cuyo potencial carcinogénico está aún en evaluación (Munoz, N. et al. 2003), (Castle, P.E. et al. 2010) (Tabla 1). Para éste último grupo se requieren análisis epidemiológicos adicionales y de mayor amplitud para poder definir su verdadero potencial carcinogénico (Munoz, N. et al. 2003), (Bouvard, V. et al. 2009), (Schiffman, M. et al. 2009).

Bajo riesgo	Probable alto riesgo	Alto riesgo
6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108	26, 53, 66, 68, 73, 82	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

Tabla 1. Clasificación de los HPV mucosotropos de acuerdo a su potencial oncogénico. (Muñoz, N. et al., 2003) (Bouvard V. et al. 2009)

La transmisión se produce por contacto directo con la piel o las mucosas infectadas, a través de traumas y microabrasiones del epitelio. En el caso de los HPV anogenitales, la infección se produce principalmente por contacto sexual. (Doorbar, J. 2007), (Bosch, F.X. et al. 2008), (Stanley, M.A. 2012).

Los HPV mucosos, además de infectar el tracto anogenital, pueden producir

lesiones en la mucosa orofaríngea, digestiva y respiratoria.

La infección por HPV está asociada etiológicamente a prácticamente el 100% de los cánceres de cuello uterino (CCU); también se vincula con el desarrollo de neoplasias extracervicales, tales como: cáncer vulvar ($\approx 50\%$), cáncer vaginal ($\approx 65\%$), cáncer de pene ($\approx 40\%$), cáncer anal ($\approx 95\%$) y cánceres de cabeza y cuello, en especial los orofaríngeos (cavidad nasal, glándulas salivares, amígdalas, lengua, boca) ($\approx 60\%$). (CDC 2013).

Los HPV-BR (más frecuentemente los HPV-6 y 11) pueden generar lesiones proliferativas benignas en la mucosa anogenital (verrugas o condilomas), que por lo general son autolimitadas. Con muy baja frecuencia, pueden también causar la papilomatosis laríngea, caracterizada por su morbilidad debido a las frecuentes recurrencias (Forman, D. et al. 2012), (Patel, H. et al. 2013).

HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR HPV

Se estima que al menos el 70% de la población se infectará con uno o varios genotipos de HPV en el transcurso de su vida sexual activa (Koutsky, L. 1997). La mayoría de las infecciones (con o sin alteraciones citológicas) son *transitorias*; esto significa que son eliminadas o suprimidas por el sistema inmune mediado por células en un período de 1-3 años (90% a los dos años) con una media de 6-18 meses desde la primera exposición (Munoz, N. et al. 2003), (Trottier, H. et al. 2006), (Schiffman, M. et al. 2007).

Dadas las características replicativas de estos virus, la zona del cuello uterino, sitio en el que se reúnen el epitelio columnar del endocervix y el epitelio estratificado denominada zona de transformación (ZT), es el lugar anatómico y fisiológico preferido para el asiento de las lesiones inducidas por HPV (Figura 3). Esto se debe a que en esta zona, un tipo de epitelio reemplaza al otro a través de un proceso denominado metaplasia (Burd, E.M. 2003), (Schiffman, M. et al. 2007) lo que involucra una activa mitosis que favorece al ciclo de vida del virus. El ano y las amígdalas también son ejemplos de tejidos con ZT susceptibles a la carcinogénesis por HPV.

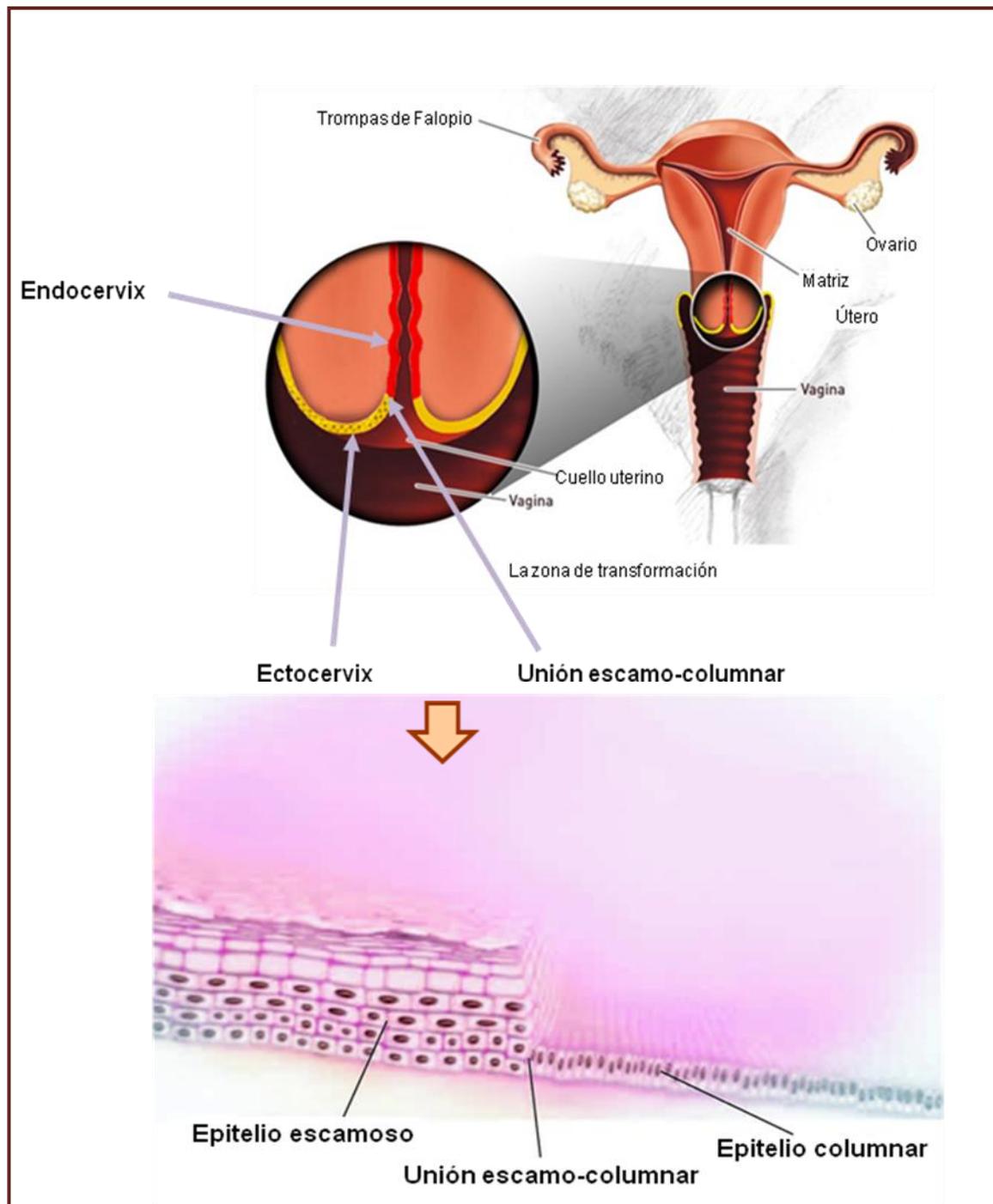


Figura 3: Localización anatómica del cuello uterino (parte superior) y esquema detallado de la unión escamo-columnar (parte inferior).

Durante la infección productiva en las células cervicales pueden observarse cambios morfológicos leves a moderados inducidos por el virus, que se asocian con la *neoplasia intraepitelial cervical grado 1* (CIN 1), también llamadas *lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado* (L-SIL). Por otro lado, existe un grupo minoritario (menos del 20%, aunque numéricamente importante dada la alta circulación viral) de infecciones

producidas por tipos de HPV-AR que *persisten*; éstas son las infecciones que concentran el foco de la atención ya que tienen una elevada probabilidad de avanzar a neoplasias intraepiteliales cervicales grado 2 y 3 (CIN2, CIN3), que juntas forman parte del grupo también conocido como *lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado* (H-SIL), precursoras del cáncer cervical. Se estima que el tiempo necesario para alcanzar esta progresión a cáncer cervical, en caso de permanecer sin tratamiento, es de varios años (hasta más de una década). Esta situación ocurre preferentemente en las mujeres mayores de 30 años; por esta razón, los programas de tamizaje están dirigidos en especial a este grupo etario, con el fin de identificar a las mujeres portadoras de CIN 3/ H-SIL que son lesiones aún curables (Stoler, M.H. 2000) (Figura 4).

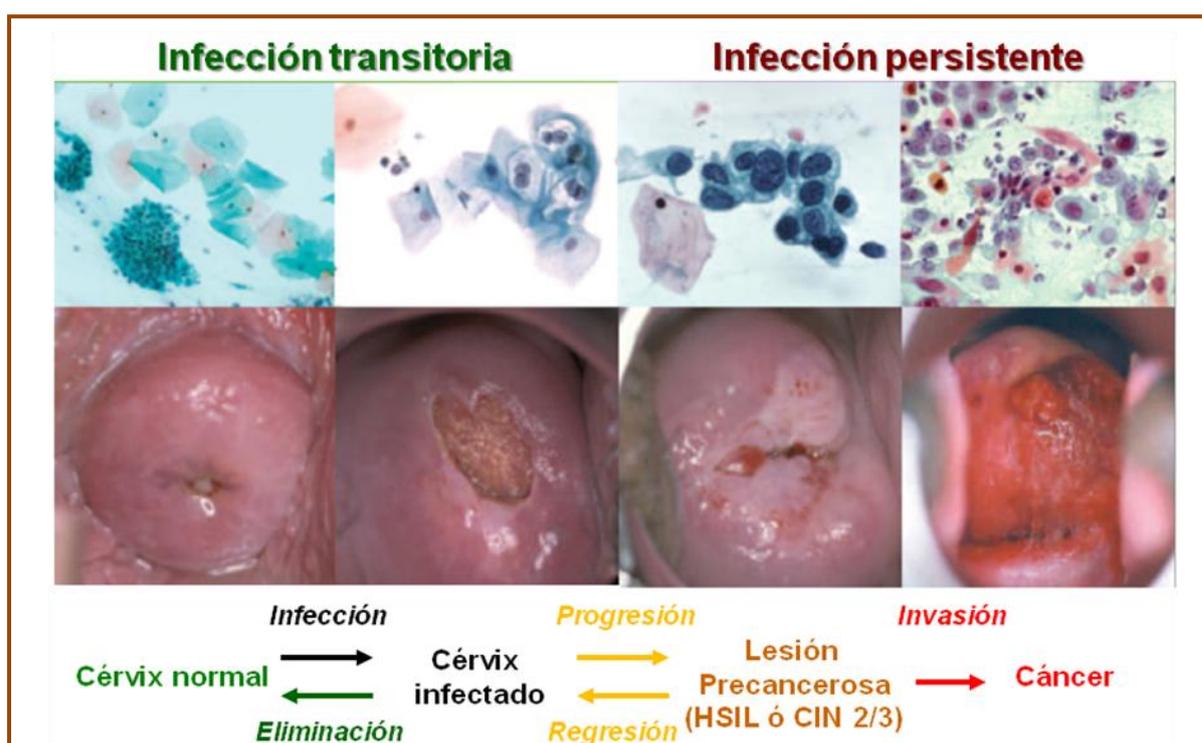


Figura 4. Historia natural de la infección por HPV y desarrollo de cáncer cervico-uterino. En la parte superior pueden observarse fotos correspondientes a citologías exfoliativas del cérvix (tinción de Papanicolaou) y debajo fotos tomadas durante exámenes colposcópicos del cuello uterino. En ambos casos, la gravedad de las lesiones crece hacia la derecha (Adaptado de Schiffman y col, 2007)

La infección por HPV muestra una distribución característica según la edad que ha sido demostrada en numerosos estudios epidemiológicos; muestra un pico en edades tempranas y cercanas a la edad de inicio de relaciones sexuales (IRS) y un descenso, más o menos marcado, a medida que se avanza a edades mayores (Franceschi, S. et al.

2006) (Figura 5). Se sabe, además, que una vez que en la persona infectada el virus se ha hecho indetectable, se puede volver a infectar con el mismo tipo viral (reinfeción) o reactivarse la infección ya adquirida (Schiffman, M. et al. 2007).

Los tipos de HPV-AR muestran mayor tendencia a persistir; en especial para el HPV-16 se ha demostrado una ventaja selectiva para replicarse, mantenerse activo y transmitirse, lo que explica en gran parte su predominio mundial (Khan, M.J. et al. 2005), (Schiffman, M. et al. 2010).

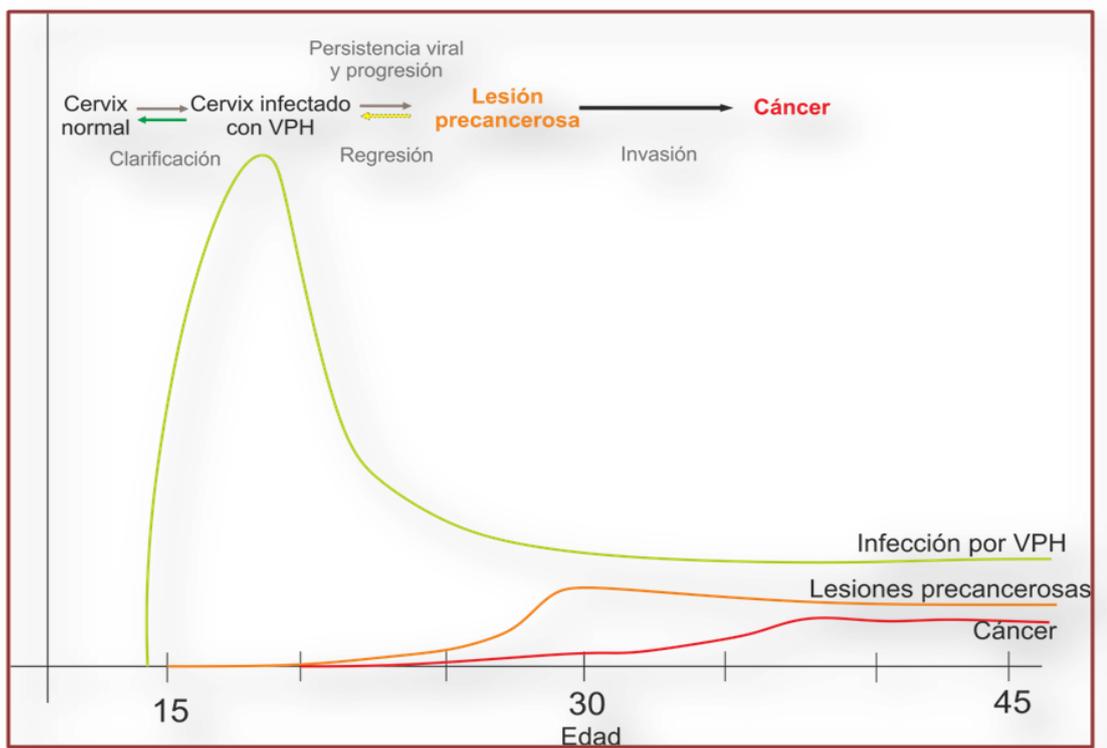


Figura 5. Prevalencia de infección de HPV, de lesiones precancerosas y de CCU, por edad de la mujer. (Adaptado de Schiffman y col., 2005).

