



**UAGro**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**



**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“Variantes E6 del VPH 16 y su asociación con el estado físico y la carga viral en la carcinogénesis cervical”**

## **T E S I S**

**Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biomédicas**

**P R E S E N T A:**

**M en C. Julio Ortiz Ortiz**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Berenice Illades Aguiar**

**CODIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña**

**Chilpancingo, Guerrero. Enero de 2015.**

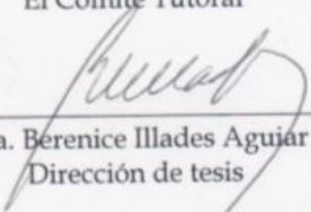


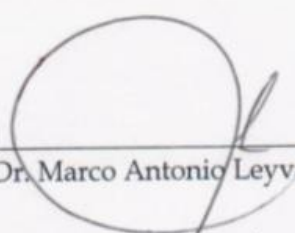
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**


ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

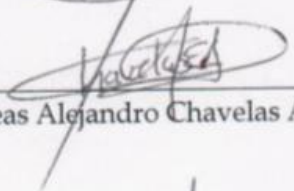
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de julio del dos mil catorce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **“Variantes E6 del VPH 16 y su asociación con el estado físico y la carga viral en la carcinogénesis cervical”**, presentada por el alumno Julio Ortíz Ortiz, para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

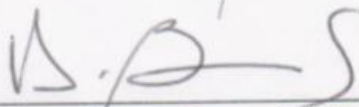
El Comité Tutorial


  
 Dra. Berenice Illades Aguiar  
 Dirección de tesis


  
 Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

  
 Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

  
 Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

  
 Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
  
 Vo. Bo  
 Dra. Isela Parra Rojas  
 Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
  
 UAGro  
 Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas  
 Vo. Bo  
 DIRECCIÓN 2014-2018  
 Dra. Amalia Vences Velázquez  
 Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de:  
Dra. Berenice Illades Aguiar

Además contó con la Co-dirección de:  
Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña (UANL)

Y con la asesoría de:  
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero  
Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez  
Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

Esta investigación se desarrolló con financiamiento otorgado por la Universidad Autónoma de Guerrero “Convocatoria 2013” y por el CONACYT Fondo-Sectorial de Investigación en Salud Proyecto 201579.

Durante el periodo en que cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, el C. Julio Ortiz Ortiz: realizó una estancia de investigación en el departamento de **Molecular Biology and Biochemistry, School of Biological Sciences, University of California Irvine, Irvine, CA, USA**, donde recibió asesoría sobre secuenciación y análisis filogenético de variantes de VPH 16. Fue beneficiado por la UAGro con la firma de un convenio de Beca de Superación Académica para estudios de Doctorado y recibió beca **CONACYT**.

## **Agradecimientos**

A **Dios**; por estar siempre conmigo y permitirme cumplir una más de mis metas. *Josué 1 5-9*

A la **Dra. Berenice Illades Aguiar**; por brindarme una excelente asesoría académica, su amistad, sus sabios consejos y la confianza para realizar este trabajo. Por el tiempo invertido en la revisión y corrección del manuscrito del artículo y por el honor de ser parte de su equipo de trabajo.

Al **Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña**; por el tiempo invertido en la revisión del manuscrito del artículo y la tesis. Por sus aportaciones y sugerencias para mejorar este trabajo y compartir conmigo sus conocimientos y experiencia académica.

A los integrantes de mi comité tutorial, **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez y Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame**; por el tiempo invertido en la revisión de la tesis. Por sus aportaciones y sugerencias para mejorar este trabajo y por la amistad y experiencia académica que cada uno de ustedes ha compartido conmigo.

Al **Dr. Víctor Hugo Garzón Barrientos**; por brindarme todas las facilidades para llevar a cabo la captación de biopsias de pacientes en el IECAN, hecho que permitió concluir satisfactoriamente este trabajo. Sobre todo, por brindarme su amistad y apoyo constante en el ámbito profesional y personal.

Al **PhD. Hans Ulrich Bernard**; por recibirme en su laboratorio y brindarme una excelente asesoría académica durante mi estancia en la Universidad de Irvine California. ¡Fue una grata experiencia!

A los **PhD. Itzel E. Calleja-Macías y Jorge Mauricio Reyes-Ruiz**; por recibirme en su hogar y hacerme sentir en familia. Por brindarme su amistad y una excelente asesoría académica durante mi estancia en la Universidad de Irvine California. ¡Hicieron de todo ésto, una experiencia inolvidable!

A la **PhD. Mina Kalantari**; por brindarme su amistad y una excelente asesoría académica durante mi estancia en la Universidad de Irvine California. ¡Fue un placer trabajar con usted!

Al **Dr. Marco Antonio Jiménez López**; por brindarme su amistad, colaboración, apoyo profesional y por realizar el diagnóstico histológico de las biopsias de CaCU, utilizadas en este trabajo.

Al **Dr. José Guadalupe Muñoz Camacho**; por su colaboración, apoyo profesional y disponibilidad para llevar a cabo la captación de pacientes y la toma de biopsias de CaCU, utilizadas en este trabajo.

A la **MC. Mónica Virginia Saavedra Herrera**; por brindarme su amistad y el apoyo logístico necesario en la recolección de biopsias y datos de las pacientes incluídas en este estudio.

Al **Personal del Instituto Estatal de Cancerología**; por su colaboración en la captación de pacientes, toma de biopsias y recolección de datos de las pacientes incluídas en este estudio.

Al **M C. Noelio Zamudio López, QBP. Natividad Sales Linares, Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán, Dr. Oscar del Moral Hernández, MC. Miguel Ángel Rodríguez Barrera, QBP. Eric Genaro Salmerón Bárcenas, MC. Alinne A. Rivas Alarcón, QBP. Josué Feliciano Ortiz**; Por brindarme su amistad, colaboración, apoyo técnico y profesional durante el desarrollo de este trabajo.

A **Hilda, Dino y Gaby**; por la inolvidable experiencia de compartir con ustedes esta etapa y superar juntos todos los obstáculos que se presentaron. Por los grandiosos momentos que compartimos y que fortalecieron nuestra amistad. **¡Les deseo mucho éxito!** Recuerden; **¡Los ideales son pacíficos...!**

## **Dedicatorias**

A **Dios**; por su infinito amor y misericordia para conmigo, por darme la fuerza y capacidad para cumplir cada meta. Por el privilegio y la bendición de conocerlo.

A **mis Padres Juanita<sup>†</sup> y Genaro<sup>†</sup>**; por el infinito amor, enseñanzas y consejos que que aun perduran. ¡Siempre los recordaré, los **AMO!**

A **Hilda**; por llenar mi vida de Amor, por su comprensión y paciencia, sobre todo en los momentos difíciles. Por el privilegio de formar parte de tu vida, pero sobre todo, por ser parte esencial de la mía y caminar ami lado todos estos años. **¡TE AMO ahora y siempre!**

A **mi Familia**; Francisco, Ade, Don<sup>†</sup>, Toña, Meche, Max, Dulce<sup>†</sup>, Migue, Manolo, Dulce, Yami, Isra, Costa, Juan, Josué y a todos los integrantes de ésta mi hermosa familia, quienes siempre han estado o estuvieron conmigo a lo largo de mi vida brindándome su cariño, confianza y apoyo para cumplir cada una de mis metas. ¡Es un privilegio ser parte de esta gran familia, los **AMO!**

A las familias **Jiménez-Wences, Jiménez-Chan, Wences-Martínez y Galán-Bello**; por la amistad, confianza y apoyo que me han brindado. ¡Por el privilegio de conocerlos y compartir con ustedes tan gratos momentos en familia!

A **Doña Bertha<sup>†</sup> y Doña Eva<sup>†</sup>**; por la amistad, confianza, cariño y apoyo que siempre me brindaron en todo momento. ¡Siempre las recordaré!

A **mis Amigos del laboratorio de Investigación clínica y de la Central de Laboratorios**; por la amistad, confianza y apoyo que me han brindado y por compartir conmigo tan gratos momentos!

A **mis compañeritos y amigos de laboratorio de Biomedicina**; con quienes hemos trabajado y convivido, haciendo que esas enormes y en ocasiones cansadas jornadas de trabajo fueran tan amenas. ¡Fue un placer compartir con ustedes el espacio de trabajo!

A **mis amigos**; quienes en algún momento de mi vida y durante este recorrido, han estado conmigo compartiendo gratos momentos y brindándome una palabra de aliento para seguir adelante y culminar de manera satisfactoria cada proyecto de vida. ¡Es un privilegio y una bendición contar con ustedes!

A **todas las personas** que de alguna forma han contribuido en la realización de este trabajo.

**¡Dios los bendiga!**

**“Variantes E6 del VPH 16 y su asociación con el estado físico y la carga viral en la carcinogénesis cervical”**

**ÍNDICE**

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>Resultados</b>	
<b>Capítulo 1</b>	
Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico.....	<b>12</b>
<b>Capítulo 2</b>	
Asociación del estado físico y la carga viral con las variantes E6 del VPH 16, lesiones precursoras y cáncer cervical en mujeres del sur de México.....	<b>36</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>72</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>78</b>

## **Resumen**

**Introducción:** La infección persistente con virus de papiloma humano tipo 16 (VPH 16) es una de las principales causas del cáncer cérvicouterino (CaCU), pero sólo una fracción de las mujeres infectadas desarrollan esta neoplasia. Se ha sugerido que la carga viral alta, la integración al genoma de las pacientes y el tipo de variante viral contribuyen en la progresión de una lesión escamosa intraepitelial (LEI) cervical hacia cáncer. Se ha propuesto a la carga viral y al estado físico como marcadores de progresión, sin embargo, la variabilidad de resultados ha limitado su uso clínico. Estudios recientes sugieren que dicha variabilidad se relaciona con las variantes de VPH 16, pero esta relación, así como el papel que juegan en la progresión de la patología, aún no están bien esclarecidos. **Objetivo:** Investigar la variabilidad genética, clasificar las variantes del VPH 16, determinar el estado físico de su genoma y la carga viral para evaluar su asociación con las variantes E6, las lesiones precursoras y el CaCU en mujeres guerrerenses. **Métodos:** Se utilizó DNA de células cervicales con infección por VPH 16 obtenido de 97 raspados cervicales de mujeres sin LEI, 123 con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), 19 biopsias con lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) y 91 con CaCU. El gen E6 del VPH 16 fue amplificado, se secuenció y se comparó con la secuencia de referencia en el Gen Bank (VPH16R). Se construyó un árbol filogenético para identificar y clasificar las variantes E6 del HPV 16. El estado físico del genoma viral y la carga viral se determinó amplificando y cuantificando los genes E6, E2 y RNAsa P, mediante PCR en tiempo real usando iniciadores específicos y sondas TaqMan. El análisis estadístico se realizó en los programas IBM SPSS Statistics V. 22 y STATA V.11, usando las pruebas de: Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y  $X^2$ . Se calculó el índice Kappa y la razón de momios con intervalos de confianza del 95%, ajustado por edad. **Resultados:** Se detectaron 27 variantes E6 del VPH 16: la más común fue E-G350 seguida por la E-prototipo, E-C188/G350, AA-a, AA-c y E-A176/G350. Se encontraron ocho nuevas variantes E6. Dos de ellas conducen a cambio de aminoácido: E-C183/G350 (I27T) y E-C306/G350 (K68T). La variante con el mayor riesgo de conducir al desarrollo de CaCU fue AA-a (OR=69.01; IC=7.57-628.96). La variante que presentó la asociación más fuerte con la carga viral alta fue la AA-c

(OR=20.52; IC=3.43-122.82) seguida por la AA-a (OR=19.54; IC=5.17-73.79), ambas del sublinaje AA1. La carga viral alta también mostró asociación con CCE (OR=11.25; IC=4.31-29.35), ADC (OR=6.38; IC=1.09-37.31) y LEIAG (OR=5.64; IC=1.38-23.01). Solo la variante AA-a presentó asociación con el estado integrado (OR=13.76, IC=1.58-∞) y la E-G350 con el estado mixto (OR=2.87, IC=1.10-7.52). Las variantes AA-a y AA-c mostraron asociación con la integración cuando el rompimiento del genoma se llevó a cabo en la región de bisagra (OR=29.10; IC=3.48-∞ y OR=12.74; IC=1.46-∞ respectivamente). La única variante que mostró asociación con la carga viral alta e integración viral fue la AA-a (OR=19.54; IC=5.17-73.79 y OR=13.76; IC=1.58-∞ respectivamente). **Conclusiones:** Las variantes más frecuentes en mujeres con CaCU fueron E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350 y E-A176/G350. Todas se asociaron con la carga viral alta y con el desarrollo de CaCU. La carga viral incrementa a medida que aumenta la severidad de la lesión durante la carcinogénesis cervical mediada por VPH 16. Los resultados de este estudio sugieren que la variante AA-a del VPH 16 con carga viral alta e integración de su genoma es un gran riesgo oncogénico para el desarrollo del CaCU en México.



## **Introducción**

El cáncer cérvicouterino (CaCU) es la tercera neoplasia más común entre mujeres de todo el mundo con un estimado de 527,624 nuevos casos y 265,653 muertes en 2012 (Ferlay *et al.*, 2013). En México cerca de 13,960 nuevos casos de CaCU son diagnosticados anualmente, siendo la segunda causa de cáncer en mujeres y el más común en mujeres de edad entre 15 a 44 años (Ferlay *et al.*, 2013). En Guerrero el número de muertes por CaCU se redujo de 141 casos en 2009 a 96 en 2010. Sin embargo esta cifra aun es alta, ya que indica la muerte de ocho mujeres por mes; es decir, una cada cuatro días (Gobierno del Estado de Guerrero, 2011). Desde el punto de vista epidemiológico el CaCU muestra heterogeneidad en las diferentes regiones del país, además, la región sur tiene la tasa de mortalidad y el riesgo de mortalidad más altas (Illades-Aguiar, *et al.*, 2010).

El CaCU se caracteriza por lesiones precursoras que pueden ser observadas sobre un examen citológico de células cervicales exfoliadas y confirmadas sobre un examen histológico de material cervical. Estas lesiones representan un espectro de anomalías histológicas que van de una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), que implica un crecimiento anormal mínimo en el primer tercio del epitelio, donde se puede observar la presencia de coilocitos característicos de la infección por virus del papiloma humano (VPH), hasta una lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG), donde las alteraciones progresan en espesor, desde el segundo tercio hasta llegar a las capas superficiales del epitelio. (Lacruz, *et al.*, 2003, Woodman, *et al.*, 2007).

La infección persistente por VPH es una causa necesaria para el desarrollo de CaCU y sus lesiones precursoras (Zur Hausen, 2002). Sin embargo, para que éste se desarrolle se requiere de múltiples factores adicionales, tales como; la expresión continua de los oncogenes virales E6 y E7, la integración del DNA viral en el DNA de la célula huésped y el rompimiento del gen E2 (de Villiers, *et al.*, 2004, Muñoz, *et al.*, 2006, Lizano, *et al.*, 2009). De los más de 100 tipos de VPH descritos, del 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 existe evidencia suficiente de su carcinogenicidad

(de Villiers, *et al.*, 2004, Muñoz, *et al.*, 2006). El VPH 16 es el genotipo más frecuente en LEIAG y CaCU (Clifford, *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2011) detectándose en más de la mitad de los casos de CaCU a nivel mundial (Li *et al.*, 2011, Guan, *et al.*, 2012).

El genoma del VPH 16 consta de una molécula de DNA de 7,906 pares de bases (pb), el cual contiene una región larga de control (LCR de sus siglas en inglés) o región reguladora río arriba (URR de sus siglas en inglés); en la cual se encuentra el promotor P97 responsable de la expresión de los genes tempranos, una pequeña región no codificante altamente variable entre los genes E5 y L2, una región de genes tempranos (E1 a E7), en la cual se encuentra el promotor P670 responsable de la expresión de genes tardíos (L), y una región de genes tardíos (L1 y L2) (Seedorf, *et al.*, 1985, Zheng and Baker, 2006).

El gen E2 tiene un tamaño de 1098 pb (Seedorf, *et al.*, 1985), codifica para la proteína nuclear E2, la cual se une al DNA en el promotor, para regular la replicación del DNA viral mediante su interacción con E1 y la transcripción de los genes E6 y E7 (Taylor, *et al.*, 2003, López-Saavedra, y Lizano-Soberón, 2006). El gen E6 tiene un tamaño de 477 pb (Seedorf, *et al.*, 1985), codifica para la proteína E6, la cual tiene la capacidad de unirse e inducir la degradación de un gran número de proteínas celulares como p53 (cuadro 1), para bloquear la apoptosis, regular la transcripción viral, disminuir la diferenciación celular y las interacciones célula-célula, e incrementar la inestabilidad cromosómica, además, altera la transcripción de genes celulares a través de su interacción con p300 y CBP, e incrementa la vida celular por la sobre activación de la telomerasa (Garnett and Duerksen-Hughes, 2006, Narisawa *et al.*, 2007, Tungteakkhun, *et al.*, 2008). Además E6, puede retener a P53 en el citoplasma, bloqueando su translocación al núcleo e inhibiendo así su función independientemente de su degradación (López-Saavedra, y Lizano-Soberón, 2006). También se ha reportado que E6 de VPH 16 está involucrado en la desregulación de miR-218 en CaCU (Greco, *et al.*, 2011).

**Cuadro 1.** Proteínas blanco, función y efecto de su interacción con E6 (Narisawa, *et al.*, 2007, Tungteakkhun, *et al.*, 2008).

Proteína celular blanco	Función celular de la proteína blanco	Efecto de la interacción con E6
Bak	Induce apoptosis	Inhibición de la apoptosis.
CBP/P300	Activa genes de control del ciclo celular.	Regulación negativa de la transcripción dependiente de p53.
C-MyC	Induce apoptosis.	Inhibición de la apoptosis.
E6AP	Regula la transducción de señales en células en proliferación.	Desregulación de las señales de transducción.
E6TP1	Activa la GTPasa (GAP).	Inhibición de la señal mitogénica mediada por Rab.
ERC55(E6BP)	Participa en la diferenciación de las células epiteliales.	Inhibición de la diferenciación terminal de células epiteliales.
hDLG	Participa en la polaridad de células epiteliales en diferenciación.	Alteración de la adhesión celular, polaridad y proliferación.
HScrib	Controla la formación de uniones intercelulares epiteliales.	Pérdida de la adhesión y polaridad celular.
IRF-3	Induce la transcripción del RNAm del interferón $\beta$ .	Respuesta inadecuada a la infección viral.
MAGI-1/2/3	Forma un complejo con $\beta$ -catenina.	Alteración de la señalización de Akt.
Mcm7	Participa en la replicación del DNA.	Omisión del punto de arresto en G1.
Mupp1	Induce la transducción de señales.	Alteración del ensamblaje de los complejos de señalamiento en las membranas celulares.
Paxilina	Ayuda a estabilizar el citoesqueleto de actina.	Rompimiento del citoesqueleto de actina.
p53	Induce la transcripción de genes reparadores de daño celular.	Pérdida del control del ciclo celular.
XRCC1	Participa en la reparación del DNA.	Interferencia en la reparación de DNA.
TLR9	Activa la respuesta inmune innata.	Bloqueo la transcripción del gen TLR9.
FADD	Activa la caspasa-8.	Inhibición de la función de FADD/Supresión de apoptosis.
Procasapa 8	Activa caspasas efectoras.	Inhibición de la función de la procaspasa 8/ Supresión de apoptosis.

La investigación en los últimos años ha confirmado que la comparación de genomas completos, genes individuales o fragmentos de genes, permiten la construcción de árboles filogenéticos que resumen la historia evolutiva de los VPHs, como un prerrequisito para establecer los grupos taxonómicos (Bernard, *et al.*, 2010). La evolución de los papilomavirus expresada a través de árboles filogenéticos, está estrechamente ligada al huésped, al tropismo tisular, la conducta biológica y al potencial neoplásico. Los papilomavirus han evolucionado a lo largo de millones de años a partir de ancestros comunes en los ecosistemas de huéspedes específicos. Por ejemplo, la topología del árbol filogenético del género  $\alpha$ -VPH, basada en la información del genoma completo o restringida a la región temprana del genoma, predice fuertemente el comportamiento viral, incluyendo tropismo tisular altamente específico, inducción de anormalidades celulares y persistencia relacionada a la carcinogenicidad (Schiffman, *et al.*, 2010).

La sistemática de los VPHs ha sido inferida tradicionalmente del gen L1, definiendo nucleótidos claves para identificar umbrales de delimitación de las unidades taxonómicas más grandes, tales como género y especie (Gottschling, *et al.*, 2007). Un genotipo de VPH es definido por una diferencia de al menos 10% en el gen L1, comparado con un tipo de VPH previamente categorizado y ya bien conocido. Una diferencia de entre 2 a 10% constituye un subtipo y menos de un 2% de diferencia define una variante. Una nueva variante puede ser designada por abreviaturas arbitrarias, por lo que para identificar una variante se pueden analizar pequeñas secuencias del genoma, como por ejemplo 400 pb de la LCR o los 450 pb del gen E6. Se denomina variante a cada aislado que difiere del prototipo por al menos un nucleótido (Yamada, *et al.*, 1997, De Villiers, *et al.*, 2004, Rogers and Angeletti, 2011, Smith, *et al.*, 2011). Una propuesta reciente define como linaje o rama principal de una variante, cuando ésta difiere por aproximadamente 1.0% del genoma completo del mismo tipo de VPH. Y cuando la diferencia es de entre 0.5 a 0.9 % se le denomina sublinaje (Burk, *et al.*, 2011, Chen, *et al.*, 2011).

Genéticamente, los VPs evolucionan lentamente, con un porcentaje de mutación de  $\sim 2 \pm 0.5 \times 10^{-8}$  por nucleótido por año. Los polimorfismos de nucleótidos en sus genomas se originan a través de mutaciones aleatorias, que subsecuentemente llegan a ser fijas en un pequeño número de linajes virales dentro de cada tipo (Smith, *et al.*, 2011). Por su heterogeneidad en la secuencia del gen E6 y de la LCR, se han identificado cuatro linajes principales que son reconocidos por la nomenclatura de estudios previos: 1) Europea-Asiática (EAS), que incluye los sublinajes Europea (EUR) y Asiática (As). 2) Africana 1 (AFR1), que incluye dos sublinajes tentativamente definidos como AFR1a y AFR1b. 3) Africana 2 (AFR2), que incluye dos sublinajes tentativamente definidos como AFR2a y AFR2b. 4) Norte Americana/Asiático Americana (NA/AA), que incluye los sublinajes Norte Americana (NA), Asiático Americana-1 (AA1) y Asiático Americana-2 (AA2) (Bernard, *et al.*, 2006, Huertas-Salgado, *et al.*, 2011, Tornesello, *et al.*, 2011, Cornet, *et al.*, 2012). Además, el análisis de la variación genética en la región E6 ha permitido clasificar también a las ramas mayores, en clases y subclases (Huertas-Salgado, *et al.*, 2011).

Datos moleculares y epidemiológicos sugieren que las variantes del mismo tipo viral son biológicamente distintas y pueden conferir riesgos patogénicos diferenciales. También se ha visto que la distribución de estas variantes es diferente entre regiones geográficas y grupos étnicos del mundo, y se sugiere que las variantes del VPH 16 y de otros tipos de VPH coevolucionaron con los humanos, estimándose que su diversidad refleja una evolución de casi 200,000 años (Yamada, *et al.*, 1997, Bernard, *et al.*, 2006, Lizano, *et al.*, 2009, Schiffman, *et al.*, 2010).