POTENCIAL ONCOGÉNICO VIRAL

Numerosos estudios de casos y controles y de seguimiento demostraron la asociación etiológica entre la infección *persistente* por HPV-AR y el cáncer de cérvix y sus lesiones precursoras (Bosch, F.X. et al. 1995), (zur Hausen, H. 1996), (Walboomers, J.M. et al. 1999), (Bosch, F.X. et al. 2002). La suma de los datos epidemiológicos y experimentales obtenidos de las numerosas publicaciones permitió a la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) elaborar en 1995 un documento estableciendo que estos virus son carcinogénicos en humanos (IARC 1995). La asociación entre la infección por los HPV-AR y el cáncer de cérvix cumple con los criterios de causalidad propuestos por Sir Bradford Hill, señalando a esta infección como un factor necesario para la génesis de la neoplasia. De esta manera se puso fin a una controversia, dando un estímulo a la aplicación de la detección viral en el campo clínico y abriendo nuevas posibilidades en el campo de la inmunoprevención. La carcinogénesis por HPV está basada en la capacidad que muestran ciertas proteínas de los virus de *alto riesgo* de interferir en control de la proliferación celular. En las lesiones preneoplásicas severas y los cánceres, el ADN viral se encuentra integrado al genoma de la célula infectada. Este evento involucra la ruptura del gen viral E2, conduciendo a una sobreexpresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 y a la desestabilización del genoma celular. Se demostró *in vitro* que las oncoproteínas E6 y E7 de los HPV-AR presentan la propiedad de unirse con alta afinidad a las proteínas celulares supresoras tumorales p53 y pRB (proteína del retinoblastoma), respectivamente, para luego degradarlas. Otros blancos celulares también serían afectados por la acción de E6 y E7. Como consecuencia de las interacciones de las oncoproteínas virales, hay un exceso de mitosis y desactivación de los mecanismos de apoptosis, originando una inestabilidad genética sostenida que induce la transformación maligna (Munger, K. et al. 2002), (Münger et al. 2004), (Doorbar, J. 2006) (Figura 6).

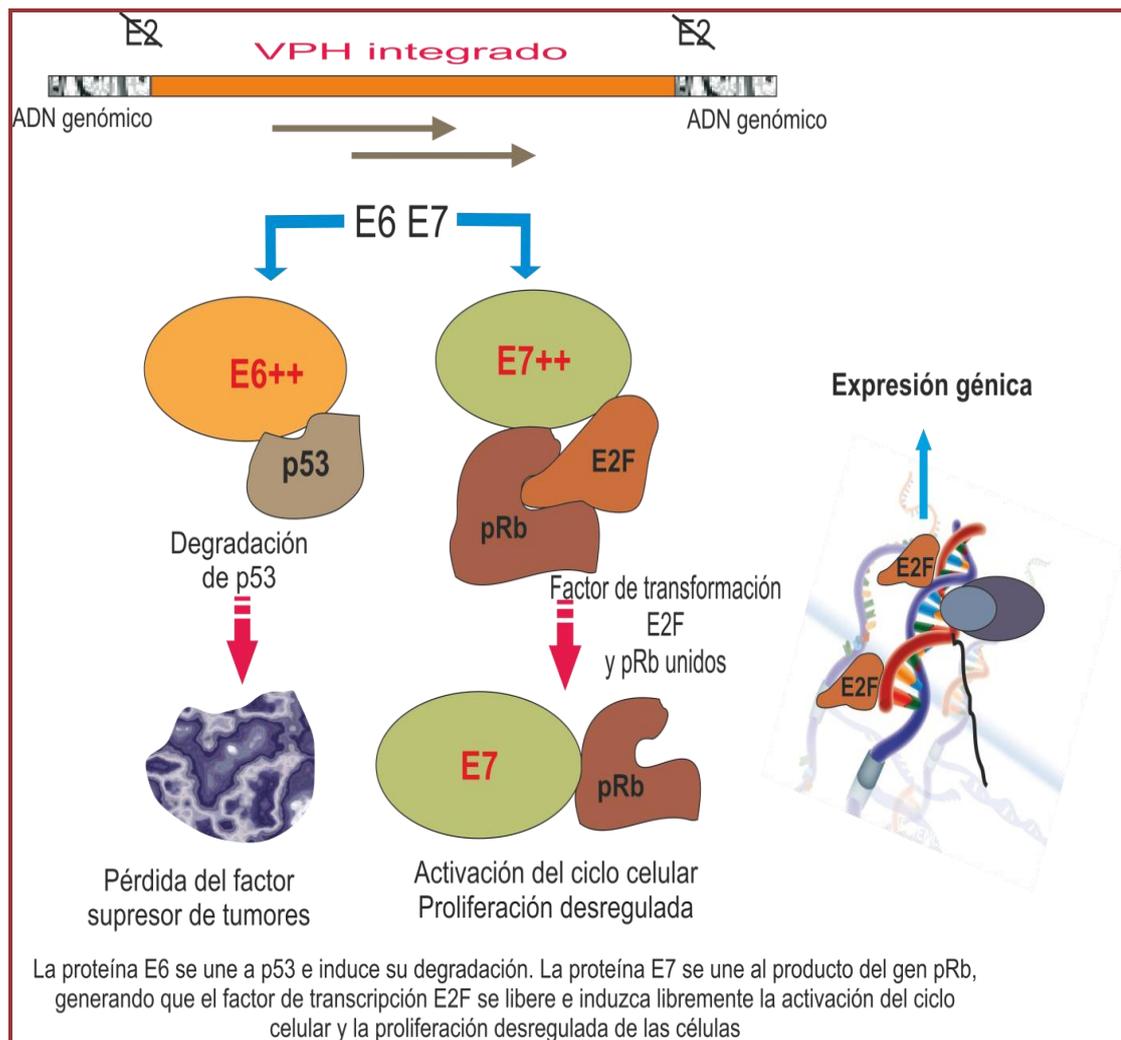


Figura 6. Esquema del mecanismo de carcinogénesis inducida por HPV. Se representa la interacción de las proteínas virales E6 y E7 con las proteínas supresoras de tumores de las células cervicales.

COFACTORES ASOCIADOS A LA CARCINOGENESIS POR HPV

La ubicuidad del HPV y el largo período entre la infección y el desarrollo del cáncer (años), indican que la presencia viral, si bien es necesaria, no es suficiente para generar la neoplasia; otros factores deben contribuir para la transformación maligna. Se han considerado entre otros, la exposición a carcinógenos (tabaquismo), estado nutricional y co-infecciones con patógenos potencialmente oncogénicos (Herpes simplex, clamidias) (Smith, J.S. et al. 2002), (Smith, J.S. et al. 2004), (Deluca, G.D. et al. 2006), (Deluca, G.D.

et al. 2011). Asimismo se consideran críticos los factores del hospedador como el estado inmunológico y hormonal (Munoz, N. et al. 2006), (Wheeler, C.M. 2008).

Las alteraciones genéticas del hospedador constituyen también un foco de atención debido a la naturaleza multietapas de la oncogénesis, en la cual cada paso constituye un cambio genético independiente e irreversible que contribuye a incrementar la desregulación de la proliferación celular. Algunos estudios han mostrado activaciones de oncogenes de la familia ras por mutaciones puntuales en carcinomas cervicales y en lesiones premalignas, asociados con *HPV-AR*; asimismo se ha hallado amplificación en oncogenes C-myc vinculada con progresión maligna en el cérvix (Alonio, L.V. et al. 2000), (Alonio, L.V. et al. 2003), (Landro, M.E. et al. 2008).

Dentro de los factores del hospedador, la respuesta inmune mediada por células constituye la principal vía de control y eliminación la infección por HPV. En los distintos individuos se expresan formas diferentes de los antígenos leucocitarios humanos (HLA), responsables de la amplia diversidad en la selección y presentación de péptidos correspondientes a un determinado antígeno viral. Los haplotipos HLA de un individuo en particular podrían influenciar el curso de la historia natural de una infección por HPV, pudiendo ser uno de los determinantes de la regresión, persistencia o progresión de las lesiones cervicales. Datos publicados sugieren que ciertos haplotipos de los HLA se encuentran más frecuentemente en pacientes con lesiones severas por lo que se consideran “predisponentes” (Ej.: HLA DR4 y DQ*0302), mientras que otros detectados en mujeres infectadas que no desarrollaron lesiones serían haplotipos “protectivos” (Ej.:HLA DR13 y DQ2) (Konya, J. et al. 2001), (Eiguchi, K. et al. 2008).

EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR HPV

Cada año se detectan en el mundo 300 millones de casos nuevos de mujeres infectadas con HPV (infección de transmisión sexual viral más prevalente), 30 millones con lesiones cervicales de bajo grado (LSIL), 10 millones con lesiones cervicales de alto grado (HSIL) y 500.000 casos nuevos de cánceres invasores de cérvix, de los cuales alrededor de la mitad mueren (el 80% de ellos en países en desarrollo) (WHO 2001) (Figura 7).

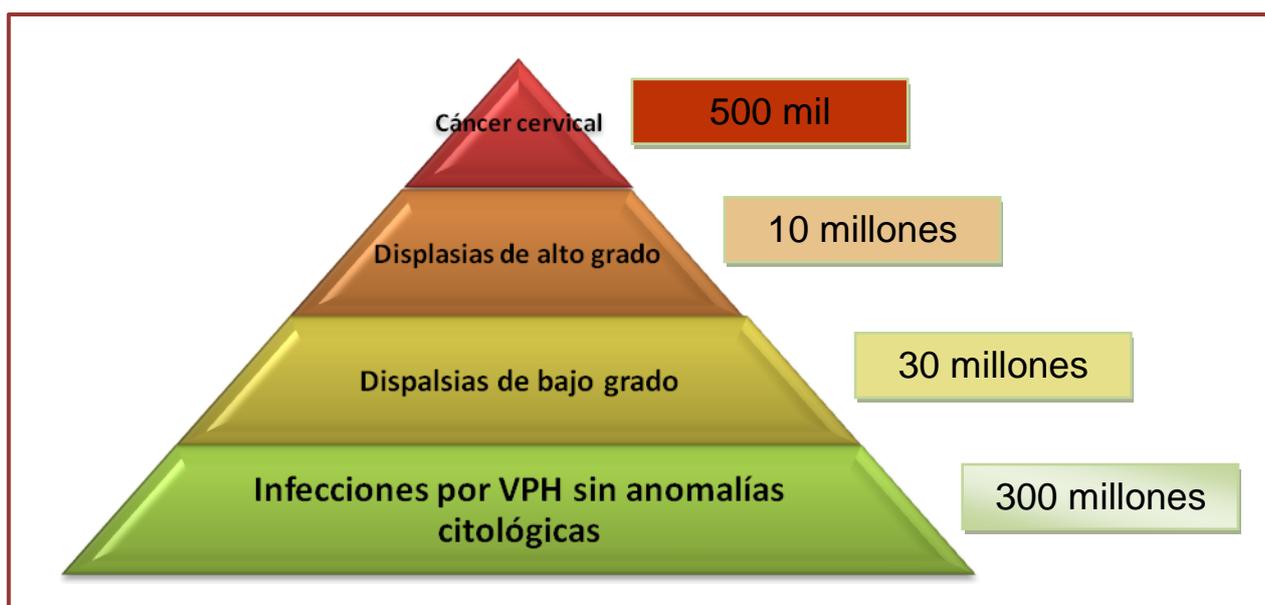


Figura 7. Estimación de la carga mundial de la infección por HPV y las lesiones cervicales asociadas

Este cáncer es el segundo en frecuencia en mujeres en todo el mundo (después del cáncer de mama) y el primero en algunos países en desarrollo, en donde representa el 17% del total de cánceres y afecta en forma creciente a mujeres menores de 45 años. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), su incidencia varía entre 10 casos por 100.000 mujeres al año, en países industrializados donde ha declinado debido a eficientes programas de prevención y diagnóstico precoz, a más de 40 por 100.000 en países en desarrollo. En América Latina y el Caribe, la mortalidad por cáncer cérvico-uterino no ha disminuido en los últimos 30 años, registrándose 32.000 muertes anuales por esta enfermedad (Robles, S. 2006), (Ferlay, J. et al. 2010).

De acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Salud, en Argentina se diagnostican cada año aproximadamente 4.000 casos nuevos de cáncer cérvico uterino y cerca de la mitad mueren a causa de la enfermedad. Su tasa de incidencia era, en 2008, de 17,5/100.000 mujeres y la tasa de mortalidad, ajustada por edad, de 7,4 muertes/100.000 mujeres (MSAL 2011). Los datos medidos de incidencia no sólo son pocos debido a la escasez de registros de tumores, sino que las variaciones regionales impiden extrapolar los datos existentes al país entero. Por ejemplo, se han comunicado incidencias de 14,6/100.000 mujeres para Bahía Blanca y alrededores y cerca del doble para Concordia, Entre Ríos (Loria, D. et al. 2007).

La carga de enfermedad en Argentina no es homogénea: varía según el área. Es muy alta en poblaciones con menor nivel de desarrollo socio-económico, por ejemplo, en Formosa, la tasa de mortalidad entre 2005 y 2009 fue de 18.4/100.000 mujeres; en Misiones fue de 16.8/100.000 mujeres y en Salta, de 15.4/100.000 mujeres. En la Figura 8 pueden observarse las tasas de mortalidad por CCU en orden creciente, correspondientes a las regiones: Sur, Centro, Cuyo, NOA y NEA (MSAL 2011).