Schiffman, *et al.*, (2010) en un estudio realizado en Guanacaste, San Jose, Costa Rica, encontraron que el riesgo más alto es para las variantes AA, por lo que sugieren que las variantes de VPH 16 han desarrollado tendencias claramente diferenciadas para la persistencia viral y la carcinogenicidad. Se ha reportado que la infección por las variantes AA o Af es más persistente y que el riesgo de desarrollar CaCU es tres veces mayor, comparado con la variante E (Lizano, *et al.*, 2009, Chen, *et al.*, 2011). Tornesello, *et al.*, (2011) y otros grupos sugieren que las variantes AA están distribuidas en adenocarcinoma (ADC) y carcinoma de células escamosas (CCE) en diferentes regiones del mundo, pero que su prevalencia es relativamente más alta en centro y Sudamérica (Tornesello, *et al.*, 2011). Berumen, *et al.*, (2001) han sugerido un potencial oncogénico diferente entre las variantes E6 del VPH 16, habiendo reportado una mayor asociación a CaCU de las variantes AA con respecto a las E en mujeres mexicanas (OR=27; IC 95%=6.4-113.7 y OR=3.4; IC95%=1.9-6, respectivamente), lo que puede contribuir a la alta incidencia de CaCU en nuestro país. Además, establecieron que las mujeres mexicanas que lo padecen y que son positivas para la variante AA son 7.7 años más jóvenes a diferencia de las mujeres infectadas con la variante E. Esta variante se ha asociado a CCE, no así la AA, que también se ha asociado a ADC, el cual es biológicamente más agresivo. López-Revilla, *et al.*, (2009) reportaron en mujeres potosinas con lesiones precursoras una mayor frecuencia de variantes E, seguidas por la AA. Sin embargo, anteriormente Casas, *et al.*, (1999) mostraron que las variantes AA tienen capacidad de retener la integridad del gen E2 y que en células infectadas se genera un alto número de copias virales, sugiriendo que estas variantes se replican más rápido que las E y que

en consecuencia suelen tener propiedades biológicas distintas que las hacen más oncogénicas. Sin embargo, no hay que olvidar, que aunque en menor proporción que otras variantes, las E siguen poseyendo un riesgo muy alto para el desarrollo del CaCU (Schiffman, *et al.*, 2010).

Por su parte, Illades-Aguilar, *et al.*, (2010), en un estudio realizado en el estado de Guerrero, encontraron que la variante más frecuente en los casos estudiados fue la E, seguida de las subclases AA-a y AA-c. El 35% de los casos de CaCU fueron positivos a la variante AA, siendo la más frecuente la subvariante AA-c, la cual sólo se encontró en estos casos. Tomando en cuenta que la variante AA y en particular la subvariante AA-c es considerada más oncogénica que la E-Prototipo, la presencia de esta variante en el 35% de los casos de CaCU en este estudio, podría contribuir a explicar la alta incidencia y mortalidad por este cáncer en México.

Por otro lado, diversos estudios han mostrado que la infección persistente por VPH está fuertemente asociada con el desarrollo de LEIAG (Koshiol, *et al.*, 2007) y se ha sugerido que la carga viral alta, la cual resulta de la replicación viral, juega un papel importante en dicha asociación. Además, varios estudios han sugerido también que la detección del mismo tipo de VPH de alto riesgo (VPH-AR), a lo largo del tiempo, es particularmente importante para la carcinogénesis cervical. De hecho, algunos estudios han reportado que la carga viral de VPH 16 incrementa durante la carcinogénesis cervical (Theelen, *et al.*, 2010) y se asocia con la progresión de una LEIAG hacia CaCU (Gravitt *et al.*, 2007). Por lo tanto, la persistencia tipo específica de VPH-AR favorecida por la carga viral alta principalmente del VPH 16, se ha sugerido como marcador diagnóstico de LEIAG en estudios de tamizaje (Koshiol, *et al.*, 2007) y como un marcador de riesgo dependiente del tipo de VPH para la progresión de LEIAG hacia CaCU (Boulet, *et al.*, 2008, Kim, *et al.*, 2008, Azizi, *et al.*, 2008).

Otro evento que se considera clave en la progresión de una LEI cervical hacia CaCU, es la integración del genoma viral al genoma celular de la paciente (Kalantari, *et al.*,

1998, Peitsaro, *et al.*, 2002, Kulmala, *et al.*, 2006, Cricca, *et al.*, 2007, Qiu, *et al.*, 2007, Ramanakumar, *et al.*, 2010, Chang, *et al.*, 2013). En la mayoría de los casos se ha mostrado que la integración ocurre cuando el DNA viral se rompe en el gen E2 (Tonon, *et al.*, 2001, Cricca, *et al.*, 2009, Li, *et al.*, 2013), anulando la expresión de la proteína E2 y favoreciendo la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, así como la desregulación del ciclo celular mediante la degradación de proteínas como p53 y pRb (Munger, *et al.*, 2004). Li, *et al.*, (2013) reportaron que existen varios sitios de rompimiento en el genoma del VPH 16 localizados en todos los genes con excepción de E7, E5 y la región URR. Sin embargo, de todos los sitios de rompimiento que reportaron, sólo los localizados en el gene E2 y en la región de traslape E2/E4 mostraron asociación con LEIAG y CaCU, por lo que sugiere que el rompimiento del genoma del VPH 16 y su integración no son eventos aleatorios. Estudios previos también han descrito varios sitios de rompimiento relacionados con la integración del genoma viral ubicados en los nucleótidos 2755, 2974, 3118, 3132, 3134, 3541, 3562 y 3597 de las regiones que codifican los dominios de transactivación y de bisagra de la proteína E2 (Kalantari, *et al.*, 2001, Arias-pulido, *et al.*, 2006, Cheung, *et al.*, 2006, Azizi, *et al.*, 2008, Dall, *et al.*, 2008, Collins, *et al.*, 2009, Tsakogiannis, *et al.*, 2012). Se ha visto que en los casos de CaCU inducidos por VPH 16, el genoma de éste se encuentra en forma episomal, integrado en el genoma de la célula huésped o en ambas formas (Koskimaa, *et al.*, 2010). De hecho, los porcentajes de integración reportados entre los diversos estudios, varían de 8 a 100% en mujeres sin LEI y de 36 a 100% en aquellas con LEIAG (Jiang, *et al.*, 2009), por lo que se sugiere que la integración del genoma viral al de la célula huésped da como resultado el desarrollo de CaCU (Taylor, *et al.*, 2003, Theelen, *et al.*, 2010). Además, Jeon, *et al.*, (1995) en un estudio realizado *in vitro* encontraron que las células con el genoma del VPH 16 integrado, comparado con las que lo portan episomal, tienen una ventaja de crecimiento selectivo. Sin embargo, a pesar de que varios estudios han encontrado asociación entre la carga viral y la integración con el desarrollo de CaCU, en análisis por separado, Azizi, *et al.*, (2008) no encontraron asociación significativa de la carga viral, la integración y polimorfismos en E2 de VPH 16 con el desarrollo de CaCU. Además, el análisis de casos de CaCU sin integración

del genoma viral al celular, ha mostrado que el rompimiento del gen E2 puede no ser obligatorio para su desarrollo, pues ya se ha visto que otros mecanismos como la metilación de DNA viral están involucrados en el silenciamiento del gen E2 (Cheung, *et al.*, 2006, Cheung, *et al.*, 2013).

Adicionalmente, estudios en variantes del VPH 16 han reportado casos con eliminaciones de fragmentos largos en el genoma de variantes del sublinaje asiático, las cuales se asociaron con un alto riesgo de LEIAG y carcinoma de células escamosas (Cheung *et al.*, 2006). Se ha reportado variación en el gen E2, principalmente en las regiones que codifican la región de bisagra y el dominio de transactivación de la proteína E2. Además, se ha visto que en LEIBG el gen E2 se encuentra intacto, mientras que en todos los casos de LEIAG se rompe (Tsakogiannis, *et al.*, 2012). Por otra parte, el hallazgo de asociación de la variación de nucleótidos específicos con las variantes de los sublinajes AFR1, AFR2 y AA, sugiere que las variaciones en E2 podrían estar involucradas en mecanismos alternativos para desregular la expresión de los oncogenes E6 y E7 de las variantes del VPH 16 (Tsakogiannis, *et al.*, 2012). En los últimos años se ha sugerido que la carga viral y la integración del VPH 16 pueden verse afectados por la presencia de polimorfismos en el genoma de las variantes de VPH 16, principalmente en el gen E2 donde se ubican los sitios de rompimiento que más se asocian al desarrollo de CaCU y sus lesiones precursoras (Cheung, *et al.*, 2006, Qiu, *et al.*, 2007, Azizi, *et al.*, 2008, Jiang, *et al.*, 2009, Tsakogiannis, *et al.*, 2012, Cheung, *et al.*, 2013). Se ha sugerido que, además de la metodología empleada, la edad y el origen geográfico de la población estudiada, las variantes del VPH 16 podrían ser un factor que contribuye de manera importante en la variabilidad de resultados en la carga viral y estado físico del genoma del VPH 16 observado en los múltiples estudios realizados previamente (Cheung *et al.*, 2006, Qiu *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2013, Shukla *et al.*, 2014).

Tomando en cuenta que el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de



Guerrero, cuenta con un banco de DNA de más de 8,000 muestras cervicales colectadas de 1997 a 2012 en el Laboratorio de Citopatología de la Universidad Autónoma de Guerrero y en el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”, ubicado en Acapulco Guerrero. De las cuales, se seleccionaron 330 muestras positivas a VPH 16, con la finalidad de caracterizar las variantes de VPH 16, determinar su estado físico y carga viral en muestras de mujeres sin LEI, con LEIBG, LEIAG o CaCU. Con el propósito de evaluar la asociación del estado físico y la carga viral con las variantes E6 del VPH 16, así como con la presencia de lesiones precursoras y CaCU, para descubrir si las variaciones en la carga viral y el estado físico del genoma de VPH 16 dependen de las variantes E6 y se asocian con el desarrollo de CaCU, y de esta forma proveer información útil que ayude a entender la relación de la carga viral y el estado físico con las variantes E6 del VPH 16 en la progresión de la enfermedad. Lo anterior, contribuirá a mejorar el diagnóstico integral utilizando tecnología molecular y permitirá una mejor toma de decisiones respecto al seguimiento y tratamiento, mediante el diseño de estrategias terapéuticas individualizadas para las pacientes con CaCU infectadas con variantes del VPH 16.

## **Capítulo I**

**Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico.**

Correo de aceptación del artículo para su publicación en la Revista Virology Journal.

**Fecha:** 15 de enero de 2015 21:47:43 GMT-6

**De:** Virology Journal Editorial <[virologyjournal@biomedcentral.com](mailto:virologyjournal@biomedcentral.com)>

**Responder a:** Virology Journal Editorial <[virologyjournal@biomedcentral.com](mailto:virologyjournal@biomedcentral.com)>

**Para:** Dr BERENICE ILLADES-AGUIAR <[b.illadesaguiar@gmail.com](mailto:b.illadesaguiar@gmail.com)>

**Asunto:** **Your manuscript has been accepted for publication in principle.**

Authors: Julio Ortiz-Ortiz, Luz del Carmen Alarcón-Romero, Marco Antonio Jiménez-López, Víctor Hugo Garzón-Barrientos, Itzel Calleja-Macías, Hugo Alberto Barrera-Saldaña, Marco Antonio Leyva-Vázquez and Berenice Illades-Aguilar  
Title: Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico.

Journal: Virology Journal

MS : 6770901271453632

Dear Dr. Illades-Aguilar,

Peer review of your manuscript (above) is now complete and we are delighted to accept the manuscript for publication in Virology Journal.

Before publication, our production team needs to check the format of your manuscript, to ensure that it conforms to the standards of the journal. They will get in touch with you shortly to request any necessary changes or to confirm that none are needed.

If you have any problems or questions regarding your manuscript, please do get in touch.

Best wishes,

Mr Christopher Acuña  
on behalf of Gerard Orth

e-mail: [virologyjournal@biomedcentral.com](mailto:virologyjournal@biomedcentral.com)

Web: <http://www.virologyj.com/>

## **Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico.**

Julio Ortiz-Ortiz<sup>1</sup>, Luz del Carmen Alarcón-Romero<sup>2</sup>, Marco Antonio Jiménez-López<sup>3</sup>, Víctor Hugo Garzón-Barrientos<sup>3</sup>, Itzel Calleja-Macías<sup>4</sup>, Hugo Alberto Barrera-Saldaña<sup>5</sup>, Marco Antonio Leyva-Vázquez<sup>1</sup>, Berenice Illades-Aguiar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biomedicina Molecular y <sup>2</sup>Laboratorio de Citopatología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>3</sup>Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”, Acapulco, Guerrero, México.

<sup>4</sup>Molecular Biology and Biochemistry, School of Biological Sciences, University of California Irvine, Irvine, CA, USA.