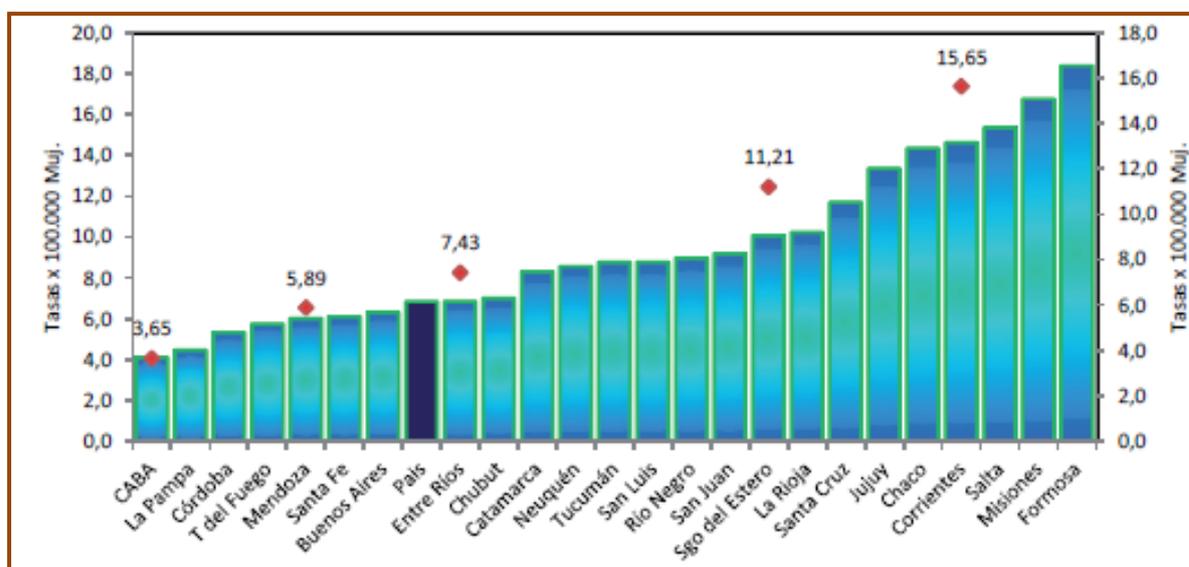


Figura 8. Tasas ajustadas por edad de mortalidad específica por cáncer cérvicouterino por 100.000 mujeres según provincias y regiones del país. Argentina, quinquenio 2005-2009. Fuente: Datos de mortalidad de la DEIS. SIVER- Instituto Nacional Del Cáncer, Ministerio de Salud de la Nación.

La distribución de los distintos tipos virales varía de acuerdo al diagnóstico citohistológico. En mujeres con citología cervical normal, la positividad para HPV oscila entre 10 y 15% a nivel mundial (Bruni, L. et al. 2010). En nuestro país, el estudio poblacional llevado a cabo por la IARC en mujeres de Concordia (Entre Ríos), mostró una prevalencia de la infección por HPV de 16,6%, con un pico en menores de 25 años, similar a datos de otros lugares del mundo (Matos, E. et al. 2003). En las muestras con citología normal HPV positivas, se puede identificar una amplia variedad de tipos virales; en general, ocupa el primer lugar el HPV16, aunque sin predominio marcado.

En todas las lesiones intraepiteliales del cuello uterino (SIL) se detecta HPV, ya que es su agente causal. Sin embargo, el espectro de los tipos virales que pueden identificarse va variando a medida que avanza el grado de severidad. En las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) puede encontrarse gran diversidad de tipos virales; en

un metaanálisis mundial se observó que el HPV16 fue el virus más frecuente (26.3%), seguido de HPV31 (11.5%), HPV51 (10.6%) y HPV53 (10.2%) (Clifford, G.M. et al. 2005).

En las lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) el espectro de tipos virales se va restringiendo, con predominio de los virus de alto riesgo oncogénico, en especial HPV16 y 18 (50%) (Clifford, G.M. et al. 2003), (Ciapponi, A. et al. 2011).

En el CCU, la positividad para HPV es virtualmente del 100%. Los tipos virales que ocupan el primero y segundo lugar son los HPV16 y HPV18, respectivamente, alcanzando juntos alrededor del 70% de la etiología de las neoplasias a nivel mundial (Li, N. et al. 2010), (de Sanjose, S. et al. 2010). En América Latina y el Caribe, el mayor metaanálisis realizado que incluyó más de 5.500 CCU confirmó este hallazgo, siendo los siguientes seis tipos de los HPV-AR más comunes, los HPV- 31, 45, 33, 52, 58 y 35, que sumados a los HPV- 16 y 18 son responsables del 86,5% de esta neoplasia en la región (Ciapponi, A. et al. 2011). En este estudio, el subgrupo de 1.000 cáncer cérvico-uterino provenientes de Argentina mostró una prevalencia de HPV-16 del 59,5% y de HPV- 18 del 17,6%; sumados alcanzan un 77%, por lo que las vacunas actualmente licenciadas que incluyen a estos tipos virales en su fórmula son apropiadas para nuestra población (Munoz, N. et al. 2004).

Esta predominante circulación de HPV-16 estaría fundamentada en ventajas que muestra este virus en cuanto a una mayor capacidad en su transmisión, persistencia y transformación.

PREVENCIÓN

PRIMARIA: Vacunas

En las dos décadas pasadas se hicieron enormes progresos en el desarrollo de vacunas contra HPV que culminaron en la aprobación de la primera generación de las mismas. Se trata de vacunas recombinantes a subunidades, empleando el sistema de partículas semejantes a virus (del inglés, *Virus Like Particles, VLPs*) (Munoz, N. et al. 2004) (Cutts, F.T. et al. 2007) (Schiller, J.T. et al. 2008). Esta estrategia de ingeniería genética se basa en el clonado del gen que codifica la proteína mayoritaria de la cápside viral (L1) en un vector de expresión, que cultivado en un sistema adecuado produce dicha

proteína; cuando su concentración en el medio de cultivo es suficientemente alta, las moléculas de proteína se auto-ensamblan generando cápsides virales vacías (VLP), cuya morfología es casi idéntica a la del virus nativo, pero sin genoma. Las VLPs muestran la conformación “natural” de los epítopes estructurales del virus requerida para la inducción de anticuerpos neutralizantes (Stanley, M. 2010).

Existen dos vacunas licenciadas en más de 120 países, incluyendo la Argentina. Ambas están basadas en el mismo principio biotecnológico y requieren ser administradas por vía intramuscular, en 3 dosis; sin embargo, presentan diferencias en su formulación, adyuvantes y células de cultivo en las que se producen (Paavonen, J. et al. 2007). Una es bivalente (*Cervarix*; GlaxoSmithKline), dirigida contra HPV-16 y HPV-18 (responsables de alrededor del 75% de los casos de CCU a nivel mundial) y licenciada por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de Argentina (ANMAT) en marzo 2008; la otra es tetravalente (*Gardasil*; Merck Sharp & Dohme), dirigida contra HPV 16, 18, 6 y 11 (causantes de lesiones cervicales severas y CCU y de la mayoría de las verrugas genitales (condilomas), licenciada por ANMAT en octubre 2006 (MSAL 2011).

Estas vacunas fueron diseñadas para inducir una respuesta inmune humoral con producción de anticuerpos neutralizantes. Ambas mostraron una elevada inmunogenicidad en los ensayos clínicos, con una tasa de seroconversión del 100% y con títulos de anticuerpos 10-100 veces superiores a los generados por una infección natural. Además, la eficacia podría ser ampliada por una protección adicional para la infección y enfermedad causada por tipos de HPV no vacunales, relacionados filogenéticamente con aquéllos incluidos en las fórmulas vacunales. La protección cruzada ha sido informada para ambas vacunas. Individuos inmunizados con la vacuna tetravalente mostraron protección contra los H-SIL causados por HPV 31, 33, 35, 52 y 58 e individuos inmunizados con la fórmula bivalente presentaron un muy alto nivel de protección cruzada para los tipos HPV 31, 33, 45 y 51 (Stanley, M. 2010), (Schiller, J.T. et al. 2012).

En los ensayos clínicos las vacunas fueron bien toleradas y sólo se refirieron efectos adversos locales menores como dolor leve a moderado y eritema en el sitio de inyección. En junio de 2007, el Comité Global Asesor de la OMS para la Seguridad de Vacunas (GACVS) concluyó que ambas vacunas tuvieron buenos perfiles de seguridad (Lu, B. et al. 2011).

Dada la característica profiláctica de estas vacunas (no tienen efecto sobre

infecciones preexistentes), previenen la infección en individuos que no tuvieron contacto previo con el virus. Desde el punto de vista de la salud pública, el máximo beneficio se obtendría inmunizando las niñas entre 9 y 13 años, previo al inicio de la actividad sexual; sin embargo, existen diversas estrategias y cada país decide la política a aplicarse en concordancia con la magnitud del problema en su población y sus posibilidades económicas (Clifford, G.M. 2009), (Luciani, S. et al. 2009), (Luciani, S. et al. 2011).

El Ministerio de Salud de la Nación, a través del Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles (PRONACEI) ha introducido en el año 2011 la vacuna bivalente en el Calendario Nacional de Vacunación, en forma gratuita y obligatoria para niñas de 11 años (MSAL 2011).

La primera generación de vacunas contra HPV ha demostrado ser segura, inmunogénica y eficaz, y se espera que provea un protección a largo plazo, por lo que la OMS ha recomendado su implementación (WHO 2009). Mientras nuevos ensayos clínicos y el seguimiento de aquéllos que ya están en marcha enriquecen la información disponible acerca de la eficacia, la seguridad, la duración de la protección y la necesidad de refuerzos, la evidencia actual es suficientemente robusta como para apoyar la introducción de la vacunación contra HPV en los programas nacionales de inmunizaciones.

SECUNDARIA: El tamizaje poblacional

Tradicionalmente, el tamizaje para la prevención del CCU se hizo por el examen citológico de las células cérvico-vaginales, desarrollado por Georges Papanicolaou en la década del 50'. Este examen, conocido como Pap, se basa en la búsqueda de células anómalas indicativas de lesiones precancerosas o cancerosas (Papanicolaou, G.N. 1957).

En los países desarrollados, la experiencia ha mostrado que la implementación de programas organizados basados en la citología con control de calidad, ha logrado reducir significativamente la incidencia y mortalidad por CCU. Sin embargo, los países latinoamericanos que han implementado esos programas de prevención se han encontrado con limitaciones para alcanzar el impacto deseado en la carga de esta enfermedad. Las principales limitaciones se asocian con la baja cobertura de mujeres tamizadas, el bajo porcentaje de mujeres con Pap anormal que son efectivamente

seguidas y tratadas; la baja sensibilidad del Pap, lo que obliga a repeticiones frecuentes para reducir el porcentaje de falsos negativos; entre otros factores que en su conjunto han contribuido a la baja efectividad de la prevención basada en la citología (MSAL 2008), (Cuzick, J. et al. 2008).

En consecuencia, desde la década de los 90, se han venido estudiando pruebas de tamizaje alternativas, principalmente la detección del ADN del HPV. Más recientemente se han evaluado estrategias de tamizaje combinando diversas pruebas con esquemas de diagnóstico y tratamiento de lesiones detectadas que se realizan en una o dos visitas al servicio de salud y aseguran una mayor adherencia y costo-efectividad de los programas de tamizaje (Almonte, M. et al. 2010), (Cuzick, J. et al. 2012).

Las pruebas de HPV ofrecen numerosas ventajas cuando se la compara con el tamizaje citológico. Sin embargo, aún entre las mujeres mayores de 30 años, la relación entre cáncer cervical e infección transitoria es baja y los ensayos de HPV deben resolver el problema intrínseco de un valor predictivo positivo bajo. Esta menor especificidad de las pruebas de HPV requiere de una prueba adicional (“*triage*”) en las mujeres que son positivas para ADN de HPV en el tamizaje primario, para poder identificar a aquéllas que están en riesgo de ser portadoras de una lesión precursora del cáncer cervical y tranquilizar a aquéllas que sólo tienen una infección transitoria o de bajo riesgo. El *triage* incluye los métodos de inspección visual, la citología y los biomarcadores moleculares (ARNm de E6/E7 de los HPV-AR, proteína E6 de los HPV-AR, p16). Actualmente, se están desarrollando algoritmos que emplean como tamizaje primario la prueba de HPV, bajo diferentes contextos y adaptándose a las necesidades locales (Chan, P.K.S. et al. 2012), (Meijer, C.J. et al. 2009), (Meijer, C.J. et al. 2009), (Dillner, J. et al. 2010), (Snijders, P.J. et al. 2012).

Un amplio espectro de pruebas de HPV está disponible, con diferentes características técnicas y propiedades analíticas y de utilidad clínica. Para la elección deben considerarse no sólo los aspectos económicos y prácticos, sino que la prueba este validada para ese fin (Picconi, M.A. et al. 2012).

En nuestro país, el Ministerio de Salud de la Nación ha aprobado la incorporación de la prueba virológica como tamizaje primario para la prevención del CCU, en un esquema integral que incluye el diagnóstico y tratamiento de lesiones detectadas. En el año 2011, el Instituto Nacional del Cáncer, a través del Programa Nacional de Prevención de Cáncer Cérvico-uterino, ha iniciado la implementación de esta prueba en los servicios

de salud de la provincia de Jujuy; en 2013 se sumarán las provincias de Neuquén, Catamarca y Misiones y se espera que este ensayo se vaya incorporando gradualmente al resto del país (MSAL 2011).

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL HPV-16

Los HPV son genéticamente estables; mutan muy lentamente debido a que su genoma es ADN doble cadena y que para su replicación usan la DNA polimerasa de alta fidelidad de la célula hospedadora. Sin embargo, se han identificado diversas *variantes intratípicas* mediante el análisis de distintas regiones genómicas virales (Bernard, H.U. 2005), (Bernard, H.U. et al. 2006), (Doorbar, J. 2006).

Los polimorfismos nucleotídicos pueden ocurrir a través de mutaciones al azar que luego se establecen y se fijan en una población. (Chan, S.Y. et al. 1992) (Bernard, H.U. et al. 2006).

Los estudios de la variabilidad genética se iniciaron con HPV-16 por ser el virus de *alto riesgo* más prevalente en cáncer de cérvix, a nivel mundial (Bosch, F.X. et al. 2002), (Li, N. et al. 2010), (de Sanjose, S. et al. 2010), esto podría explicarse por una alta eficiencia replicativa y elevada capacidad para persistir del HPV-16 en relación a otros tipos virales de alto riesgo.

El HPV-16 fue secuenciado por Seedorf y col. en 1985 (Seedorf, K. et al. 1985); a este primer aislamiento se lo conoce como *clon referencial o prototipo*. Fue revisado en 1995 por Myers y col. lo que permitió corregir un error de 2 bases en la lectura del ORF de LCR (Myers, G. et al. 1995).

Existen numerosas variantes producidas en la naturaleza que ya han sido identificadas.

El primer estudio multicéntrico internacional de las variantes de HPV-16 fue llevado a cabo por Ho y col. en 1993 (Ho, L. et al. 1993) y estuvo basado en la comparación de la secuencia de un fragmento de 364 pb de LCR, a partir de aislamientos de HPV-16 realizados en muestras cérvico-vaginales provenientes de 25 regiones geográficas del mundo. Este trabajo determinó que las variantes de HPV-16 en LCR segregan de manera robusta generando un árbol filogenético con 5 principales linajes o ramas: la europea (E), asiática (As), Asiático-americana (AA), y 2 linajes africanos (Africano 1 y 2; Af-1 y Af-2). El *prototipo* de HPV-16 quedó incluido dentro de la rama E (E-P). Los nombres de las ramas

derivan del origen geográfico de las poblaciones en las cuales esas variantes son más prevalentes. Posteriormente, Yamada y col. secuenciaron además L1 y E6 y describieron una rama adicional que se llamó Norteamericana (NA) (Yamada, T. et al. 1995).

Las implicancias patogénicas de las variantes no han sido aún esclarecidas, aunque se ha sugerido que las descritas en LCR estarían asociadas con diferencias en su capacidad de unión a factores celulares y virales reguladores de la transcripción y replicación que modificarían su capacidad transformante (Yamada, T. et al. 1997), (Sichero, L. et al. 2006), (Xi, L.F. et al. 2007), (Sichero, L. et al. 2007), (Mendoza, L. et al. 2013). Por otro lado, el estudio de los genes L1 y E6 también ha sugerido que diferencias en su secuencia nucleotídica podrían vincularse con cambios en la respuesta inmune del hospedador y en el potencial oncogénico, respectivamente (Yamada, T. et al. 1995) (Touze, A. et al. 1998) (Villa, L.L. et al. 2000) (Hildesheim, A. et al. 2001).

En la actualidad se observa un renovado interés en el estudio de la variabilidad genética de HPV-16, basado principalmente en la identificación de nuevas variantes y la profundización del conocimiento de su historia evolutiva. Asimismo, el análisis de las diferencias en las propiedades biológicas y patogénicas podría ser de impacto clínico, ya que permitiría discriminar a pacientes portadoras de variantes virales con mayor potencial oncogénico (Sichero, L. et al. 2006), (Xi, L.F. et al. 2007), (Sichero, L. et al. 2007). En Argentina existe escasa información sobre la circulación de variantes de HPV-16; los datos disponibles se restringen a comunidades de aborígenes quechua, guaraníes y pilagá (Picconi, M.A. et al. 2003), (Tonon, S.A. et al. 2007), (Deluca, G.D. et al. 2012). Por lo tanto, resulta de sumo interés ampliar este conocimiento a poblaciones urbanas de distintas provincias argentinas.

OBJETIVOS

General

- Contribuir al conocimiento de la epidemiología molecular de la infección genital por HPV, a través del estudio de las variantes de HPV tipo 16 circulantes en distintas provincias argentinas que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de HPV.

Particulares

- Analizar la variabilidad genética en la región genómica LCR del HPV tipo 16.
- Comparar con los datos obtenidos en otras partes del mundo.
- Evaluar la posible asociación entre la presencia de determinadas variantes de HPV-16 y la severidad de la lesión.
- Analizar la historia evolutiva de las variantes identificadas en esta población a través del estudio filogenético de las secuencias obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Se incluyeron 314 muestras de ADN obtenido de células cérvico-vaginales que fueron previamente identificadas como HPV-16 positivas. Estas muestras fueron recogidas en hospitales públicos de las provincias argentinas y fueron tipificadas en los respectivos laboratorios de referencia de HPV que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de HPV (Corrientes, Santiago del Estero, Chaco, Córdoba, Misiones, Tierra del Fuego y Tucumán).

Dentro del total de las muestras incluidas, hubo 261 que contaban con el diagnóstico citológico realizado en base al Sistema Bethesda 2001 (Solomon, D. et al. 2002); entre ellas 43 correspondían a citología normal, 146 a L-SIL, 59 a H-SIL y 13 a CCU. Cincuenta y tres muestras quedaron sin diagnosticar.

Todas las pacientes dieron el consentimiento para su inclusión en este estudio.

DETECCIÓN DE VARIANTES EN LCR POR SECUENCIACIÓN

Para el análisis por secuenciación de LCR se amplificó un fragmento de 364 pb (posiciones nucleotídicas comprendidas entre 7480 al 7843), mediante una PCR específica para HPV-16 (Ho, L. et al. 1991). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l conteniendo 5 uL de templado, 10 mM Tris HCl (pH 8.5), 50 mM KCl; 1,5 mM Mg_2Cl ; 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 5 U de AmpliTaq (5 U/ μ l; Fermentas) y 50 pmoles de cada cebador (LCR A y LCR B). La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp 2400 con el siguiente programa: 94°C, 60 seg.; 65°C, 90 seg. y 72°C, 120 seg., 40 veces, con extensión terminal a 72°C, 300 seg.

Los productos amplificados fueron evaluados por electroforesis en agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio y posterior observación por transiluminación ultravioleta. Las muestras que fueron negativas para la amplificación por PCR de LCR fueron descartados del estudio.

Una vez confirmados los amplicones, se procedió a la purificación empleando columnas comerciales, según especificaciones del fabricante (Wizard SV Gel and PCR

Clean-UP System, Promega). Brevemente, al volumen de producto de PCR se le agregó igual volumen de la solución de unión a la membrana (*Membrane binding solution*); la mezcla fue transferida a una columna con membrana de sílica la cual está acoplada a un tubo colector. Luego de una incubación de 1 minuto a temperatura ambiente, el conjunto columna-tubo colector se centrifugó a 14000 RPM durante 1 minuto. Se descartó el eluido y se realizaron dos lavados sucesivos (*wash solution*); por último, se procedió a eluir el ADN purificado agregando a la columna 50ul de agua ultra pura, seguido de una centrifugación a 14000 RPM durante 1 minuto.

Posteriormente, se realizó la reacción de secuencia en un volumen final de 10ul conteniendo 1 uL del producto purificado, 1X *sequencing buffer* (Applied Biosystems), 0,5ul de *Big Dye 3.1* (Applied Biosystems), y 25 pmoles del mismo cebador utilizado en la reacción de PCR inicial (LCR A). La amplificación se realizó en un termociclador BioRad Mycycler con el siguiente programa: 96°C, 10 seg.; 60°C, 5 seg. y 60°C, 240 seg., 30 veces.

El producto obtenido fue precipitado con etanol y posteriormente se realizó la secuenciación en forma automática en el equipo Applied Biosystems Hitachi 3500 Genetic Analyzer.

Con el fin minimizar la posibilidad de que las variaciones nucleotídicas observadas fueran artefactos resultantes de errores de la Taq polimerasa, los cambios de secuencia fueron aceptados sólo cuando se reproducían en una segunda PCR.

Cuando los resultados sugerían la presencia de una variante no descrita con anterioridad, se procedió a su confirmación mediante la secuenciación de ambas cadenas del ADN viral.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A fin de evaluar una posible asociación entre variantes virales y la severidad de la lesión se empleó el test de Fisher. Se analizó el diagnóstico citológico (agrupado en Normal/L-SIL y H-SIL/Cáncer) versus variantes.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HPV-16

Con el objetivo de analizar la historia evolutiva de las nuevas variantes identificadas, se evaluaron las secuencias nucleotídicas de un fragmento de 364 pb de la LCR.

Las secuencias fueron comparadas de a pares para finalmente lograr un alineamiento múltiple, mediante la aplicación del programa Clustal W, dentro del software Bioedit (Hall, T.A. 1999).

Para la inferencia de las filogenias se utilizaron distintos métodos, eligiéndose Neighbor joining (NJ) que trabaja sobre matrices de distancia y Maximum Likelihood (DNAML) que compara directamente los caracteres de la secuencia (en este caso, nucleótidos) y Tamura 3 parámetros + G como modelo de evolución. Ambos programas están incluidos en el paquete MEGA 5 (Tamura, K. et al. 2007). La inferencia y construcción del árbol fue asistida por el modelo Neighbor joining (NJ) y la proporción de bootstrapping calculada con 1000 replicas.

RESULTADOS

DETECCIÓN DE VARIANTES DE HPV-16 POR SECUENCIACIÓN DE LCR

De las 314 muestras analizadas, 281 (89.5%) amplificaron el fragmento esperado (Figura 9) y fueron secuenciadas. De éstas, 263 (93.60%) muestras rindieron un electroferograma legible, por lo que éste número fue considerado el definitivo para el análisis de los resultados. La Figura 10 muestra, a manera de ejemplo, el electroferograma obtenido de la secuenciación automática de la muestra ACdb-130.

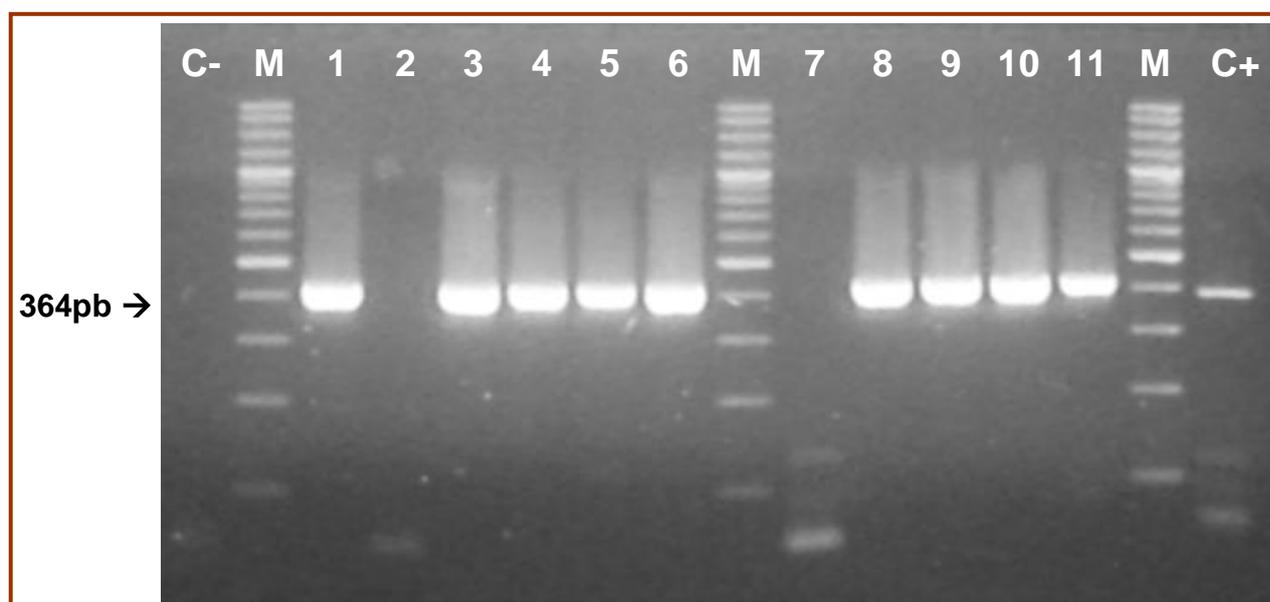


Figura 9. Análisis de los productos de LCR amplificados por PCR, corridos por electroforesis en gel de agarosa al 2% , teñidos con bromuro de etidio y observados por transiluminación ultravioleta. Calles 1-11: muestras; C-: control negativo; C+: Control positivo; M: marcador peso molecular (escalera de a 100 pb). En las muestras positivas, se puede observar la banda correspondiente al tamaño molecular del producto esperado (364 pb).

Se hallaron 8 variantes (Figura 11); de ellas, 5 coincidieron con secuencias ya descritas en otras partes del mundo, tales como E G-1, E G-10, E G-11, AA B-14 y AA IND-8. Además, se identificaron 3 variantes nuevas, denominadas: ACdb-130 (A: Argentina, Cdb: Córdoba), ASgo-326 (A: Argentina, Sgo: Sgo. del Estero) y ACor-159 (A: Argentina, Cor: Corrientes); en la denominación otorgada, la provincia mencionada es aquella en donde se identificó la variante por primera vez.

La tabla 2 muestra la distribución, por provincia, de las variantes identificadas en las muestras analizadas.

Dentro de las nuevas variantes identificadas, la ACdb-130 resultó semejante a la NA-1 con dos cambios adicionales: $G_{7507} \rightarrow C$, $A_{7670} \rightarrow G$, la ASgo-326 es similar a la variante E G-10, con un cambio adicional: $G_{7567} \rightarrow A$, y la ACor-159 es parecida a la variante E IND-7, con un cambio adicional: $A_{7636} \rightarrow C$.

Las 3 secuencias nuevas fueron ingresadas al GenBank; y se les asignaron los siguientes números de acceso: KF575120 (ACdb-130), KF575121 (ACor-159), y KF575122 (ASgo-326).

No se observaron deleciones ni inserciones en los fragmentos secuenciados.

No se detectaron coinfecciones con distintas variantes

	7480	7490	7500	7510	7520	7530	
E G-11	A	CAAAATGTGT	TTTTTTAAAT	AGTCTATGT	CAGCAACTAT	GGTTTAAACT	TGTACGTTT
ACor-159	-	-----	-----	-----	-----	A-----	-----
E G-10	-	-----	-----	-----	-----	A-----	-----
ASgo-326	-	-----	-----	-----	-----	A-----	-----
E G-1	-	-----	-----	-----	-----	A-----	-----
AA B-14	-	---C---A-	-----	-----G---	-----	A-----	-----
ACdb-130	-	---C---A-	-----	-----C---	-----	A-----	-----
AA IND-8	-	---C---A-	-----	-----	-----	A-----	-----

	7540	7550	7560	7570	7580	7590	
E G-11	C	CTGCTTGCCA	TGCGTGCCAA	ATCCCTGTTT	TCCTGACCTG	CACTGCTTGC	CAACCATTG
ACor-159	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E G-10	-	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----
ASgo-326	-	-----	-A-----	-----A---	-----	-----	-----
E G-1	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA B-14	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ACdb-130	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA IND-8	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	7600	7610	7620	7630	7640	7650	
E G-11	C	ATTGTTTTTT	ACACTGCACT	ATGTGCAACT	ACTGAATCAC	TATGTACATT	GTGTCATAT
ACor-159	-	-----	-----	-----	-----C---	-----	-----
E G-10	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ASgo-326	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E G-1	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA B-14	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ACdb-130	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA IND-8	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	7660	7670	7680	7690	7700	7710	
E G-11	A	AAATAAATCA	CTATGCGCCA	ACGCCTTACA	TACCGCTGTT	AGGCACATAT	TTTTGGCTT
ACor-159	-	-----	-----	-----	-----	-----	---G---
E G-10	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ASgo-326	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E G-1	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA B-14	-	-----T-	-----	-----A-	-----	-----	-----
ACdb-130	-	-----TG	-----	-----A-	-----	-----	-----
AA IND-8	-	-----T-	-----	-----A-	-----	-----	-----

	7720	7730	7740	7750	7760	7770	
E G-11	G	TTTTAACTAA	CCTAATTGCA	TATTGGCAT	AAGGTTTAAA	CTTCTAAGGC	CAACTAAAT
ACor-159	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E G-10	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ASgo-326	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E G-1	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA B-14	-	-----C-	-----	-----	-----	---T---	-----
ACdb-130	-	-----C-	-----	-----	-----	---T---	-----
AA IND-8	-	-----C-	-----	---G---	-----	---T---	-----

	7780	7790	7800	7810	7820	7830	
E G-11	G	TCACCCTAGT	TCATACATGA	ACTGTGTAAG	GGTTAGTCAT	ACATTGTTCA	TTTGTAAGG
ACor-159	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E G-10	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ASgo-326	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E G-1	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AA B-14	-	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----
ACdb-130	-	-----T-	-----	-----	-----	-----	---T---
AA IND-8	-	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----