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

\* Corresponding author

Email addresses:

JOO: [julioortiz771210@gmail.com](mailto:julioortiz771210@gmail.com)

LCAR: [luzdelcarmen14@gmail.com](mailto:luzdelcarmen14@gmail.com)

MAJL: [marcoajl16@gmail.com](mailto:marcoajl16@gmail.com)

VHGB: [director.iecan@guerrero.gob.mx](mailto:director.iecan@guerrero.gob.mx)

ICM: [itzel14@yahoo.com](mailto:itzel14@yahoo.com)

HABS: [habarrera@gmail.com](mailto:habarrera@gmail.com)

MALV: [leyvamarco13@gmail.com](mailto:leyvamarco13@gmail.com)

BIA (corresponding author): [b.illadesaguiar@gmail.com](mailto:b.illadesaguiar@gmail.com)

## **Abstract**

**Background:** HPV 16 is the cause of cervical carcinoma, but only a small fraction of women with HPV infection progress to this pathology. Besides persistent infection and HPV integration, several studies have suggested that HPV intratype variants may contribute to the development of cancer. The purpose of this study was to investigate the nucleotide variability and phylogenetically classify HPV 16 E6 variants circulating over a period of 16 years in women from Southern Mexico, and to analyze its association with precursor lesions and cervical carcinoma.

**Methods:** This study was conducted in 330 cervical DNA samples with HPV 16 from women who were residents of the State of Guerrero, located in Southern Mexico. According of cytological and/or histological diagnosis, samples were divided into the following four groups: no intraepithelial lesion (n=97), low-grade squamous intraepithelial lesion (n=123), high-grade squamous intraepithelial lesion (n=19) and cervical carcinoma (n=91). HPV 16 E6 gene was amplified, sequenced and aligned with reference sequence (HPV 16R) and a phylogenetic tree was constructed to identify and classify HPV 16 variants. Chi squared was used and data analysis and statistics were done with SPSS Statistics and STATA softwares.

**Results:** Twenty seven HPV 16 E6 variants were detected in women from Southern Mexico, 82.12% belonged to the EUR, 17.58% to AA1 and 0.3% to Afr2a sublineages. The most common was E-G350 (40%), followed by E-prototype (13.03%), E-C188/G350 (11.82%), AA-a (10.61%), AA-c (6.07%) and E-A176/G350 (5.15%). Eight new E6 variants were found and 2 of them lead to amino acid change: E-C183/G350 (I27T) and E-C306/G350 (K68T). The HPV 16 variant that showed the greatest risk of leading to the development of CC was AA-a (OR=69.01, CI=7.57-628.96), followed by E-A176/G350 (OR=39.82, CI=4.11-386.04), AA-c (OR=21.16, CI 2.59-172.56), E-G350 (OR=13.25, CI=2.02-87.12) and E-C188/G350 (OR=10.48, CI=1.39-78.92).

**Conclusions:** The variants more frequently found in women with cervical carcinoma are E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350 and E-A176/G350. All of them are associated with the development of cervical carcinoma, however, AA-a showed the highest association. This study reinforces the proposal that HPV 16 AA-a is an oncogenic risk for cervical carcinoma progression in Mexico.

**Keywords:** HPV 16 variants, cervical cancer, precursor lesions.

## **Background**

Infection by high risk human papillomavirus (HR-HPV) is necessary for the development of cervical carcinoma (CC) [1] and HPV 16 is the cause of more than half of CC worldwide [2]. Only a small fraction of women with HPV infection may progress to cervical carcinoma; however, the factors that favor this progression are still poorly understood. Besides persistent infection and HPV integration [3, 4], several studies have suggested that HPV intratype variants may contribute to cancer development [4-7].

Like other HR-HPV, HPV 16 has well preserved distinctive intratypic variants by geographical origin [8], their global distribution and risk of cervical carcinoma appears to be dependent on the population [9, 10]. Its phylogeny reflects evolutionary divergence associated with human migration patterns, suggesting that they may have co-diversified as human populations expanded worldwide [11]. HPV 16 variants have been classified into 4 major lineages and 9 sublineages based on common LCR and E6 single polymorphisms: (1) European-Asian (EAS), including European (EUR) and Asian (As) sublineages; (2) African 1 (AFR1), including Afr1a and Afr1b sublineages; (3) African 2 (AFR2), including Afr2a and Afr2b sublineages; and (4) Asian American/North American (AA/NA), including Asian American 1 (AA1), Asian American 2 (AA2) and North American (NA) sublineages [12].

Several reports have shown the presence of common polymorphisms that generate amino acid changes in the E6 oncoprotein, one of them is T350G, and is present in the four lineages. T350G causes a leucine to valine change (L83V), that leads to the split of the EUR sublineage into three classes, 350T (prototype sequence), 350C and 350G. Other polymorphisms including A131G, G132C, C143G, G145T, G176A, T178G and C335T generate the amino acid changes R10G/I, Q14H/D, D25E/N, I27R and H78Y, respectively [13]. It has been suggested that these polymorphisms and the subsequent amino acid changes in E6 HPV 16 variants may influence the persistence of HPV infection and its progression to cervical carcinoma [4, 14-18].

Epidemiologic data shows that regions with high incidence of cervical carcinoma like Latin America, Africa and Asia, also have a high prevalence of sublineages AA and Af [9]. Studies in Mexico have reported that persistent infection and risk of progression to cervical carcinoma is higher when HPV infection is caused by AA sub-lineages compared with EUR sublineages [5, 19-21].

Social disparities like access to social security health care services, ethnic groups, residence and socioeconomic level are factors associated with cervical carcinoma development [22]. The State of Guerrero, located in Southern Mexico, is the second poorest state in Mexico and a majority of inhabitants have a very low socioeconomic level. In this region, cervical carcinoma is the most common type of cancer in women and has the fourth highest mortality rate in the country with 12.5 deaths per 100,000 women, compared to the national mortality rate of 9.1 per 100,000 in 2008 [23].

We have previously shown that HPV 16 was the most commonly identified HPV genotype in cervical carcinoma and high grade squamous intraepithelial lesions in women from the State of Guerrero. We studied a sample of HPV 16 positive women and found E and AA variants [24]. It has been proposed that variants AA of HPV 16 are more oncogenic than E variants [5, 25].

Knowing the regional variants of HPV 16 is of great value for evolutionary, phylogenetic, epidemiological and biological analysis [13]. To further analyze the regional variants of HPV 16, the aim of this study was to investigate the nucleotide variability and phylogenetically classify HPV 16 E6 variants circulating over a period of 16 years in the Southern Mexican population, and to analyze its association with the whole spectrum of disease from no intraepithelial lesion in cervical epithelium to cervical carcinoma.

The most dominant HPV variants were detected in low and high-grade squamous intraepithelial lesion, cervical carcinoma and no intraepithelial lesion, and 8 novel HPV 16 variants were found. An association between E-G350, E-A176/G350, E-C188/G350, AA-a and AA-c variants and the risk of developing cervical carcinoma was shown in this study.

## **Results**

### *HPV 16 E6 variants and phylogenetic analysis*

The variant analysis for the E6 gene was carried out in 330 HPV16 samples from all study groups. Using the HPV 16 R (Los Alamos National Laboratory, <http://hvp-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/compendium/htdocs/>) as a reference sequence, a total of 27 variants were detected, 8 of them were new. Sequence analysis showed substitution in 29 nucleotides located between positions 104 and 559 in the E6 sequence with a predicted amino acid change (table 1).

The phylogenetic analysis showed that the E6 variants found belong to EUR, AA1 and Afr2a sublineages. Six of the 8 novel variants were related to variants of the EUR sublineages, and 2 to variants of the AA1 sublineage (figure 1).

The phylogenetic classification of the E6 variants showed that the majority (82.12%) belonged to the EUR sublineage, followed by AA1 (17.58%) and Afr2a (0.3%) sublineages. From sublineage EUR, 15.45% was class E-T350 which includes E-Prototype (13.03%), and 66.67% was class E-G350 finding 19 subclasses. From sublineage AA1, AA-a class was the most frequent (10.91%) followed by AA-c class (6.67%). From the 27 variants found in this study, the most common E6 variant was E-G350 (40%), followed by E-prototype (13.03%), E-C188/G350 (11.82%), AA-a (10.61%), AA-c (6.07%) and E-A176/G350 (5.15%). The 8 novel variants are subclasses, 6 are subclasses of class G-350, one is subclass of class AA-a and the last one is subclass of class AA-c. (table 1). E-C183/G350, E-C306/G350 and E-G535/G350 show polymorphisms that so far have not been reported, E-C183/G350 leads to the amino acid change I27T, E-C306/G350 changes K68T and E-G535/G350 does not lead to any amino acid change (table 1).

#### *HPV 16 E6 variants in cervical carcinoma and precursor lesions*

A total of 330 samples with HPV16 were analyzed. The histology of the 91 cervical carcinoma identified 76 (83.5%) as squamous cell carcinoma (SCC), 13 (14.3%) as adenocarcinoma (ADC) and 2 (2.2%) as other epithelial tumors. The majority of cases of cervical carcinomas were found in the FIGO stage IIB (34%). Additionally, 19 samples were HSIL, 123 LSIL and 97 with non-IL (11 with inflammation and 86 with normal Pap smears).

HPV 16 AA variants were more common in ADC (46.15%) than in SCC (30.27%). AA-a variants increased their frequency according to the degree of evolution of cervical lesion: 38.46% in ADC, 15.79% in SCC, 15.79% in HSIL, 8.94% in LSIL and 3.09% in non-IL. HPV 16 E variants were the most common in SCC (69.75%), HSIL (78.94%), LSIL (87.79%) and non-IL (89.69%). HPV 16 E-G350 class was the most frequent in all groups, E-Prototype, on the other hand, was not detected in ADC and other epithelial tumors, and only 2.63% of SCC, 5.26% of HSIL, 18.7% of LSIL and 17.53% of non-IL (table 2). The Af variants were not found in any cervical carcinoma.



Associations between the five most frequent HPV 16 E6 variants and LSIL, HSIL and cervical carcinoma were assessed (table 3), using the HPV 16 E-Prototype as a reference. The 5 variants analyzed showed significant association with CC, but only AA-a variant showed significant association with HSIL. The HPV 16 variant that showed the most risk of developing CC was AA-a (OR=69.01, CI=7.57-628.96), followed by E-A176/G350 (OR=39.82, CI=4.11-386.04), AA-c (OR=21.16, CI 2.59-172.56), E-G350 (OR=13.25, CI=2.02-87.12) and E-C188/G350 (OR=10.48, CI=1.39-78.92).

The novel HPV 16 E6 variants were found in 11 women, 6 from the center of the State of Guerrero, 2 from the coast and 3 from Northern Guerrero. These variants were found in samples taken from 1997 to 2012. The AA-a/C188 HPV 16 variant was found in non-IL cervical sample taken in 1997, AA-C/G185 variant was found in a cervical carcinoma sample taken in 1998, E-A176/G424/G350 was found in a cervical carcinoma sample taken in 2003, E-C183/G350 was found in a non-IL cervical samples taken in 2002, 2004 and 2006, E-C306/G350 was found in non-IL a cervical sample taken in 2003, E-C188/G310/G350 was found in a non-IL cervical sample taken in 2004 and an LSIL taken in 2009, E-G535/G350 was found in an LSIL cervical sample taken in 2006 and E-G189/T256/G350 variant was found in an LSIL cervical sample taken in 2008. Six novel variants were found with non-IL, 3 with LSIL and 2 with cervical carcinoma (E-A176/G350/G424 and AA-c/G185). Data from a follow up cytological diagnosis of 5 women with HPV 16 E6 novel variants were collected. Follow up information shows that two with the variant E-C183/G350 evolved from non-IL to LSIL, whereas those with E-C188/G310/G350 and E-G189/T256/G350 maintain LSIL status (table 4).

#### *Sequence Data*

The 8 novel variant sequences described in this report have been deposited in GenBank under designated accession numbers KJ465992, KJ465993, KJ465994, KJ465995, KJ465996, KJ465997, KJ465998 and KJ465999.

#### **Discussion**

The objective of this study was to document HPV 16 E6 variants circulating over a period of 16 years in women from Southern Mexico and to analyze its association with

cervical carcinoma and precursor lesions. According to sequence analysis, nucleotide polymorphisms were detected and used to investigate the intratypic heterogeneity of HPV 16 in the Southern Mexican population.