	7840
E G-11	C TGC
ACor-159	-----
E G-10	-----
ASgo-326	-----
E G-1	-----
AA B-14	-----
ACdb-130	-----
AA IND-8	-----

Figura 11. Alineamiento de las secuencias del fragmento de LCR identificadas en el estudio. Pueden observarse los cambios nucleotídicos con respecto al clon referencial de HPV-16 (E G-11)

Provincia	Variante	n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7			
			4	4	5	5	5	5	6	6	6	6	7	7	7	7	7	8	
Clon referencial			-	A	G	A	G	G	G	A	C	A	C	T	A	T	C	C	G
Corrientes n=78	EP	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-1)	56	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-10)	2	-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AA (B-14)	1	C	A	G	A	-	-	-	T	-	A	-	C	-	T	T	-	-
	AA (IND-8)	1	C	A	-	A	-	-	-	T	-	A	-	C	G	T	T	-	-
	AA (ACdb-130) E (ACor-159)	1	C	A	C	A	-	-	-	T	G	A	-	C	-	T	T	T	-
1	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	
Santiago del Estero n=74	EP	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-1)	49	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-10)	3	-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AA (B-14)	1	C	A	G	A	-	-	-	T	-	A	-	C	-	T	T	-	-
	E (ACor-159) E (ASgo-326)	6	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Chaco n=48	EP	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-1)	29	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-10)	1	-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AA (IND-8) AA (ACdb-130)	2	C	A	-	A	-	-	-	T	-	A	-	C	G	T	T	-	-
1	C	A	C	A	-	-	-	T	G	A	-	C	-	T	T	T	-	-	
Cordoba n=25	EP	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-1)	15	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-10) AA (ACdb-130)	1	-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	C	A	C	A	-	-	-	T	G	A	-	C	-	T	T	T	-	-	
Misiones n=20	EP	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-1)	14	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AA (IND-8)	2	C	A	-	A	-	-	-	T	-	A	-	C	G	T	T	-	-
Tierra del fuego n=9	EP	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-1)	4	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AA (IND-8)	1	C	A	-	A	-	-	-	T	-	A	-	C	G	T	T	-	-
	E (ACor-159)	1	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
Tucumán n=9	EP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E (G-1)	7	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AA (IND-8)	1	C	A	-	A	-	-	-	T	-	A	-	C	G	T	T	-	-

Tabla 2. Distribución de variantes de HPV-16 en LCR con sus respectivos cambios nucleotídicos, por provincia

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el subgrupo de 220 muestras que contaban con el diagnóstico citológico se llevó a cabo el test de Fisher a fin de evaluar una posible asociación entre variantes virales y la severidad de la lesión. No se observó una asociación estadísticamente significativa ($p=0.24$) entre alguna de las variantes y la severidad de la lesión. Sin embargo, pudo observarse una tendencia de aumento en la proporción de las variantes no-E (AA) a medida que crece la severidad de la lesión: 4,5% en los controles normales y lesiones benignas (L-SIL) y 7,9% en lesiones severas (H-SIL) y cáncer.

La distribución de variantes de HPV-16 versus severidad de la lesión se muestra en la tabla 3.

En la tabla 4 puede observarse la distribución de las variantes Europeas de HPV-16 (prototípicas y No prototípicas), de acuerdo al diagnóstico citológico.

Diagnóstico citológico			
Rama	Normal/L-SIL N (%)	H-SIL/Cáncer N (%)	Total N (%)
	157 (100)	63 (100)	220 (100)
AA	7 (4,5)	5 (7,9)	12 (5,5)
E	150 (95,5)	58 (92,1)	208 (94,5)

Tabla 3. Distribución de las variantes de HPV-16 identificadas de acuerdo al diagnóstico citológico

Diagnóstico citológico					
Rama	Normal N (%)	L-SIL N (%)	H-SIL N (%)	Cáncer N (%)	Total N (%)
	36 (100)	114 (100)	48 (100)	10 (100)	208 (100)
E-P	8 (22)	29 (25)	11 (23)	2 (20)	50 (24)
E-no P	28 (78)	85 (75)	37 (77)	8 (80)	158 (76)

Tabla 4. Distribución de las variantes Europeas de HPV-16 (prototípicas y No prototípicas) de acuerdo al diagnóstico citológico

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HPV-16 EN LCR

Las 8 secuencias obtenidas en este estudio fueron alineadas junto a otras 41 obtenidas del GenBank que fueron previamente descritas en otras partes del mundo (Ho, L. et al. 1993), (Picconi, M.A. et al. 2003), En la Figura 12 puede observarse el árbol inferido.

Las nuevas variantes ACor-159 y ASgo-326 quedaron ubicadas dentro de la rama E, mientras que la nueva variante ACdb-130 se localizó dentro de la rama AA.

En la Figura 13 se muestra la proporción de aislamientos de HPV-16 E-P y las variantes no prototípicas (E-NoP y AA) identificadas en este estudio.

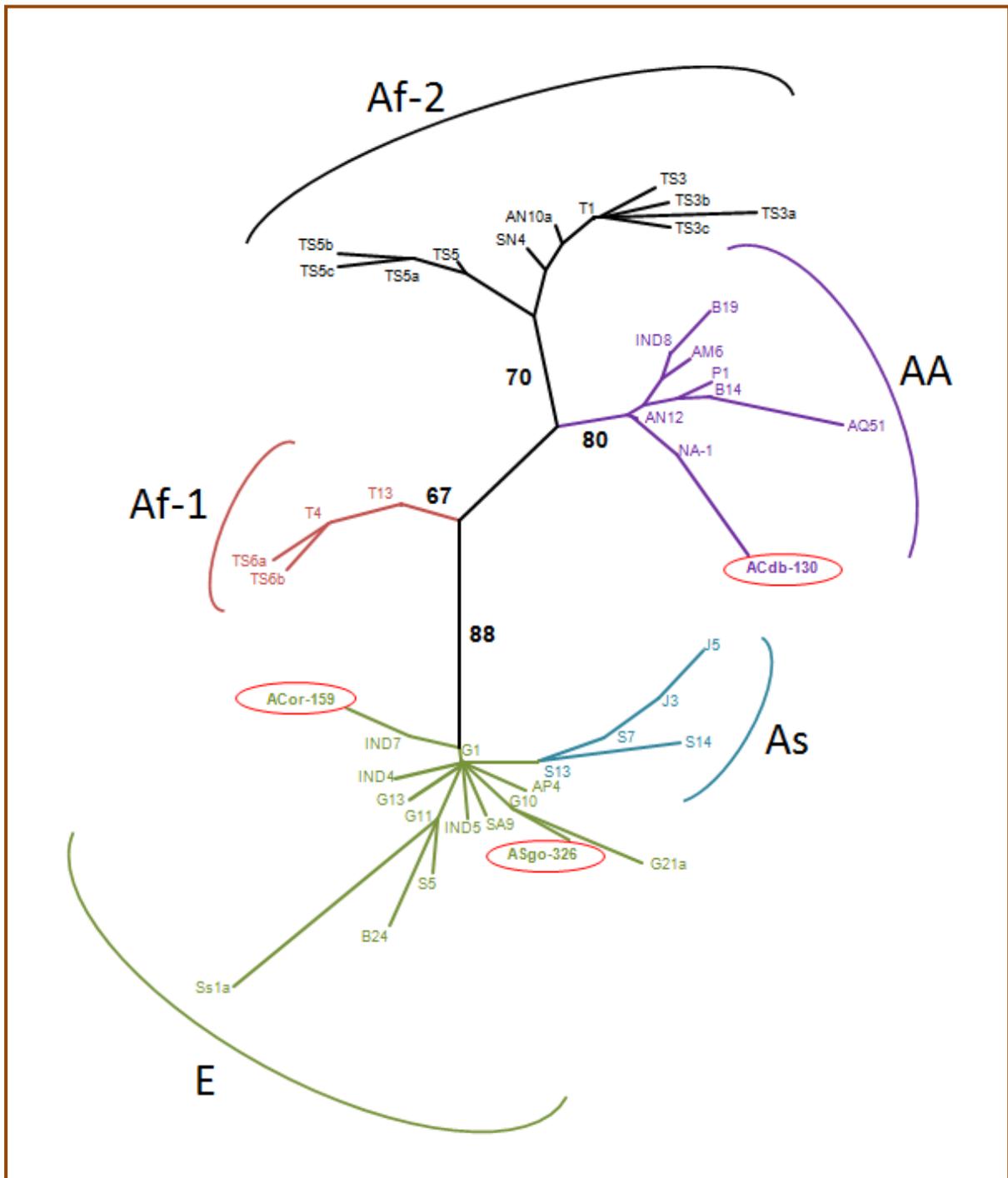


Figura 12. Arbol filogenético obtenido mediante el análisis de las secuencias parciales de LCR de HPV-16. Los círculos rojos señalan las tres nuevas variantes identificadas en este estudio. La inferencia fue asistida por el programa Mega 5.0. Las cinco ramas (E: Europea, AA: Asiático-americana, As: Asiática, Af1 y 2: Africana 1 y 2) se distinguen con diferentes colores.

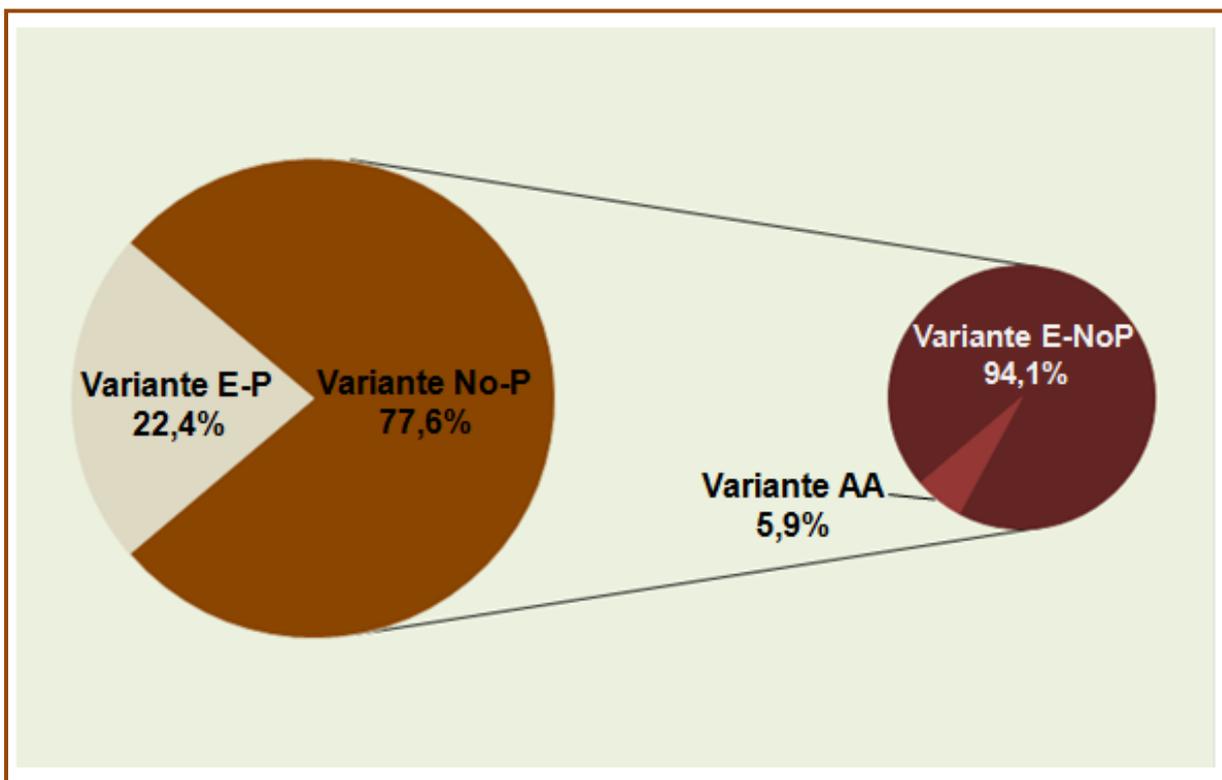


Figura 13. Distribución de aislamientos de HPV-16 E-P y de variantes no prototípicas (E-NoP y AA) identificadas en este estudio.

DISCUSIÓN

El presente trabajo contribuye al conocimiento de la epidemiología molecular del HPV-16, a través de un estudio multicéntrico de las variantes en LCR circulantes en distintas provincias argentinas.

VARIABILIDAD GENÉTICA DE HPV-16 Y PATOGENIA

El estudio de la variabilidad genética ha sido abordado también en otras regiones del genoma viral; sin embargo, esta tesis ha enfocado el análisis de la secuencia de LCR ya que demostró ser útil y muy informativa para distinguir todos los linajes (Cornet, I. et al. 2012). Se ha observado que ciertas partes de LCR son más densas en información filogenética que otras, siendo el menor fragmento que permitió la distinción de los nueve sub-linajes el que se extiende desde el nt. 7743 al nt 25 (tamaño aproximado: 300 pb); este fragmento está incluido en la región parcial de LCR analizada en este estudio.

El análisis de LCR permitió identificar virus prototípico y variantes de HPV-16. La variantes E mostraron un marcado predominio (94,5%), superando el valor informado por Yamada y col (76,8%) para América Central y del Sur (Yamada, T. et al. 1997) aunque más cercano al informado en indígenas guaraníes de Misiones (83%) (Tonon, S.A. et al. 2007), y en Paraguay (82,1%) (Mendoza, L. et al. 2013). Si bien esto puede deberse a diferencias en la cantidad y diversidad clínica de las muestras incluidas y a las características étnicas y geográficas de la población estudiada, los datos obtenidos confirman la superioridad de las variantes E de HPV-16 en Sudamérica.

Casi la totalidad de las variantes identificadas coincidieron con secuencias ya descritas: dentro de la rama E, las variantes G-1, G-10, G-11 aisladas por primera vez en muestras de pacientes de Alemania; y dentro de la rama AA, las variantes IND-8 y B-14, descritas inicialmente en muestras de la India y Brasil, respectivamente (Chan, S.Y. et al. 1992), (Ho, L. et al. 1993). En catorce muestras del presente trabajo se identificaron tres nuevas variantes denominadas ACdb-130, ASgo-326 y ACor-159.

Uno de los aspectos de mayor interés en el estudio de las variantes de HPV-16 ha sido su posible asociación con distintos niveles de capacidad carcinogénica. Desde el punto de vista viral, se ha sugerido que las diferencias en la acción patogénica de las distintas variantes podría deberse a cambios de nucleótidos en regiones virales críticas; tal

es el caso de LCR. Esta región tiene un rol importante en la replicación del ADN viral; contiene el promotor P97 ubicado hacia el extremo próximo a E6, el cual es responsable de la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 (Doorbar, J. et al. 2012). LCR contiene también, sitios de unión de factores celulares, AP-1, NF1, Oct-1, TEF-1, GRE, SP-1 y YY-1, que activan o inhiben la transcripción viral (Kammer, C. et al. 2000), (Hubert, W.G. 2005), (Ndisang, D. et al. 2006), (Sichero, L. et al. 2012).

Uno de los factores celulares más estudiados es el YY-1 que se une a LCR en distintos sitios, reprimiendo la expresión de E6 y E7 (Desaintes, C. et al. 1996), (O'Connor, M.J. et al. 1996). Si bien son escasos los estudios funcionales llevados a cabo con variantes en LCR, se ha observado que la presencia de ciertas mutaciones en los sitios de unión de YY-1 dan por resultado un aumento en la actividad transcripcional viral y como consecuencia se promueve la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (May, M. et al. 1994), (Xi, L.F. et al. 1997), (Xi, L.F. et al. 1998), (Park, J.S. et al. 1999), (Tornesello, M.L. et al. 2000), (Kozuka, T. et al. 2000), (Kurvinen, K. et al. 2000), (Sichero, L. et al. 2005), (Sichero, L. et al. 2012).

En este estudio se detectaron variantes virales con cambios nucleotídicos en LCR localizados dentro o en la proximidad de sitios de unión de factores transcripcionales, lo que podría afectar o anular dicha unión y/o haber generado nuevos sitios. Como fue mencionado anteriormente, la desregulación de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 a través de mutaciones en sitios claves de unión de represores transcripcionales ha sido asociada con el potencial oncogénico de estos virus. Estas mutaciones han dado origen a variantes virales que son frecuentes en la población estudiada.

En todas las variantes NoP (que incluyen a las E-NoP, AA, Af y As) halladas en este estudio se identificó la mutación $G_{7521} \rightarrow A$ (Tabla 2), que las diferencia de las E-P; esta mutación afecta a uno de los sitios de unión de YY-1 por lo que ha sido propuesto como un cambio de secuencia que justificaría el mayor potencial oncogénico de las variantes no prototípicas, incluyendo a las AA, propuesto por varios autores (Veress, G. et al. 1999), (Stephen, A.L. et al. 2000).

Dentro de la rama AA, las variantes B-14, IND-8 y ACdb-130 halladas en este estudio mostraron los cambios $A_{7729} \rightarrow C$ y $C_{7786} \rightarrow T$, involucrados en la interacción con otro sitio de YY-1, muy significativo en la represión de la transcripción de E6 y E7 (Stephen, A.L. et al. 2000). Esto sería concordante con la mayor actividad transcripcional, (casi el doble que la del prototipo) descrita para las variantes AA, que le conferirían

mayor capacidad transformante (Veress, G. et al. 1999), (Sichero, L. et al. 2012), (Sichero, L. et al. 2012).

Cabe destacar que en tres muestras provenientes de distintas provincias se identificó la variante ACdb-130, muy relacionada con la variante NA-1, pero con dos cambios adicionales: $G_{7507} \rightarrow C$ y $A_{7670} \rightarrow G$. Este último cambio es característico de la rama Af-2, lo cual sugeriría una probable recombinación NA-1/Af-2; sin embargo, esto debería ser confirmado por clonado-secuenciación, ya que con la tecnología empleada en este estudio no es posible descartar una infección múltiple.

La variante europea ACor-159 mostró además cambios nucleotídicos en las posiciones $A_{7636} \rightarrow C$ y $T_{7714} \rightarrow G$, involucrados en la interacción con los sitios de los factores celulares AP-1 y NF-1, respectivamente (Pande, S. et al. 2008).

Varios trabajos previos le adjudicaron a las variantes E-NoP un mayor potencial oncogénico en tejido del cérvix (Ordonez, R.M. et al. 2004), (Sathish, N. et al. 2005), (Lizano, M. et al. 2006). Resultados similares fueron hallados en carcinomas anales, donde las variantes E-NoP fueron 3 veces más prevalentes que el HPV-16 prototipo (L F Xi et al. 1998), (Da Costa, M.M. et al. 2002).

A medida que fue avanzando el conocimiento, fue creciendo la evidencia en relación a que serían las variantes de HPV-16 no Europeas las que estarían más asociadas con una mayor persistencia y oncogenicidad (Xi, L.F. et al. 1997), (Villa, L.L. et al. 2000), (Matsumoto, K. et al. 2000), (Berumen, J. et al. 2001), (Ordonez, R.M. et al. 2004), (Xi, L.F. et al. 2007), (Zehbe, I. et al. 2009), (Zuna, R.E. et al. 2009), (Schiffman, M. et al. 2010).

En el presente trabajo no se pudo establecer una significativa asociación entre las variantes AA y la progresión a lesiones de alto grado y/o CCU, debido, principalmente, al limitado número de casos de variantes AA hallado en la población estudiada; sin embargo, pudo observarse una tendencia de aumento en la proporción de las variantes AA identificadas con el incremento de la severidad de la lesión (4,5% en los controles normales y L-SIL vs 7,9% en H-SIL y cáncer), lo que estaría en concordancia con las publicaciones previas (Xi, L.F. et al. 2007), (Zehbe, I. et al. 2009), (Zuna, R.E. et al. 2009), (Schiffman, M. et al. 2010).

Por otro lado, hubo predominio de variantes E-NoP en todo el espectro del diagnóstico morfológico; si bien el número de casos es reducido, este hallazgo apoyaría la idea actual en relación a que las variantes E-NoP no presentarían una mayor capacidad

oncogénica que las E-P, como fue en algún momento sospechado.

Los resultados del presente estudio concuerdan con otros autores en que las variantes E muestran un gran predominio, desde la citología normal hasta el cáncer. Si bien las variantes no-E han sido descritas como más oncogénicas, la marcada presencia de variantes E en los CCU enfatiza el concepto del alto riesgo oncogénico del HPV-16, independientemente de la rama filogenética a la que pertenezca; otros cofactores podrían también estar jugando un rol en la predisposición a la enfermedad (Tu, J.J. et al. 2006).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HPV-16

De acuerdo a los conocimientos actuales, los tipos de HPV habrían evolucionado en primates pre-humanos y sus variantes se habrían dispersado con los grupos étnicos humanos. Aunque los detalles son aún controvertidos entre los paleontólogos, el punto de vista más aceptado en relación a la evolución humana y migración global sostiene que el *Homo sapiens* evolucionó en Africa aproximadamente 200.000 años atrás, dispersándose desde ese continente hacia el sudeste de Asia y Australia alrededor de 60.000 años atrás; mucho más tarde, fueron reemplazados por los humanos tempranos y llegaron a climas menos moderados como los del norte de Europa y de Asia. La migración de los humanos en América sucedió mediante el cruce del Estrecho de Bering, alrededor de 12.000 años atrás, durante la última glaciación (Bonatto, S.L. et al. 1997).

Se reconocen tres principales patrones por los cuales los virus podrían haber ingresado en las poblaciones humanas: (a) Algunos virus parecen haber infectado a los humanos desde el principio y profundizado las raíces filogenéticas en ancestros pre-humanos; este sería el caso de los virus Herpes, hepatitis B, mostrando una extensa coevolución con los humanos. (b) Alternativamente, algunos virus humanos evolucionaron probablemente desde el inicio en ciertos reservorios de hospedadores mamíferos y entraron a la población humana una o varias veces. Esto podría haber sucedido prehistóricamente con el virus de la viruela y más recientemente con el VIH. c) Finalmente, otros virus humanos van y vienen frecuentemente entre diferentes hospedadores animales y humanos, como es el caso del virus influenza. Hay evidencias claras de que los HPV pertenecen a la primera de estas categorías. Ningún HPV ha sido nunca encontrado en animales, y no existe ningún trabajo que haya documentado la

infección humana con un virus papiloma animal (Bernard, H.U. et al. 2006).

La mayoría de las cohortes de secuencias de HPV-16 estudiadas en distintas poblaciones del mundo presentan una mezcla de variantes, predominando en general la que se asocia con el origen geográfico de esa cohorte (Yamada, T. et al. 1997), (Chan, S.Y. et al. 1992), (Ho, L. et al. 1991). Así, las variantes Af-1 y Af-2 se observan predominantemente en el continente Africano, aunque también aparecen en otras regiones con frecuencias menores al 10%. Las variantes E, si bien se presentan mayoritariamente en cohortes europeas, se aislaron de casi todos los grupos étnicos analizados en el mundo y su frecuencia oscila del 50- 93%; las variantes AA, están casi restringidas a América, y finalmente la rama As está acotada casi exclusivamente a poblaciones chinas y japonesas y es muy raro encontrarlas en otras regiones geográficas (Bernard, H.U. et al. 2006).

En el presente trabajo, las secuencias nucleotídicas de LCR de HPV-16 obtenidas fueron alineadas junto con aquéllas anteriormente descritas (Ho, L. et al. 1991), (Chan, S.Y. et al. 1992), (Ho, L. et al. 1993), a fin de analizar su historia evolutiva. Las nuevas variantes ACor-159 y ASgo-326, fueron ubicadas filogenéticamente en la rama E, mientras que la nueva variante ACdb-130 se agrupó en la rama AA, muy cercana a la variante NA-1.

En coincidencia con datos obtenidos en población americana, incluyendo comunidades indígenas tales como navajos (EEUU), quechuas (Jujuy, Argentina), guaraníes (Misiones, Argentina) y pilagá (Formosa, Argentina) (Ho, L. et al. 1993), (Picconi, M.A. et al. 2003), (Tonon, S.A. et al. 2007), (Deluca, G.D. et al. 2012), así como población urbana de Paraguay (Mendoza, L. et al. 2013), en el presente trabajo se observa un predominio de las variantes E; sin embargo, el hallazgo de variantes AA confirma que dichos virus son preferentemente detectados en poblaciones americanas y en minoría de asiáticos, más que en otras regiones del mundo (Ho, L. et al. 1993), (Bernard, H.U. et al. 2006).

El fragmento de LCR seleccionado para el análisis resultó lo suficientemente amplio como para brindar abundante información para la identificación de los linajes de variantes de HPV-16 y a la vez, pequeño y escaso en mutaciones convergentes (mismas posiciones cambiadas en distintas ramas) como para permitir una reconstrucción de la evolución viral sin ambigüedades.

La topología del árbol obtenido coincide con las publicaciones previas (Ho, L. et al.

1993), (Picconi, M.A. et al. 2003), (Mendoza, L. et al. 2013) aparentemente, se han identificado la totalidad de las ramas de HPV-16 existentes en humanos. Las variantes nuevas que puedan surgir, probablemente correspondan a linajes ya conocidos y provengan de grupos étnicos determinados, como podría ser el caso de las variantes descritas por primera vez en este estudio.

La concordancia entre la topología de los árboles filogenéticos de los HPV tipos 16 y 18 con las tres principales razas humanas (africana, caucásica y del este asiático), apoya la hipótesis de una primitiva coevolución virus-hospedador. Como consecuencia de esta coevolución, la distribución geográfica de las variantes se asocia a los procesos migratorios humanos.

Considerando el origen de HPV-16 en África, las variantes Europeas podrían haber evolucionado a partir de los humanos infectados con HPV-16 que se dispersaron desde África (Figura 13). Es probable que las cepas Europeas se hayan generado fuera de África hace mucho tiempo, ya que la variante G-1 (mutada en el nt. 7521) fue aparentemente el genoma ancestral de la rama As, la cual podría haber demorado cerca de 50.000 años en evolucionar (Ho, L. et al. 1993), (Ong, C.K. et al. 1993), (Van Ranst, M.A. et al. 1996), (Bernard, H.U. et al. 2006). Ho y col han especulado que las variantes AA en América estarían asociadas a etnias nativas, cuyos ancestros habrían llegado desde Asia cruzando el Estrecho de Bering, probablemente 12.000 años atrás (Ho, L. et al. 1991), (Ho, L. et al. 1993), (Bonatto, S.L. et al. 1997), (Bernard, H.U. et al. 2006). De acuerdo a datos previamente publicados (Chan, S.Y. et al. 1992) que estiman la velocidad de mutación de HPV-16 entre 10^{-9} y 10^{-7} cambios nucleotídicos por sitio y por año, no es posible inferir si la variante ACdb-130 identificada por primera vez en este estudio surgió antes o después del ingreso de los asiáticos en América.

En Latinoamérica se han observado mezclas de variantes de HPV-16 que reflejarían los patrones de inmigración en los países (Ong, C.K. et al. 1993), (Ho, L. et al. 1993), (Franco, E.L. et al. 1994), (Berumen, J. et al. 2001), (Hildesheim, A. et al. 2001), (Calleja-Macias, I.E. et al. 2004). Dado que muchas de estas sociedades multiétnicas se originaron hace siglos, se esperaría que el mestizaje hubiera conducido a una distribución homogénea de las diferentes variantes. Sorprendentemente, algunos autores han mostrado que todavía hay una cierta asociación preferencial entre variantes específicas del HPV-16 y algunos grupos étnicos (Ong, C.K. et al. 1993), (Ho, L. et al. 1993). Siguiendo esta línea de razonamiento, el marcado predominio de variantes E y la escasez

de las cepas AA hallado en este trabajo, podría asociarse con la característica urbana de la población estudiada, en su mayoría bajo una fuerte influencia de la migración europea.