It is known that the genomes of HPV 16 variants differ geographically worldwide due to evolution linked to ethnic groups and that the risk for cervical carcinoma seems to be population-dependent [5, 6, 8, 10, 26-28]. Mexico is a country with diverse ethnic origins because European immigrants mixed with various indigenous populations, in consequence current population carries HPV variant from various ethnic group [8]. In the present study of 330 women with HPV 16 sampled over a period of 16 years, 27 variants were found; E variants were the most common, followed by AA variants. Studies worldwide have found that E variants are the most prevalent worldwide (94% in Oceania, 84% in Eastern Asia, 83% in North America, 82% in Europe, 78% in Western Asia and 71% in Central and South America) with exception of Africa (36%) [9]. Tornesello, et al. (2011) showed that globally, the most prevalent variant in Central and South America (including Mexico) is E-G350 (43%) followed by AA (30%) and E-Prototype (27%). In North America it is E-Prototype and E-G350 (49% each one) followed by AA (11%). In Europe it is E-G350 (44%) followed by E-Prototype (38%) and AA (6%). In Western Asia it is E-G350 (51%) followed by E-Prototype (25%) and AA (9%). In Eastern Asia it is As (42%) followed by E-Prototype (37%) and E-G350 (9%). In Oceania it is E-Prototype (38%) followed by E-G350 (29%) and As (12%) and in Africa it is Afr1 and Afr2 (62%) followed by E-Prototype (34%). In the present study, the most frequently identified HPV 16 variant was E-G350 (40%), following the E-Prototype (13.03%), E-C188/G350 (11.82%), AA-a (10.61%), AA-c (6.07%) and E-A176/G350 (5.15%). However, unlike other regions, it was found that E-Prototype frequency in Southern Mexico is lower than the rest of the world, while E-G350, considering all its subclasses together, is more frequent than in the rest of the world. The AA variants of HPV 16 were 15-fold more prevalent than E-prototype in cervical carcinoma.

Studies on HPV 16 variants in Mexico have shown that even in the same country its distribution is different depending on the region analyzed. The prevalence of HPV 16 variants, stratified by histological groups, from five geographical regions of Mexico (Central, North-Central, Northeastern, Southeastern and Southern) is presented in table 5. The E variants are the most prevalent in all geographical regions in women, E-prototype in the Southeastern

region and E-G350 in Central and Southern Mexico. AA variants are present in the five regions, but its prevalence is higher in the Northeastern region than in the rest of the country, although it is inhabited mostly by Europeans descendants, Mestizo and very few indigenous ethnic groups [5, 8, 20, 21, 23, 29]. The State of Guerrero, located in Southern Mexico, is inhabited by Mestizo, Nahuas, Mixtecs, Amuzgos, Tlapanecos and Afro-Mexicans. In this study, which is larger than our previous study [24], we found that HPV 16 E-G350 was the most common variant in all histological grades, although in ADC, the prevalence of E-G350 and AA is close. In all regions of Mexico, the prevalence of AA in ADC tends to increase in comparison to the other histological grades. Moreover, among AA variants, AA-a is more common than AA-c.

Of the 27 HPV 16 variants found in Southern Mexico in 16 years, 8 of them were new and may be considered to be variants specific to this Mexican region.

Previous data suggests that HPV 16 variants with E6 sequence variation are biologically distinct and may confer different pathological risks for development of squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma. E6 specific sequence variations may modify its linkage to cellular targets changing its ability for p53 degradation, inhibiting keratinocyte differentiation, modifying signal transduction [30-34].

It was proposed that there might be a strong relation between AA variant and cervical carcinoma development [9, 16, 25, 35, 36]. Using a comparative analysis, it was found in this study that HPV 16 AA-a detection rate increased according to the severity of the cervical lesion, with a large increase in ADC. The results show that HPV 16 AA-a infection has a strong association with a high risk of CC development compared to E-Prototype. This study reinforces the proposal that HPV 16 AA-a is an oncogenic risk for cervical carcinoma progression in Mexico [5]. Similar behavior was observed in HPV 16 E-A176/G350 variant, the rate increased according severity of the cervical lesion, although frequency was less than for AA-a, and the infection is associated with a risk for development of CC compared with E-Prototype, but less than for AA-a. AA-c, E-G350 and E-C188/G350, also show association with risk for CC compared with E-Prototype, although lower than the aforementioned. The results of this study highlight the importance of identifying HPV 16 variants in the screening of clinical samples and of conducting follow up test for women with the HPV 16 AA-a variant.

According to the HPV variants found in this study, the amino acid substitutions circulating in Southern Mexico are: Q3E, R10G, Q14H, D25N, I27L, I27R I27T, L28V, E29K, E29Q, E29G, I52L, K68T, F69L, H78Y, L83V (the most frequent) and E113D. The amino acid substitutions present in the HPV 16 E6 variants in descending order of association with CC were: Q14R/H78Y/L83V (AA-a variant), D25N/L83V (E-A176/G350 variant), Q14R/I27/H78Y/L83V (AA-c variant), L83V (E-G350 variant) and E29Q/L83V (E-C188/G350 variant). Q14R/H78Y/L83V amino acid changes gender AA variants with increased oncogenic potential and more efficient evasion of the host's immune surveillance [25, 37, 38]. L83V amino acid change display more efficient degradation of Bax and binding to E6AP, induces ubiquitination and degradation of p53, NFX1-91 and PDZ proteins [14, 33]. D25N, I27R and E29Q amino acid changes affect E6 T cell epitope [33]. Two of the 8 novel variants found in this study had amino acid changes not previously reported: I27T in E-C183/G350 variant and K68T in E-C306/G350 variant. I27T amino acid change is located at the N-terminal domain of the E6 oncoprotein; K68T is located between zinc fingers of E6. The E-C183/G350 variant was found in women with non-IL who progressed to LSIL. The finding of this new variant could be potentially important.

It was not possible to analyze the association of novel E6 variants for the risk of developing cervical carcinoma because of the low number of positive samples; however, by having nucleotide changes may also be associated with the development of cervical carcinoma.

## **Conclusions**

Current findings show that in 16 years, at least 27 HPV 16 E6 variants were present in Southern Mexico and 8 novel variants were found, which may be considered to be variants specific to this Mexican region. The variants more frequently found in women with cervical carcinoma are E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350 and E-A176/G350. All of them are associated with the development of cervical carcinoma, however, AA-a showed the highest association. This study reinforces the proposal that HPV 16 AA-a is an oncogenic risk for cervical carcinoma progression in Mexico. This represents the largest study carried out in Mexico analyzing all classes of European and non-European variants in the whole spectrum of disease, from intraepithelial lesion-free cytology to cervical carcinoma including squamous

cell carcinoma and adenocarcinoma. Further studies are needed to clarify the pathogenicity of HPV 16 E6 variants.

## **Methods**

### *Samples*

The database and biobank, with 7,480 cervical DNA samples collected from 1997 to 2012, of the Molecular Biomedicine and Cytopathology Laboratories at the School of Chemistry and Biology of the Autonomous University of Guerrero in Chilpancingo Guerrero, Mexico, was searched for all cervical DNA samples with HPV 16 and 330 were found in appropriate conditions for analysis. The samples were studied to investigate circulating HPV 16 variants in Southern Mexico and to do a comparative analysis between these variants and the different grades of cervical lesion.

Cervical samples came from women who were residents of State of Guerrero, seeking cytological screening or for other gynecological complaints, which attended public health centers of Acapulco, Chilpancingo, and Iguala, the three biggest cities in this state of Southern Mexico. Based on the diagnosis, samples were divided into: (1) no intraepithelial lesion (non-IL) (n=97), (2) low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) (n=123), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) (n=19) and (4) cervical carcinoma (CC) (n=91). Non-IL and LSIL samples have cytological diagnosis; HSIL and CC samples have histological diagnosis. Cytological diagnosis was done according to the Bethesda System [39] and histological diagnosis according to the classification system of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) [40].

This study was approved by the Bioethical Committee the Autonomous University of Guerrero. Informed consent was obtained from women participants.

HPV DNA was detected and identified by three methods depending on the year of in which the sample was taken and analyzed: (1) from 1997 to 2010, HPV detection was done by the MY09/11 system and typing by restriction fragment length polymorphism (RFLPs); (2) from 2005 to 2010, detection was done by general GP5+/6+ PCR system and typing by sequencing analysis [24] when samples analyzed with MY09/11 PCR were negative; (3) from 2010 to 2012 HPV was detected and typed with INNO Lipa genotyping Extra (Innogenetics) [41].

### *HPV variants*

The HPV 16 E6 gene was amplified using type-specific primers E6-F048 (5'GAACCGAAACCGGTTAGTAT3') and E6-R622 (5'CAGTTGTCTCTGGTTGCAAA3') that amplify a 575-bp region [19]. PCR amplification was carried out in a 50µl reaction containing 1µM of each primer, 4 mM of MgCl<sub>2</sub>, and 1.25 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). The DNA amplification was done in a DNA Eppendorf AG 22331 Hamburg [24] as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 45 s, 57°C for 30 s, 72°C for 1.15 min, and a final extension at 72°C for 10 min.

PCR products were purified with 75% isopropanol (2-34 protocol of user manual of Applied Biosystems) and ZR DNA Sequencing Clean-up Kit<sup>TM</sup> (ZYMO RESEARCH). These were sequenced using Big Dye Terminator Chemistry v3.1 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an automated sequencer DNA ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using primers previously described [19]. Sequences were analyzed with EMBOSS Stretcher of the European Institute of Bioinformatics, LALIGN GENESTREAM network server ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_stretcher/nucleotide.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/nucleotide.html) and [http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)) and the Finch TV program respectively. Sequences were aligned with reference sequence (HPV 16R) [8]. Using the E6 sequence, HPV 16 variants were classified into lineages with their respective sublineages [12]. The sublineages were stratified in classes and subclasses [13]. When new polymorphisms were found, independent PCRs were carried out under the described conditions. The products obtained were sequenced on both strands to exclude PCR artifacts and to validate the polymorphism found and accept them as new variants.

### *Phylogenetic analysis*

HPV 16 E6 sequences were compared by multiple sequence alignments using the CLUSTAL W method [42]. A phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining analysis executed by MEGA 5.2 program [43].

### *Statistical analysis*

The Chi squared test was used to compare HPV 16 variant frequencies and cervical lesion grade. Differences were considered to be statistically significant when p values were less than 0.05. Age-adjusted odds ratios and 95% confidence intervals were used to estimate associations. Data analysis and statistics were done using IBM SPSS Statistics V.22.0 and STATA V.11 softwares.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Author's contributions**

BIA and MALV designed and supervised research. JOO identified HPV 16, analyzed HPV 16 E6 variants, and did sequence alignment and statistical analysis. JOO, ICM did phylogenetic analysis. LCAR, MAJL and VHGB collected the samples and did cytological and histological diagnosis. JOO and BIA drafted the manuscript, HABS revised the manuscript and all authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

We thank José Guadalupe Muñoz Camacho and all of the Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltán Ortega” who helped with this study at the clinic sites. We thank Miguel Angel Rodríguez Barrera for his help in the registration of new variants in GenBank. We thank Dinorah N. Martínez-Carrillo for contributing in statistical analysis. We also thank Juan Francisco Leyva and Travis Ashworth for reviewing the English style of the article. This study was supported by grant from CONACYT, México.

### **References**

1. Zur Hausen H: **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**: 342–350.
2. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, Clifford GM: **Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer.** *Int J Cancer* 2012, **131**:2349–2359.

3. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S: **Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(3): 886–891.
4. Gheit T, Cornet I, Clifford GM, Iftner T, Munk C, Tommasino M, Kjaer SK: **Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011, **20**: 1315–1321.
5. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmerón J, Galván SC, Estrada RA, Yunes E, García-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A: **Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**(17): 1325-1330.
6. Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, Dunn ST, Wang SS, Schiffman M, Blakey GI, Teel T: **Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population.** *Int J Cancer* 2009, **125**: 2609-2613.
7. Schiffman M, Rodríguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, Desalle R, Befano B, Yu K, Safaeian M, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Solomon D, Castle PE, Burk RD: **A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia.** *Cancer Res* 2010, **70**(8): 3159-3169.
8. Calleja-Macías IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA: **Genomic diversity of human papillomavirus- 16, 18, 31 and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants.** *Virol* 2004, **319**: 315-323.
9. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, Buonaguro L, Buonaguro FM: **Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix.** *Gynecol Oncol* 2011, **121**(1): 32-42.
10. Cornet I, Gheit T, Lannacone MR, Vignat J, Sylla BS, Del Mistro A, Franceschi S, Tommasino M, Clifford GM, IARC HPV Variant Study Group: **HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide.** *Br J Cancer* 2013, **108**: 240-244.
11. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, De Salle R, Anastos k, Segondy M, Sahasrabuddhe VV, Gravitt PE, Hsing AW, Burk RD: **Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67.** *Plos One* 2011, **6**(5): e20183.
12. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, Tommasino M, Clifford GM, IARC HPV Variant Study Group: **Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR.** *J Virol* 2012, **86** (12): 6855-6861.
13. Huertas-Salgado A, Martín-Gámez DC, Moreno P, Murillo R, Bravo MM, Villa L, Molano M: **E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature.** *Virol* 2011, **410**(1): 201-215.



14. Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, Tommasino M, Zehbe I, Sherman L: **HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6.** *Virology* 2006, **350**: 216–227.
15. Zehbe I, Richard C, Decarlo CA, Shai A, Lambert PF, Lichtig H, Tommasino M, Sherman L: **Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of humankeratinocyte differentiation and apoptosis.** *Virology* 2009, **383**: 69-77.
16. Zehbe, I., Lichtig, H., Westerback, A., Lambert, PF., Tommasino, M., and Sherman, L. (2011). **Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential.** *Mol Cancer* 2011, **10** (77): 1-13.
17. Smith B, Chen Z, Reimers L, Doorslaer K, Schiffman M, DeSalle R, Herrero R, Yu K, Wacholder S, Wang T, Burk RD: **Sequence Imputation of HPV16 Genomes for Genetic Association Studies.** *PLoS ONE* 2011, **6**(6): e21375.
18. Jang M, Rhee JE, Jang DH, Kim SS: **Gene Expression Profiles are Altered in Human Papillomavirus-16 E6 D25E-Expressing Cell Lines.** *Virology* 2011, **8**(453): 1-6.
19. Casas L, Galván SC, Ordoñez RM, López N, Guido M, Berumen J: **Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas.** *Int J Cancer* 1999, **83**(4): 449–455.
20. Lizano M, Berumen J, García-Carranca A: **HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants.** *Arch Med Res* 2009, **40**(6): 428-434.
21. López-Revilla R, Pineda MA, Ortíz-Valdez J, Sánchez-Garza M, Riego L: **Human papillomavirus type 16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosi City, Mexico.** *Infectious Agents and Cancer* 2009, **4**(3): <http://www.infectagentscancer.com/content/4/1/3>.
22. Bradley CJ, Given CW, Roberts C: **Health Care Disparities and Cervical Cancer.** *Am J Public Health* 2004, **94**(12):2098-103.
23. Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. Mexico, 2006. Available from URL: <http://sinais.salud.gob.mx/>. Accessed March 27, 2009.
24. Illades-Aguilar B, Alarcón-Romero LC, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, Fernández-Tilapa G, Vences-Velázquez A, Muñoz-Valle JF, Leyva-Vázquez MA: **Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico.** *Gynecol Oncol* 2010, **117**(2): 291-296.
25. Richard C, Lanner C, Naryzhny SN, Sherman L, Lee H, Lambert PF, Zehbe: **The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer.** *Oncogene* 2010, **29** (23): 3435-3445.
26. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer C, Muñoz N, Bosh FX, Wheeler M: **Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective.** *J Virol* 1997, **71**(3): 2463-2472.
27. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL: **Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplásica.** *J Gen Virol* 2000, **81**: 2959–2968.

28. Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, Stellato G, Greggi S, Piccoli R, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Franceschi S, Buonaguro FM: **Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer.** *J Med Virol* 2004, **74**(1): 117-126.
29. González-Losa MDR, Laviada Mier y Teran MA, Puerto-Solís M, García-Carrancá A: **Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer.** *J Clin Virol* 2004, **29**: 95–98.
30. Zehbe I<sup>1</sup>, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M: **p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development.** *Cancer Res* 2001, **61**(2): 608-611.
31. Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, Ho J, Kiviat NB: **Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16**: 4-10.
32. Chopjitt P, Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, Charoensri N: **Prevalence of human papillomavirus type 16 and its variants in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand.** *Int J Infect Dis* 2009, **13**(2): 212-9.
33. Pillai MR<sup>1</sup>, Hariharan R, Babu JM, Lakshmi S, Chiplunkar SV, Patkar M, Tongaonkar H, Dinshaw K, Jayshree RS, Reddy BK, Siddiqui M, Roychoudury S, Saha B, Abraham P, Gnanamony M, Peedicayil A, Subhashini J, Ram TS, Dey B, Sharma C, Jain SK, Singh N. **Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population.** *Int J Cancer* 2009, **125**(1): 91-103.
34. Wise-Draper TM, Wells SL: **Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets.** *Front Biosci* 2008, **13**: 1003-1017.
35. Junes-Gill K, Sichero L, Maciag PC, Mello W, Noronha V, Villa LL: **Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil.** *J Med Virol* 2008, **80**: 1639–1645.
36. Quint KD<sup>1</sup>, de Koning MN, van Doorn LJ, Quint WG, Pirog EC. **HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix.** *Gynecol Oncol* 2010, **117**(2): 297-301.
37. Zehbe I, Mytilineos J, Wikström I, Henriksen R, Edler L, Tommasino M: **Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of swedish women.** *Hum Immunol.* 2003, **64**(5):538-42.
38. Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL: **Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants.** *Virology* 2012, **432**: 127–132.
39. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur, Wright T Jr, Young N: **The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology.** *JAMA* 2002, **287**:2114–9.

40. Benedet JL, Bender H, Jones H3rd, Ngan HY, Pecorelli S: **FIGO staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology.** Int J Gynecol Obstet 2000, **70**:209–62.
41. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, Lindeman J, ter Harmsel B, Burger M, Quint W: **Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus.** J Clin Microbiol 1999, **37**(8): 2508-17.
42. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: (1997). **The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Res 1997, **25**(24): 4876–4882.
43. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** Mol Biol Evol 2011, **28**(10): 2731-2739.

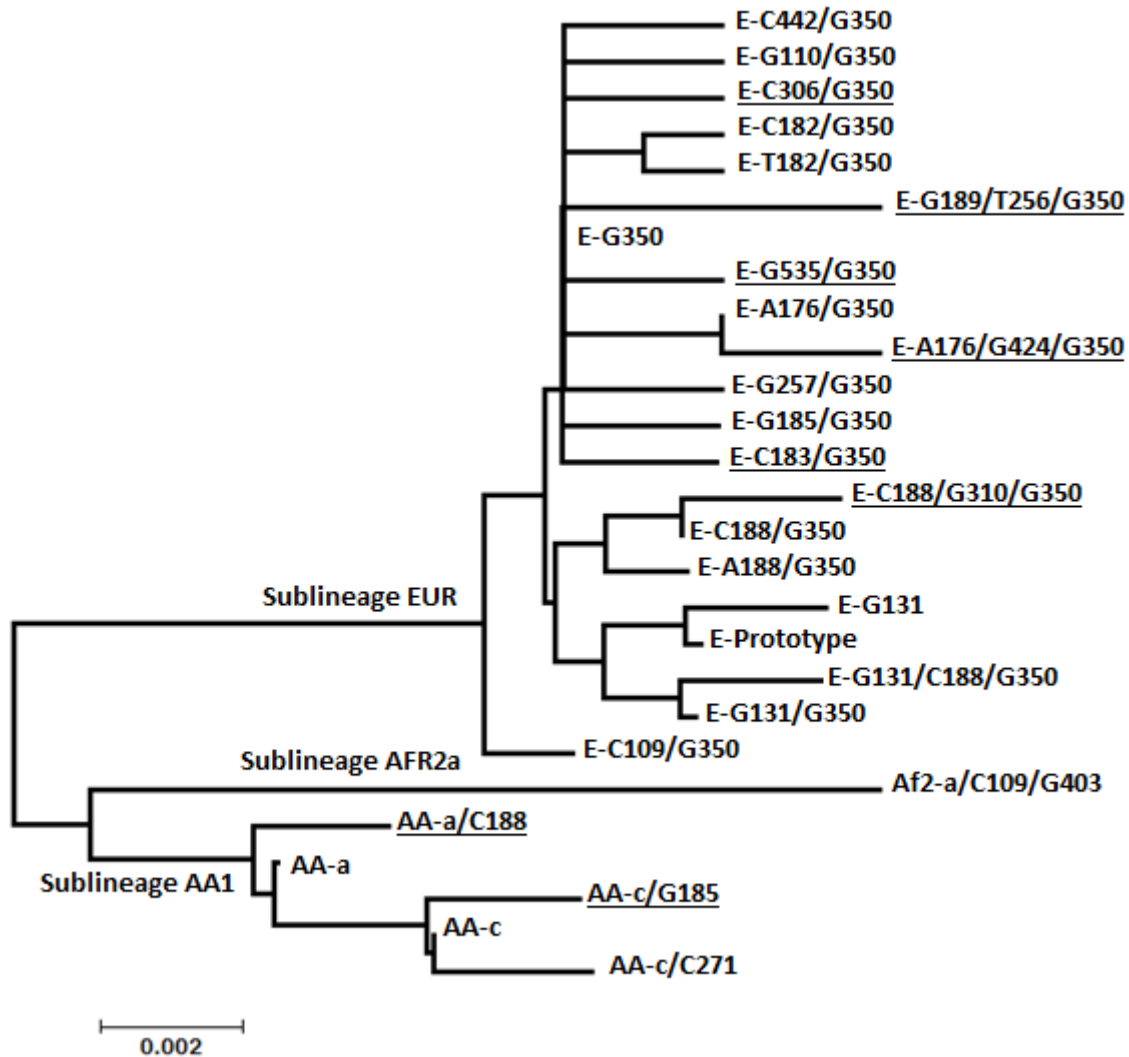


Figure 1. **Phylogenetic tree based in E6 variations of HPV 16.** To classify the newly identified variants, their phylogenetic relationship with previously reported variants were determined, by constructing a phylogenetic tree based on E6 sequences found in Southern Mexico, the new variants are underlined. The tree is drawn to scale with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 27 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 456 positions in the final dataset. Analyses were conducted in MEGA5.2 [43].

Table 1. Phylogenetic classification, nucleotide sequence variations and frequency of HPV-16 E6 variants identified in women from Southern Mexico.

Variants	HPV 16 E6 nucleotide position																				Predicted amino acid change E6 protein (151 aa form)	Frequency							
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3		4	4	4	5	5	N=330	%	
HPV 16R	T	C	A	G	C	G	G	A	T	T	G	A	C	A	T	T	A	A	C	C	T	A	A	A	A	A			
<b>Lineage EAS / Sublineage EUR</b>																													
<b>Class E-T350</b>																													
E-Prototype	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	No change	51	15.45%
E-G131	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R10G	8	2.42%
<b>Class E-G350</b>																													
E-G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	L83V	132	40.00%
E-C109/G350	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	L83V	6	1.82%
E-G110/G350	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	Q3E/L83V	2	0.61%
E-G131/G350	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	R10G/ L83V	2	0.61%
E-G131/C188/G350	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	R10G/E29Q/L83V	2	0.61%
E-A176/G350	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	D25N/L83V	17	5.15%
**E-A176/G424/G350	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	g	-	-	D25N/L83V	1	0.30%
E-T182/G350	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	I27L/L83V	4	1.21%
E-C182/G350	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	I27L/L83V	2	0.61%
**E-C183/G350	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	I27T/L83V	3	0.91%
E-G185/G350	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	L28V/L83V	2	0.61%
E-A188/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	E29K/ L83V	1	0.30%
E-C188/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	E29Q/L83V	39	11.82%
**E-C188/G310/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	E29Q/F69L/L83V	2	0.61%
**E-G189/T256/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	E29G/L83V	1	0.30%
E-G257/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	I52L/L83V	1	0.30%
**E-C306/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	K68T/L83V	1	0.30%
E-C442/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	C	-	L83V/E113D	1	0.30%
**G535/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	g	L83V	1	0.30%
<b>Lineage AA/NA / Sublineage AA1</b>																													
<b>Class AA-a</b>																													
AA-a	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	g	-	-	T	G	-	-	-	G	-	Q14H/H78Y/L83V	35	10.61%
**AA-a/C188	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	C	-	-	-	-	a	g	-	-	T	G	-	-	-	G	-	Q14H/E29Q/H78Y/L83V	1	0.30%
<b>Class AA-c</b>																													
AA-c	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	-	-	-	-	-	a	g	-	-	T	G	-	-	-	G	-	Q14H/I27R/H78Y /L83V	20	6.07%
**AA-c/G185	-	-	-	-	-	T	-	-	G	G	-	-	-	-	-	a	a	-	-	T	G	-	-	-	G	-	Q14H/I27R/L28V/H78Y /L83V	1	0.30%
AA-c/C271	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	-	-	-	-	-	c	a	g	-	-	T	G	-	-	G	-	Q14H/I27R/H78Y /L83V	1	0.30%
<b>Lineage AFR2 / Sublineage Afr2a</b>																													
<b>Class Af2-a</b>																													
Af2-a/C109/G403	c	-	-	T	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	g	-	-	T	-	g	-	-	-	-	R10I/Q14D/H78Y	1	0.30%

HPV 16 R: reference sequence. Predicted amino acid change: the amino acid numeration was done using the 151 amino acid E6 oncoprotein form as reference. Capital letters indicate polymorphisms that produce amino acid change. Lower-case letters indicate silent mutations. – Indicate no polymorphism. Underlined letters indicate new polymorphisms. Underlined capital letters indicate amino acid change. \*\*Indicate new variants.