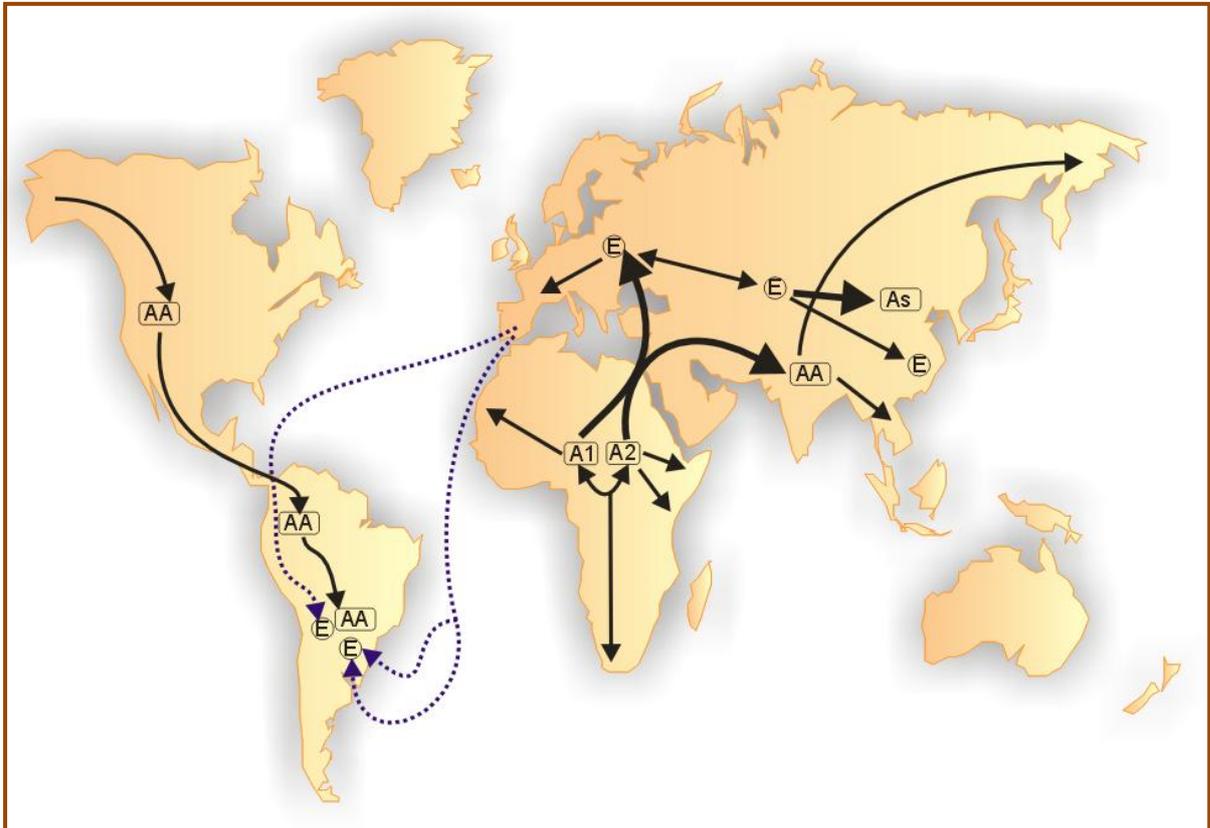


Figura 13: Evolución y distribución de las variantes de HPV-16 en el mundo. La figura muestra la evolución molecular y la dispersión de las variantes de HPV-16 en tiempos prehistóricos (flechas negras), estimada mediante el análisis filogenético de LCR. Las flechas más gruesas representan los cambios mutacionales que habrían dado lugar a las 5 principales ramas de divergencia intratípica (E:Europea, AA: Asiático-americana, As: Asiática, Af 1-2: Africanas 1 y 2). La flecha punteada indica el probable origen de las variantes E predominantes en la población estudiada.

CONCLUSIONES

1. Este estudio aporta datos sobre la diversidad y distribución de variantes de HPV-16 identificadas en muestras de cérvix de habitantes de distintas provincias argentinas. Las variantes halladas se ubicaron en las ramas filogenéticas E y AA, de acuerdo a lo esperado dada las características étnico-geográficas de la población estudiada.

2. Se observó un marcado predominio de variantes Europeas (tanto E-P como E-NoP) en todo el espectro clínico, incluyendo al cáncer. Esto enfatiza el concepto del alto riesgo oncogénico del HPV-16, independientemente de la rama filogenética a la que pertenezca; otros cofactores estarían también jugando un rol en la predisposición a la enfermedad.

3. Si bien las variantes AA han sido vinculadas con un mayor potencial oncogénico respecto del linaje E, no se pudo establecer una asociación significativa entre la presencia de estas variantes y el desarrollo de lesiones severas debido al reducido número de casos de variantes AA hallado en la población estudiada; sin embargo, pudo observarse una tendencia de aumento en la proporción de las variantes AA con el incremento de la severidad de la lesión, lo que estaría sugiriendo que estas variantes mostrarían un mayor riesgo de progresión maligna.

4. Se identificaron 3 variantes nuevas, denominadas: ACdb-130 (Argentina Córdoba), ASgo-326 (Argentina Sgo. del Estero) y ACor-159 (Argentina Corrientes). Las nuevas variantes ACor-159 y ASgo-326 quedaron ubicadas dentro de la rama E, mientras que la nueva variante ACdb-130 se localizó dentro de la rama AA muy cercana a la variante NA-1.

5. Las variantes detectadas mostraron cambios nucleotídicos en LCR localizados dentro o en la proximidad de sitios de unión de factores transcripcionales, lo que podría afectar o anular dicha unión. Estos eventos les podrían conferir un mayor potencial oncogénico.

6. El árbol filogenético inferido conservó la topología previamente descrita; esto indicaría que la totalidad de las ramas ya han sido identificadas y que las variantes nuevas corresponderán a estos linajes preexistentes, como es el caso de las variantes descritas por primera vez en este estudio.

7. El marcado predominio de variantes E y la escasez de las cepas AA hallado en este trabajo, podría asociarse con la característica urbana de la población estudiada, en su mayoría bajo una fuerte influencia de la migración europea.

BIBLIOGRAFIA

- Almonte, M., Murillo, R., Sanchez, G. I., Jeronimo, J., Salmeron, J., Ferreccio, C., Lazcano-Ponce, E. and Herrero, R. (2010). "[New paradigms and challenges in cervical cancer prevention and control in Latin America]." Salud Publica Mex **52**(6): 544-59.
- Alonio, L. V., Dalbert, D., Picconi, M. A., Cervantes Vazquez, G., Garcia Carranca, A., Distefano, A. L., Mural, J., Bartt, O., Bazan, G. and Teyssie, A. R. (2000). "[Ha-ras and p53 gene mutations scanned by PCR-SSCP in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix associated with human papillomavirus]." Medicina (B Aires) **60**(6): 895-901.
- Alonio, L. V., Picconi, M. A., Dalbert, D., Mural, J., Bartt, O., Bazan, G., Dominguez, M. and Teyssie, A. R. (2003). "Ha-ras oncogene mutation associated to progression of papillomavirus induced lesions of uterine cervix." J Clin Virol **27**(3): 263-9.
- Bernard, H. U. (2005). "The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses." J Clin Virol **32 Suppl 1**: S1-6.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. and de Villiers, E. M. (2010). "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments." Virology **401**(1): 70-9.
- Bernard, H. U., Calleja-Macias, I. E. and Dunn, S. T. (2006). "Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications." Int J Cancer **118**(5): 1071-6.
- Berumen, J., Ordonez, R. M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S. C., Estrada, R. A., Yunes, E., Garcia-Carranca, A., Gonzalez-Lira, G. and Madrigal-de la Campa, A. (2001). "Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study." J Natl Cancer Inst **93**(17): 1325-30.
- Bonatto, S. L. and Salzano, F. M. (1997). "Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World." Am J Hum Genet **61**(6): 1413-23.
- Bosch, F. X., Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A. R., de Sanjose, S., Bruni, L., Tortolero-Luna, G., Kjaer, S. K. and Munoz, N. (2008). "Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia." Vaccine **26 Suppl 10**: K1-16.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. and Shah, K. V. (2002). "The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer." J Clin Pathol **55**(4): 244-65.

- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. and Shah, K. V. (1995). "Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group." J Natl Cancer Inst **87**(11): 796-802.
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L. and Coglianò, V. (2009). "A review of human carcinogens--Part B: biological agents." Lancet Oncol **10**(4): 321-2.
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsague, X., Ferrer, E., Bosch, F. X. and de Sanjose, S. (2010). "Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings." J Infect Dis **202**(12): 1789-99.
- Burd, E. M. (2003). "Human papillomavirus and cervical cancer." Clin Microbiol Rev **16**(1): 1-17.
- Calleja-Macias, I. E., Kalantari, M., Huh, J., Ortiz-Lopez, R., Rojas-Martinez, A., Gonzalez-Guerrero, J. F., Williamson, A. L., Hagmar, B., Wiley, D. J., Villarreal, L., Bernard, H. U. and Barrera-Saldana, H. A. (2004). "Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants." Virology **319**(2): 315-23.
- Castle, P. E., Schiffman, M., Wheeler, C. M., Wentzensen, N. and Gravitt, P. E. (2010). "Impact of improved classification on the association of human papillomavirus with cervical precancer." Am J Epidemiol **171**(2): 155-63.
- CDC. (2013). "Centers for Diseases Control and Prevention." Retrieved 27-03, 2013, from <http://www.cdc.gov/hpv/cancer.html>.
- Ciapponi, A., Bardach, A., Glujovsky, D., Gibbons, L. and Picconi, M. A. (2011). "Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis." PLoS One **6**(10): e25493.
- Clifford, G. M. (2009). "Global access to HPV vaccination: what are we waiting for?" Lancet **374**(9706): 1948-9.
- Clifford, G. M., Rana, R. K., Franceschi, S., Smith, J. S., Gough, G. and Pimenta, J. M. (2005). "Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(5): 1157-64.
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Aguado, T. and Franceschi, S. (2003). "Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis." Br J Cancer **89**(1): 101-5.
- Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., Tommasino, M. and Clifford, G. M. (2012). "Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR." J Virol **86**(12): 6855-61.

- Cutts, F. T., Franceschi, S., Goldie, S., Castellsague, X., de Sanjose, S., Garnett, G., Edmunds, W. J., Claeys, P., Goldenthal, K. L., Harper, D. M. and Markowitz, L. (2007). "Human papillomavirus and HPV vaccines: a review." Bull World Health Organ **85**(9): 719-26.
- Cuzick, J., Arbyn, M., Sankaranarayanan, R., Tsu, V., Ronco, G., Mayrand, M. H., Dillner, J. and Meijer, C. J. (2008). "Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries." Vaccine **26 Suppl 10**: K29-41.
- Cuzick, J., Bergeron, C., von Knebel Doeberitz, M., Gravitt, P., Jeronimo, J., Lorincz, A. T., C, J. L. M. M., Sankaranarayanan, R., P, J. F. S. and Szarewski, A. (2012). "New technologies and procedures for cervical cancer screening." Vaccine **30 Suppl 5**: F107-16.
- Chan, P. K. S., Picconi, M. A., Cheung, T. H., Giovannelli, L. and Park, J. S. (2012). "Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences: 1–20.
- Chan, S. Y., Ho, L., Ong, C. K., Chow, V., Drescher, B., Durst, M., ter Meulen, J., Villa, L., Luande, J., Mgaya, H. N. and et al. (1992). "Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind." J Virol **66**(4): 2057-66.
- Da Costa, M. M., Hogeboom, C. J., Holly, E. A. and Palefsky, J. M. (2002). "Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant." J Infect Dis **185**(9): 1229-37.
- de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., Tous, S., Felix, A., Bravo, L. E., Shin, H. R., Vallejos, C. S., de Ruiz, P. A., Lima, M. A., Guimera, N., Clavero, O., et al. (2010). "Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study." Lancet Oncol **11**(11): 1048-56.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. and zur Hausen, H. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 17-27.
- Deluca, G. D., Basiletti, J., Gonzalez, J. V., Diaz Vasquez, N., Lucero, R. H. and Picconi, M. A. (2012). "Human papilloma virus risk factors for infection and genotype distribution in aboriginal women from Northern Argentina." Medicina (B Aires) **72**(6): 461-6.
- Deluca, G. D., Basiletti, J., Schelover, E., Vasquez, N. D., Alonso, J. M., Marin, H. M., Lucero, R. H. and Picconi, M. A. (2011). "Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina." Braz J Infect Dis **15**(6): 567-72.
- Deluca, G. D., Marin, H. M., Schelover, E., Chamorro, E. M., Vicente, L., Albhom, M. and Alonso, J. M. (2006). "[Chlamydia trachomatis and papillomavirus infection in

- women with cytohistological abnormalities in uterine cervix]." Medicina (B Aires) **66**(4): 303-6.
- Desaintes, C. and Demeret, C. (1996). "Control of papillomavirus DNA replication and transcription." Semin Cancer Biol **7**(6): 339-47.
- Dillner, J., Arbyn, M., Unger, E. and Dillner, L. (2010). "Monitoring of human papillomavirus vaccination." Clin Exp Immunol **163**(1): 17-25.
- Doorbar, J. (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." Clin Sci (Lond) **110**(5): 525-41.
- Doorbar, J. (2007). "Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection." Dis Markers **23**(4): 297-313.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R. and Stanley, M. A. (2012). "The biology and life-cycle of human papillomaviruses." Vaccine **30 Suppl 5**: F55-70.
- Eiguchi, K., Tatti, S., Alonio, L. V., Gonzalez, J. V., Leiros, G. J., Fleider, L., Vighi, S., Padros, K., Raimondi, E., Teyssie, A. and Picconi, M. A. (2008). "Association of DRB1 and DQB1 HLA class II polymorphisms in high-grade and neoplastic cervical lesions of women from Argentina." J Low Genit Tract Dis **12**(4): 262-8.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-917.
- Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M. (2007). Field's Virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins
- Forman, D., de Martel, C., Lacey, C. J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., Plummer, M. and Franceschi, S. (2012). "Global burden of human papillomavirus and related diseases." Vaccine **30 Suppl 5**: F12-23.
- Franceschi, S., Herrero, R., Clifford, G. M., Snijders, P. J., Arslan, A., Anh, P. T., Bosch, F. X., Ferreccio, C., Hieu, N. T., Lazcano-Ponce, E., Matos, E., Molano, M., Qiao, Y. L., Rajkumar, R., Ronco, G., et al. (2006). "Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide." Int J Cancer **119**(11): 2677-84.
- Franco, E. L., Villa, L. L., Rahal, P. and Ruiz, A. (1994). "Molecular variant analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infection." J Natl Cancer Inst **86**(20): 1558-9.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symposium Series **41**: 95-98.

- Hildesheim, A., Schiffman, M., Bromley, C., Wacholder, S., Herrero, R., Rodriguez, A., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Scarpidis, U., Lin, Q. Q., Terai, M., Bromley, R. L., Buetow, K., Apple, R. J. and Burk, R. D. (2001). "Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer." J Natl Cancer Inst **93**(4): 315-8.
- Ho, L., Chan, S. Y., Burk, R. D., Das, B. C., Fujinaga, K., Icenogle, J. P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P. and et al. (1993). "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 **67**(11): 6413-23.
- Ho, L., Chan, S. Y., Chow, V., Chong, T., Tay, S. K., Villa, L. L. and Bernard, H. U. (1991). "Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree." J Clin Microbiol **29**(9): 1765-72.
- Hubert, W. G. (2005). "Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle." J Virol **79**(10): 5914-22.
- IARC (1995). "Human Paillomavirus." IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **64**: 1-378.
- Kammer, C., Warthorst, U., Torrez-Martinez, N., Wheeler, C. M. and Pfister, H. (2000). "Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity." J Gen Virol **81**(Pt 8): 1975-81.
- Khan, M. J., Castle, P. E., Lorincz, A. T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D. R., Rush, B. B., Glass, A. G. and Schiffman, M. (2005). "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 **97**(14): 1072-9.
- Konya, J. and Dillner, J. (2001). "Immunity to oncogenic human papillomaviruses." Adv Cancer Res **82**: 205-38.
- Koutsky, L. (1997). "Epidemiology of genital human papillomavirus infection." Am J Med **102**(5A): 3-8.
- Kozuka, T., Aoki, Y., Nakagawa, K., Ohtomo, K., Yoshikawa, H., Matsumoto, K., Yoshiike, K. and Kanda, T. (2000). "Enhancer-promoter activity of human papillomavirus type 16 long control regions isolated from cell lines SiHa and CaSki and cervical cancer biopsies." Jpn J Cancer Res **91**(3): 271-9.
- Kurvinen, K., Yliskoski, M., Saarikoski, S., Syrjanen, K. and Syrjanen, S. (2000). "Variants of the long control region of human papillomavirus type 16." Eur J Cancer **36**(11): 1402-10.