Table 2. Distribution of HPV 16 E6 variants for diagnostic category.

Variant	Non-IL N=97	LSIL N=123	HSIL N=19	SCC N=76	ADC N=13	Other Epithelial Tumor N=2	Cervical carcinoma N=91	Total N=330
<b>E variants</b>	<b>87 (89.69%)</b>	<b>108 (87.79%)</b>	<b>15 (78.94%)</b>	<b>53 (69.75%)</b>	<b>7 (53.84%)</b>	<b>1 (50.0%)</b>	<b>61 (67.05%)</b>	<b>271 (82.12%)</b>
<b>Class E-T350</b>	<b>23 (23.72%)</b>	<b>23 (18.7%)</b>	<b>1 (5.26%)</b>	<b>4 (5.26%)</b>	-	-	<b>4 (4.4%)</b>	<b>51 (15.45%)</b>
E-Prototype	17 (17.53%)	23 (18.7%)	1 (5.26%)	2 (2.63%)	-	-	2 (2.2%)	43 (13.03%)
E-G131	6 (6.19%)	-	-	2 (2.63%)	-	-	2 (2.2%)	8 (2.42%)
<b>Class E-G350</b>	<b>64 (65.97%)</b>	<b>85 (69.09%)</b>	<b>14 (73.68%)</b>	<b>49 (64.49%)</b>	<b>7 (53.84%)</b>	<b>1 (50.0%)</b>	<b>57 (62.65%)</b>	<b>220 (66.67%)</b>
E-G350	39 (40.21%)	56 (45.53%)	6 (31.58%)	28 (36.84%)	3 (23.08%)	-	31 (34.07%)	132 (40.00%)
E-C109/G350	-	3 (2.44%)	1 (5.26%)	2 (2.63%)	-	-	2 (2.2%)	6 (1.82%)
E-G110/G350	1 (1.03%)	1 (0.81%)	-	-	-	-	-	2 (0.61%)
E-G131/G350	1 (1.03%)	-	-	1 (1.32%)	-	-	1 (1.1%)	2 (0.61%)
E-G131/C188/G350	1 (1.03%)	1 (0.81%)	-	-	-	-	-	2 (0.61%)
E-A176/G350	3 (3.09%)	5 (4.07%)	1 (5.26%)	5 (6.58%)	2 (15.38%)	1 (50.0%)	8 (8.79%)	17 (5.15%)
**E-A176/G424/G350	-	-	-	1 (1.32%)	-	-	1 (1.1%)	1 (0.30%)
E-T182/G350	-	1 (0.81%)	1 (5.26%)	2 (2.63%)	-	-	2 (2.2%)	4 (1.21%)
E-C182/G350	1 (1.03%)	1 (0.81%)	-	-	-	-	-	2 (0.61%)
**E-C183/G350	3 (3.09%)	-	-	-	-	-	-	3 (0.91%)
E-G185/G350	1 (1.03%)	-	-	1 (1.32%)	-	-	1 (1.1%)	2 (0.61%)
E-A188/G350	-	-	-	1 (1.32%)	-	-	1 (1.1%)	1 (0.30%)
E-C188/G350	11 (11.34%)	13 (10.57%)	5 (26.32%)	8 (10.53%)	2 (15.38%)	-	10 (10.99%)	39 (11.82%)
**E-C188/G310/G350	1 (1.03%)	1 (0.81%)	-	-	-	-	-	2 (0.61%)
**E-G189/T256/G350	-	1 (0.81%)	-	-	-	-	-	1 (0.30%)
E-G257/G350	-	1 (0.81%)	-	-	-	-	-	1 (0.30%)
**E-C306/G350	1 (1.03%)	-	-	-	-	-	-	1 (0.30%)
E-C442/G350	1 (1.03%)	-	-	-	-	-	-	1 (0.30%)
**G535/G350	-	1 (0.81%)	-	-	-	-	-	1 (0.30%)
<b>AA variants</b>	<b>10 (10.31%)</b>	<b>14 (11.38%)</b>	<b>4 (21.05%)</b>	<b>23 (30.27%)</b>	<b>6 (46.15%)</b>	<b>1 (50.0%)</b>	<b>30 (32.97%)</b>	<b>58 (17.58%)</b>
<b>Class AA-a</b>	<b>4 (4.12%)</b>	<b>11 (8.94%)</b>	<b>3 (15.79%)</b>	<b>12 (15.79%)</b>	<b>5 (38.46%)</b>	<b>1 (50.0%)</b>	<b>18 (19.78%)</b>	<b>36 (10.91%)</b>
AA-a	3 (3.09%)	11 (8.94%)	3 (15.79%)	12 (15.79%)	5 (38.46%)	1 (50.0%)	18 (19.78%)	35 (10.61%)
**AA-a/C188	1 (1.03%)	-	-	-	-	-	-	1 (0.30%)
<b>Class AA-c</b>	<b>6 (6.19%)</b>	<b>3 (2.44%)</b>	<b>1 (5.26%)</b>	<b>11 (14.48%)</b>	<b>1 (7.69%)</b>	-	<b>12 (13.19%)</b>	<b>22 (6.67%)</b>
AA-c	6 (6.19%)	3 (2.44%)	1 (5.26%)	9 (11.84%)	1 (7.69%)	-	10 (10.99%)	20 (6.07%)
**AA-c/G185	-	-	-	1 (1.32%)	-	-	1 (1.1%)	1 (0.30%)
AA-c/C271	-	-	-	1 (1.32%)	-	-	1 (1.1%)	1 (0.30%)
<b>Af variants</b>	-	<b>1 (0.81%)</b>	-	-	-	-	-	<b>1 (0.30%)</b>
<b>Class Af2-a</b>	-	<b>1 (0.81%)</b>	-	-	-	-	-	<b>1 (0.30%)</b>
Af2-a/C109/G403	-	1 (0.81%)	-	-	-	-	-	1 (0.30%)

-, Indicate that the variant was not found.

Table 3. The most common HPV 16 E6 variants in women from Southern Mexico and risk of cervical carcinoma.

Variants	Non-IL N (%)	LSIL N (%)	OR (CI 95%) P	HSIL N (%)	OR (CI 95%) P	SCC N (%)	OR (CI 95%) p	ADC N (%)	OR (CI 95%) P	Other Epithelial Tumor N (%)	Cervical carcinoma N (%)	OR (CI 95%) P
Class E-T350 <sup>a</sup>	23 (23.71%)	23 (18.7%)	-	1 (5.26%)	-	4 (5.26%)	-	0 (0%) <sup>b</sup>	-	0 (0.0%)	4 (4.40%)	-
E-Prototype	17 (17.53%)	23 (18.7%)	1*	1 (5.26%)	1*	2 (2.63%)	1*	0 (0%) <sup>b</sup>	1*	-	2 (2.2%)	1*
<b>Class E-G350</b>	<b>64 (65.98%)</b>	<b>85 (69.11%)</b>	<b>0.97</b> <b>0.47-1.99</b> <b>0.94</b>	<b>14 (73.68%)</b>	<b>3.73</b> <b>0.46-30.44</b> <b>0.22</b>	<b>49 (64.47%)</b>	<b>12.66</b> <b>1.89-84.92</b> <b>0.009</b>	<b>7 (53.85%)</b>	<b>2.42</b> <b>0.25-∞</b> <b>0.44</b>	<b>1 (50.0%)</b>	<b>57 (62.65%)</b>	<b>2.19-90.97</b> <b>0.005</b>
E-G350	39 (40.21%)	56 (45.53%)	1.01 0.47-2.17 0.98	6 (31.58%)	2.58 0.29-23.17 0.39	28 (36.84%)	12.56 1.84-85.86 0.010	3 (23.08%)	1.74 0.15-∞ 0.65	-	31 (34.07%)	13.25 2.02-87.12 0.007
E-A176/G350	3 (3.09%)	5 (4.07%)	1.49 0.31-7.23 0.62	1 (5.26%)	5.82 0.28-121.37 0.26	5 (6.58%)	24.79 2.33-263.35 0.008	2 (15.38%)	12.62 0.79-∞ 0.07	1 (50.0%)	8 (8.79%)	39.82 4.11-386.04 0.001
E-C188/G350	11 (11.34%)	13 (10.57%)	1.0 0.35-2.84 0.99	5 (26.32%)	7.91 0.81-77.58 0.08	8 (10.53%)	8.56 1.07-68.26 0.043	2 (15.38%)	3.05 0.23-∞ 0.40	-	10 (10.99%)	10.48 1.39-78.92 0.023
<b>Class AA-a</b>	<b>4 (4.12%)</b>	<b>11 (8.94%)</b>	<b>2.18</b> <b>0.58-8.17</b> <b>0.25</b>	<b>3 (15.79%)</b>	<b>12.65</b> <b>1.02-156.20</b> <b>0.048</b>	<b>12 (15.79%)</b>	<b>35.21</b> <b>3.87-320.39</b> <b>0.002</b>	<b>5 (38.46%)</b>	<b>21.24</b> <b>1.75-∞</b> <b>0.016</b>	<b>1 (50.0%)</b>	<b>18 (19.78%)</b>	<b>6.36-467.62</b> <b>0.000</b>
AA-a	3 (3.09%)	11 (8.94%)	3.08 0.73-13.04 0.13	3 (15.79%)	17.40 1.32-229.60 0.03	12 (15.79%)	43.73 4.55-420.56 0.001	5 (38.46%)	26.69 2.10-∞ 0.01	1 (50.0%)	18 (19.78%)	69.01 7.57-628.96 0.000
<b>Class AA-c</b>	<b>6 (6.19%)</b>	<b>3 (2.44%)</b>	<b>0.44</b> <b>0.10-2.06</b> <b>0.30</b>	<b>1 (5.26%)</b>	<b>2.79</b> <b>0.15-52.20</b> <b>0.49</b>	<b>11 (14.47%)</b>	<b>24.46</b> <b>2.89-207.12</b> <b>0.003</b>	<b>1 (7.69%)</b>	<b>3.01</b> <b>0.15-∞</b> <b>0.47</b>	-	<b>12 (13.19%)</b>	<b>25.28</b> <b>3.12-204.74</b> <b>0.002</b>
AA-c	6 (6.19%)	3 (2.44%)	0.46 0.10-2.15 0.32	1 (5.26%)	2.93 0.16-54.90 0.47	9 (11.84%)	19.97 2.34-170.25 0.006	1 (7.69%)	2.99 0.15-∞ 0.47	-	10 (10.99%)	21.16 2.59-172.56 0.004
<b>Class Af2-a</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>1 (0.81%)</b>	-	<b>0 (0%)</b>	-	<b>0 (0%)</b>	-	<b>0 (0%)</b>	-	<b>0 (0%)</b>	<b>0 (0%)</b>	-

\*, Indicate reference category (E-Prototype).

<sup>a</sup>, OR was not calculated for E-T350 class because it includes reference category (E-Prototype).

<sup>b</sup>, To calculate OR and CI in ADC an artificial case was created.

OR: Odds ratio adjusted for age.

Table 4. Novel HPV16 E6 variants, regional distribution, collection year and lesion in cervical epithelium.