- Landro, M. E., Dalbert, D., Picconi, M. A., Cuneo, N., Gonzalez, J., Vornetti, S., Bazan, G., Mural, J., Basiletti, J., Teyssie, A. R. and Alonio, L. V. (2008). "Human papillomavirus and mutated H-ras oncogene in cervical carcinomas and pathological negative pelvic lymph nodes: a retrospective follow-up." J Med Virol **80**(4): 694-701.
- Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J. and Clifford, G. M. (2010). "Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication." Int J Cancer **128**(4): 927-35.
- Lizano, M., De la Cruz-Hernandez, E., Carrillo-Garcia, A., Garcia-Carranca, A., Ponce de Leon-Rosales, S., Duenas-Gonzalez, A., Hernandez-Hernandez, D. M. and Mohar, A. (2006). "Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population." Gynecol Oncol.
- Loria, D., Abriata, G. and Rosso, S. (2007) "Atlas de Tendencias de Mortalidad por Cáncer. Argentina, 1980-2001." **Volume**, DOI:
- Lu, B., Kumar, A., Castellsague, X. and Giuliano, A. R. (2011). "Efficacy and safety of prophylactic vaccines against cervical HPV infection and diseases among women: a systematic review & meta-analysis." BMC Infect Dis **11**: 13.
- Luciani, S., Jauregui, B., Kieny, C. and Andrus, J. K. (2009). "Human papillomavirus vaccines: new tools for accelerating cervical cancer prevention in developing countries." Immunotherapy **1**(5): 795-807.
- Luciani, S., Prieto-Lara, E. and Vicari, A. (2011). "Providing vaccines against human papillomavirus to adolescent girls in the Americas: battling cervical cancer, improving overall health." Health Aff (Millwood) **30**(6): 1089-95.
- Matos, E., Loria, D., Amestoy, G. M., Herrera, L., Prince, M. A., Moreno, J., Krunfly, C., van den Brule, A. J., Meijer, C. J., Munoz, N. and Herrero, R. (2003). "Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study." Sex Transm Dis **30**(8): 593-9.
- Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Nakagawa, S., Tang, X., Yasugi, T., Kawana, K., Sekiya, S., Hirai, Y., Kukimoto, I., Kanda, T. and Taketani, Y. (2000). "Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population." Cancer Lett **156**(2): 159-65.
- May, M., Dong, X. P., Beyer-Finkler, E., Stubenrauch, F., Fuchs, P. G. and Pfister, H. (1994). "The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1." Embo J **13**(6): 1460-6.
- Meijer, C. J., Berkhof, H., Heideman, D. A., Hesselink, A. T. and Snijders, P. J. (2009). "Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening." J Clin Virol **46** **Suppl 3**: S1-4.

- Meijer, C. J., Berkhof, J., Castle, P. E., Hesselink, A. T., Franco, E. L., Ronco, G., Arbyn, M., Bosch, F. X., Cuzick, J., Dillner, J., Heideman, D. A. and Snijders, P. J. (2009). "Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older." *Int J Cancer* **124**(3): 516-20.
- Mendoza, L., Picconi, M. A., Mirazo, S., Mongelos, P., Gimenez, G., Basiletti, J. and Arbiza, J. (2013). "Distribution of HPV-16 variants among isolates from Paraguayan women with different grades of cervical lesion." *Int J Gynaecol Obstet* **122**(1): 44-7.
- MSAL. (2008). "Programa Nacional de Prevención del Cáncer cérvico-uterino." from <http://www.msal.gov.ar/cancer-cervico-uterino/>.
- MSAL. (2011). "Guia para la utilización de la prueba de VPH." from http://www.msal.gov.ar/inc/images/stories/downloads/publicaciones/equipo_medico/Cancer_Cervico_Uterino/Guia_para_la_utilizacin_de_la_prueba_de_VPH.pdf.
- MSAL. (2011). "Lineamientos Técnicos de la Vacunación contra VPH." from <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/inmunizaciones/equipos-de-salud/lineamientos-tecnicos-vph-2011.pdf>
- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M. and Huh, K. (2004). "Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis." *J Virol* **78**(21): 11451-60.
- Munger, K. and Howley, P. M. (2002). "Human papillomavirus immortalization and transformation functions." *Virus Res* **89**(2): 213-28.
- Munoz, N., Bosch, F. X., Castellsague, X., Diaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K. V. and Meijer, C. J. (2004). "Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective." *Int J Cancer* **111**(2): 278-85.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. and Meijer, C. J. (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer." *N Engl J Med* **348**(6): 518-27.
- Munoz, N., Castellsague, X., de Gonzalez, A. B. and Gissmann, L. (2006). "Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer." *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/1-10.
- Myers, G., Bernard, H. U., Delius, H., Baker, C., Icenogle, J., Halpern, A. and Wheeler, C. (1995) "Human papillomavirus. A compilation of analysis of nucleic acid and amino acid sequences." *Los Alamos National Laboratory Volume*, 95-3675 DOI:
- Ndisang, D., Faulkes, D. J., Gascoyne, D., Lee, S. A., Ripley, B. J., Sindos, M., Singer, A., Budhram-Mahadeo, V., Cason, J. and Latchman, D. S. (2006). "Differential regulation of different human papilloma virus variants by the POU family transcription factor Brn-3a." *Oncogene* **25**(1): 51-60.

- O'Connor, M. J., Tan, S. H., Tan, C. H. and Bernard, H. U. (1996). "YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity." J Virol **70**(10): 6529-39.
- Ong, C. K., Chan, S. Y., Campo, M. S., Fujinaga, K., Mavromara-Nazos, P., Labropoulou, V., Pfister, H., Tay, S. K., ter Meulen, J., Villa, L. L. and et al. (1993). "Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups." J Virol **67**(11): 6424-31.
- Ordóñez, R. M., Espinosa, A. M., Sánchez-González, D. J., Armendariz-Borunda, J. and Berumen, J. (2004). "Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription." J Gen Virol **85**(Pt 6): 1433-44.
- Paavonen, J., Jenkins, D., Bosch, F. X., Naud, P., Salmeron, J., Wheeler, C. M., Chow, S. N., Apter, D. L., Kitchener, H. C., Castellsague, X., de Carvalho, N. S., Skinner, S. R., Harper, D. M., Hedrick, J. A., Jaisamrarn, U., et al. (2007). "Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial." Lancet **369**(9580): 2161-70.
- Pande, S., Jain, N., Prusty, B. K., Bhambhani, S., Gupta, S., Sharma, R., Batra, S. and Das, B. C. (2008). "Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India." J Clin Microbiol **46**(3): 1060-6.
- Papanicolaou, G. N. (1957). "The cancer-diagnostic potential of uterine exfoliative cytology." CA Cancer J Clin **7**(4): 124-35.
- Park, J. S., Hwang, E. S., Lee, C. J., Kim, C. J., Rha, J. G., Kim, S. J., Namkoong, S. E. and Um, S. J. (1999). "Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia." Gynecol Oncol **74**(1): 23-9.
- Patel, H., Wagner, M., Singhal, P. and Kothari, S. (2013). "Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts." BMC Infect Dis **13**: 39.
- Picconi, M. A., Alonio, L. V., Sicheo, L., Mbayed, V., Villa, L. L., Gronda, J., Campos, R. and Teyssie, A. (2003). "Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina." J Med Virol **69**(4): 546-52.
- Picconi, M. A. and Villa, L. L. (2012). "Detección molecular y clasificación de tipos del VPH en la práctica clínica y en laboratorios de referencia." HPV Today **27**: 13.
- Robles, S. (2006) "Cervical cancer: fighting a leading killer in the Americas. Pan American Health Organization. Non- Communicable Diseases Program." **Volume**, DOI:
- Sathish, N., Abraham, P., Peedicayil, A., Sridharan, G. and Chandy, G. (2005). "HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia." Cancer Lett **229**(1): 93-9.

- Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. and Wacholder, S. (2007). "Human papillomavirus and cervical cancer." Lancet **370**(9590): 890-907.
- Schiffman, M., Clifford, G. and Buonaguro, F. M. (2009). "Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline." Infect Agent Cancer **4**: 8.
- Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., Desalle, R., Befano, B., Yu, K., Safaeian, M., Sherman, M. E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Solomon, D., Castle, P. E. and Burk, R. D. (2010). "A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia." Cancer Res **70**(8): 3159-69.
- Schiller, J. T., Castellsague, X. and Garland, S. M. (2012). "A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines." Vaccine **30 Suppl 5**: F123-38.
- Schiller, J. T., Castellsague, X., Villa, L. L. and Hildesheim, A. (2008). "An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results." Vaccine **26 Suppl 10**: K53-61.
- Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M., Suhai, S. and Rowekamp, W. G. (1985). "Human papillomavirus type 16 DNA sequence." Virology **145**(1): 181-5.
- Sichero, L., Ferreira, S., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A., Franco, E. L. and Villa, L. L. (2007). "High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18." Int J Cancer **120**(8): 1763-8.
- Sichero, L., Franco, E. L. and Villa, L. L. (2005). "Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18." J Infect Dis **191**(5): 739-42.
- Sichero, L., Sobrinho, J. S. and Villa, L. L. (2012). "Identification of novel cellular transcription factors that regulate early promoters of human papillomavirus types 18 and 16." J Infect Dis **206**(6): 867-74.
- Sichero, L., Sobrinho, J. S. and Villa, L. L. (2012). "Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants." Virology **432**(1): 127-32.
- Sichero, L. and Villa, L. L. (2006). "Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus." Braz J Med Biol Res **39**(6): 707-17.
- Smith, J. S., Bosetti, C., Munoz, N., Herrero, R., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., Meijer, C. J., Van Den Brule, A. J., Franceschi, S. and Peeling, R. W. (2004). "Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study." Int J Cancer **111**(3): 431-9.
- Smith, J. S., Herrero, R., Bosetti, C., Munoz, N., Bosch, F. X., Eluf-Neto, J., Castellsague, X., Meijer, C. J., Van den Brule, A. J., Franceschi, S. and Ashley, R. (2002). "Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer." J Natl Cancer Inst **94**(21): 1604-13.

- Snijders, P. J., Heideman, D. A. and Meijer, C. J. (2012). "Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens." Apmis **118**(6-7): 520-8.
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T., Jr. and Young, N. (2002). "The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology." Jama **287**(16): 2114-9.
- Stanley, M. (2010). "HPV - immune response to infection and vaccination." Infect Agent Cancer **5**: 19.
- Stanley, M. (2010). "Prophylactic human papillomavirus vaccines: will they do their job?" J Intern Med **267**(3): 251-9.
- Stanley, M. A. (2012). "Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus." Clin Microbiol Rev **25**(2): 215-22.
- Stephen, A. L., Thompson, C. H., Tattersall, M. H., Cossart, Y. E. and Rose, B. R. (2000). "Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of HPV 16 cervical cancer isolates from central China." Int J Cancer **86**(5): 695-701.
- Stoler, M. H. (2000). "Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis." Int J Gynecol Pathol **19**(1): 16-28.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." Mol Biol Evol **24**(8): 1596-9.
- Tonon, S. A., Basiletti, J., Badano, I., Alonio, L. V., Villa, L. L., Teyssie, A. R. and Picconi, M. A. (2007). "Human papillomavirus type 16 molecular variants in Guarani Indian women from Misiones, Argentina." Int J Infect Dis **11**(1): 76-81.
- Tornesello, M. L., Buonaguro, F. M., Buonaguro, L., Salatiello, I., Beth-Giraldo, E. and Giraldo, G. (2000). "Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas." J Gen Virol **81**(Pt 12): 2969-82.
- Touze, A., El Mehdaoui, S., Sizaret, P. Y., Mougin, C., Munoz, N. and Coursaget, P. (1998). "The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system." J Clin Microbiol **36**(7): 2046-51.
- Trottier, H. and Franco, E. L. (2006). "The epidemiology of genital human papillomavirus infection." Vaccine **24**(1): S1-15.
- Tu, J. J., Kuhn, L., Denny, L., Beattie, K. J., Lorincz, A. and Wright, T. C., Jr. (2006). "Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa." Int J Gynecol Cancer **16**(2): 736-42.

- Van Doorslaer, K., Bernard, H. U., Chen, Z., de Villiers, E. M., zur Hausen, H. and Burk, R. D. (2011). "Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature." Trends Microbiol **19**(2): 49-50; author reply 50-1.
- Van Ranst, M. A., Tachezy, R. and Burk, R. D. (1996). "Human papillomaviruses: a neverending story?" In Lacey, C. (ed). Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses.: 1-19.
- Veress, G., Szarka, K., Dong, X. P., Gergely, L. and Pfister, H. (1999). "Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16." J Gen Virol **80** (Pt 4): 1035-43.
- Villa, L. L., Sichero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T. and Franco, E. L. (2000). "Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia." J Gen Virol **81**(Pt 12): 2959-68.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. and Munoz, N. (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**(1): 12-9.
- Wheeler, C. M. (2008). "Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer." Obstet Gynecol Clin North Am **35**(4): 519-36; vii.
- WHO (2001). "The current status of development of prophylactic vaccines against human papillomavirus infection." Report of a technical meeting in Geneva.
- WHO (2009). WHO HPV Position Paper. Human papillomavirus vaccines. Weekly Epidemiol Rec. **84**: 118–31.
- Xi, L. F., Critchlow, C. W., Wheeler, C. M., Koutsky, L. A., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Hawes, S. E., Surawicz, C., Goldbaum, G., Holmes, K. K. and Kiviat, N. B. (1998). "Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants." Cancer Res **58**(17): 3839-44.
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Wheeler, C. M., Holmes, K. K. and Kiviat, N. B. (1997). "Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia." J Natl Cancer Inst **89**(11): 796-802.
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Hildesheim, A., Galloway, D. A., Wheeler, C. M., Winer, R. L., Ho, J. and Kiviat, N. B. (2007). "Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(1): 4-10.
- Yamada, T., Manos, M. M., Peto, J., Greer, C. E., Munoz, N., Bosch, F. X. and Wheeler, C. M. (1997). "Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective." J Virol **71**(3): 2463-72.

- Yamada, T., Wheeler, C. M., Halpern, A. L., Stewart, A. C., Hildesheim, A. and Jenison, S. A. (1995). "Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments." J Virol **69**(12): 7743-53.
- Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C. A., Shai, A., Lambert, P. F., Lichtig, H., Tommasino, M. and Sherman, L. (2009). "Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis." Virology **383**(1): 69-77.
- Zuna, R. E., Moore, W. E., Shanesmith, R. P., Dunn, S. T., Wang, S. S., Schiffman, M., Blakey, G. L. and Teel, T. (2009). "Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population." Int J Cancer **125**(11): 2609-13.
- zur Hausen, H. (1996). "Papillomavirus infections--a major cause of human cancers." Biochim Biophys Acta **1288**(2): F55-78.