Patient	HPV 16 E6 novel variant	Accession number GenBank	Nucleotide change	Amino acid change (not previously reported)	Women residence (City/State region)	Diagnosis/ Sampling year	Follow up Diagnosis/ Year
1	E-A176/G424/G350	KJ465994	G424	-	Atoyac/ Coast	Cervical carcinoma 2003	-
2	E-C183/G350	KJ465995	C183	I27T	Chilpancingo/ Center	Non-IL 2002	LSIL 2006
3	E-C183/G350	KJ465995	C183	I27T	Chilpancingo/ Center	Non-IL 2006	LSIL 2009
4	E-C183/G350	KJ465995	C183	I27T	Chilpancingo/ Center	Non-IL 2002	-
5	E-C188/G310/G350	KJ465996	G310	-	Chilpancingo/ Center	Non-IL 2004	Non-IL 2005
6	E-C188/G310/G350	KJ465996	G310	-	Chilpancingo/ Center	LSIL 2009	LSIL 2012
7	E-G189/T256/G350	KJ465998	G189 and T256	-	Chilpancingo/ Center	LSIL 2008	LSIL 2009
8	E-C306/G350	KJ465997	C306	K68T	Acapulco Coast	Non-IL 2003	-
9	E-G535/G350	KJ465999	G535	-	Tepecoacuilco/ North	LSIL 2006	-
10	AA-a/C188	KJ465992	C188	-	Iguala/ North	Non-IL 1997	-
11	AA-c/G185	KJ465993	G185	-	Juchitan/ North	Cervical carcinoma 1998	-



Table 5. Published data on HPV 16 variants distribution in cervical epithelium lesions in regions of Mexico.

Region of Mexico	State/City	Genome region	Samples	Histology	HPV 16 E	HPV 16 E-Prototype	HPV 16 E-G350	AA	AAa	AAc	Reference
Central	Mexico City	E6, L1	80	SCC	56%	4%	52%	44%	-	-	Berumen, <i>et al.</i> , 2001
			6	ADC	0%	0%	0%	100%	-	-	
			20	Non-IL	90%	5%	85%	10%	-	-	
Central	Mexico City	E6	50	SCC	30%	-	-	40%	32%	8%	Lizano, <i>et al.</i> , 2006
			11	ADC	55%	-	-	45%	27%	18%	
			23	HSIL	74%	-	-	26%	26%	0%	
			13	LSIL	54%	-	-	46%	46%	0%	
			16	Non-IL	56%	-	-	44%	44%	0%	
North-Central	San Luis Potosí	E6	2	ICC	100%	50%	50%	0%	0%	0%	López-Revilla, <i>et al.</i> , 2009
			9	HSIL	89%	33%	56%	11%	11%	0%	
			27	LSIL	96%	85%	11%	4%	4%	0%	
Northeastern	Nuevo León	LCR	112	Undefined	13%	-	-	87%	-	-	Calleja-Macias, <i>et al.</i> , 2004
Southeastern	Yucatan	E6	25	IIC	52%	28%	24%	44%	-	-	González-Losa, <i>et al.</i> 2004
			15	LSIL	100%	66%	33%	0%	0%	0%	
Southern	Guerrero	E6	45	ICC	67%	-	-	33%	-	-	Illades-Aguiar, <i>et al.</i> , 2010
			10	HSIL	90%	-	-	10%	-	-	
			18	LSIL	67%	-	-	33%	-	-	
			5	Non-IL	60%	-	-	40%	-	-	
Southern	Guerrero	E6	76	SCC	70%	3%	64%	30%	16%	14%	Present study
			13	ADC	54%	-	54%	46%	38%	8%	
			19	HSIL	79%	5%	74%	21%	16%	5%	
			123	LSIL	88%	19%	69%	11%	9%	2%	
			97	Non-IL	90%	18%	66%	10%	4%	6%	

## **Capítulo II**

**Asociación del estado físico y la carga viral con las variantes E6 del VPH 16, lesiones precursoras y cáncer cervical en mujeres del sur de México.**

## **Asociación del estado físico y la carga viral con las variantes E6 del VPH 16, lesiones precursoras y cáncer cérvicouterino en mujeres del sur de México.**

Julio Ortiz-Ortiz<sup>1</sup>, Miguel Ángel Mendoza-Catalán<sup>1</sup>, Oscar delMoral-Hernández<sup>1</sup>, Luz del Carmen Alarcón-Romero<sup>2</sup>, Marco Antonio Jiménez-López<sup>3</sup>, José Guadalupe Muñoz-Camacho<sup>3</sup>, Hugo Alberto Barrera-Saldaña<sup>4</sup>, Marco Antonio Leyva-Vázquez<sup>1</sup>, Berenice Illades-Aguiar<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biomedicina Molecular, <sup>2</sup>Laboratorio de Cito-patología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Edificio C Av. Lázaro Cárdenas S/N Ciudad Universitaria Sur, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>3</sup>Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” Av. Adolfo Ruiz Cortines No. 128 Acapulco, Guerrero, Mexico.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina-UANL, Fco. I. Madero s/n esq. Dr. Aguirre Pequeño Col. Mitras Centro, C. P. 64460.

\*Corresponding author

Email addresses:

JOO: [julioortiz771210@gmail.com](mailto:julioortiz771210@gmail.com)

MAMC: [mglmendoza7@gmail.com](mailto:mglmendoza7@gmail.com)

OdelMH: [odelmoralh@gmail.com](mailto:odelmoralh@gmail.com)

LCAR: [luzdelcarmen14@gmail.com](mailto:luzdelcarmen14@gmail.com)

MAJL: [marcoajl16@gmail.com](mailto:marcoajl16@gmail.com)

JGMC: [jgmc\\_66@yahoo.com.mx](mailto:jgmc_66@yahoo.com.mx)

HABS: [habarrera@gmail.com](mailto:habarrera@gmail.com)

MALV: [leyvamarco13@gmail.com](mailto:leyvamarco13@gmail.com)

\*BIA (corresponding author): [b.illadesaguiar@gmail.com](mailto:b.illadesaguiar@gmail.com)

## Resumen

**Introducción:** La infección persistente por VPH 16 es una de las principales causas del cáncer cervicouterino, pero sólo una pequeña fracción de las mujeres infectadas desarrollará esta neoplasia. Se ha sugerido que la carga viral alta, la integración del genoma viral al de las pacientes y la variante del VPH 16 contribuyen en el desarrollo de CaCU. Diversos estudios han propuesto al estado físico y la carga viral como marcadores de progresión, sin embargo la variabilidad de resultados ha limitado su uso clínico. Estudios recientes sugieren que la variabilidad de la carga viral y el estado físico se relacionan con las variantes de VPH 16, pero la relación y el papel que juegan en el desarrollo del CaCU no están bien esclarecidos. El propósito de este estudio fue analizar la asociación del estado físico y la carga viral del VPH 16 con las variantes E6, las lesiones precursoras y CaCU en mujeres del Sur de México.

**Métodos:** El estado físico y la carga viral de 27 variantes E6 del VPH 16 fueron analizados en 325 muestras de DNA de células cervicales. De acuerdo al diagnóstico citológico y/o histológico, las muestras se dividieron en cuatro grupos: Sin LEI (n=96), LEIBG (n=120), LEIAG (n=18) y CaCU (n=91). Los genes E6, E2 (E2A y E2B) y RNAsa P fueron amplificados y cuantificados mediante PCR en tiempo real, usando iniciadores específicos y sondas TaqMan. Se utilizaron las pruebas de: Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y  $X^2$ . Se calculó el índice Kappa y Odds Ratios con intervalos de confianza del 95%. El análisis estadístico y de datos se realizó con los softwares IBM SPSS Statistics V. 22 y STATA V.11. **Resultados:** De las 6 variantes más frecuentes en Guerrero, las variantes AA-a (54.3%) y E-A176/G350 (41.2%) presentaron las frecuencias más altas de la carga viral alta. Sin embargo la que presentó la asociación más fuerte fue la AA-c (OR=20.52; IC=3.43-122.82) seguida por la AA-a (OR=19.54; IC=5.17-73.79), ambas del sublinaje AA1. La carga viral alta también mostró asociación con CCE (OR=11.25; IC=4.31-29.35), ADC (OR=6.38; IC=1.09-37.31) y LEIAG (OR=5.64; IC=1.38-23.01). El estado integrado fue más frecuente en las variantes del sublinaje AA1, AA-a (77.1%) y AA-c (60%). Mientras que en las del sublinaje EUR, fue más frecuente el estado mixto principalmente en la E-G350 (70%), seguida por la E-C188/G350 (63.2%), E-A176/G350 (58.8%) y E-Prototipo (41.9%). A pesar de las altas frecuencias del estado integrado o mixto en más de una variante sólo la variante AA-a presentó asociación con el estado integrado (OR=13.76, IC=1.58-∞) y la E-G350 con el estado mixto (OR=2.87, IC=1.10-7.52). La frecuencia del estado integrado, mixto y episomal fue similar en todos los

grados de lesión. Las variantes AA-a y AA-c mostraron asociación con la integración cuando el sitio de rompimiento del genoma se llevó a cabo en la región de bisagra (OR=29.10; IC=3.48-∞ y OR=12.74; IC=1.46-∞ respectivamente). La única variante que mostró asociación con la carga viral alta e integración fue la AA-a (OR=19.54; IC=5.17-73.79 y OR=13.76; IC=1.58-∞ respectivamente). **Conclusiones:** La carga viral alta se asoció con las AA-c, AA-a, E-A176/G350, E-G350 y E-C188/G350, las cuales se han visto asociadas fuertemente con el desarrollo de CaCU. La carga viral incrementa a medida que aumenta el grado de lesión durante la carcinogénesis cervical mediada por variantes E6 del VPH 16, este hecho refuerza la hipótesis de que la carga viral alta se asocia con el desarrollo de CaCU. Este estudio sugiere que la variante AA-a del VPH 16 con carga viral alta y genoma integrado es un gran riesgo oncogénico para la progresión del CaCU en México.

**Palabras clave:** Variantes de HPV 16, carga viral, estado físico, cáncer cérvicouterino, lesiones precursoras.

## **Introducción**

El Virus del Papiloma Humano tipo 16 (VPH 16) se ha detectado en más del 60% de los casos de cáncer cérvicouterino (CaCU), siendo el más prevalente a nivel mundial en este tipo de cáncer [Li *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2012]. Sin embargo, las causas por las que solo un bajo porcentaje de lesiones asociadas a VPH16 progresan a cáncer, aun no están totalmente esclarecidas y se ha sugerido que factores virales como la carga viral, el estado físico y la variabilidad genética están involucrados en la progresión de una lesión a CaCU. La carga viral refleja la productividad de la replicación del DNA durante la infección por VPH 16, por lo que diversos estudios la proponen como un marcador de progresión del CaCU, basados en la asociación de la carga viral alta con infecciones persistentes [Fontaine *et al.*, 2008, Xi *et al.*, 2009; Ramanakumar *et al.*, 2010; Hamaguchi *et al.*, 2013], lesiones precursoras [Van Duin *et al.*, 2002, Gravitt *et al.*, 2007; Cricca *et al.*, 2007; Xi *et al.*, 2011, Carcopino *et al.*, 2012] y CaCU [Moberg *et al.*, 2005; Sundström *et al.*, 2013]. Las infecciones persistentes se han asociado con la integración del genoma viral al genoma celular [Nielsen *et al.*, 2010, Manawapat *et al.*, 2012], evento que se considera clave en la progresión de una lesión a CaCU [Kalantari *et al.*, 1998; Peitsaro *et al.*, 2002; Kulmala *et al.*, 2006; Cricca *et al.*, 2007; Qiu *et*

*al.*, 2007; Ramanakumar *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2013]. En la mayoría de los casos, la integración ocurre cuando el DNA se rompe en el gen E2 [Tonon *et al.*, 2001, Cricca *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2013], anulando la expresión de la proteína E2 y favoreciendo la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, así como la desregulación del ciclo celular mediante la degradación de proteínas como p53 y pRb (Münger *et al.*, 2004). Se han descrito varios sitios de rompimiento del DNA relacionados con la integración del genoma viral en los nucleótidos 2755, 2974, 3118, 3132, 3134, 3541, 3562 y 3597 de las regiones que codifican los dominios de transactivación y de bisagra de la proteína E2 [Kalantari *et al.*, 2001, Ariaspulido *et al.*, 2006, Cheung *et al.*, 2006, Azizi *et al.*, 2008, Dall *et al.*, 2008, Collins *et al.*, 2009, Tsakogiannis, *et al.*, 2012].

El base al análisis de los polimorfismos del gen E6 del VPH 16 [Chen *et al.*, 2011, Huertas-Salgado *et al.*, 2011, Cornet *et al.*, 2012], las variantes se han clasificado en 4 linajes principales: Europea-Asiática (EAS), Africana 1 (AFR1), Africana 2 (AFR2) y Asiático Americana/Norte Americana (AA-NA); 9 sublinajes (E, As, Afr1a, Afr1b, Afr2a, Afr2b, NA, AA1, AA2) y 22 clases [Huertas-Salgado *et al.*, 2011, Cornet *et al.*, 2012]. Diversos estudios han demostrado que la variabilidad genética del virus tiene implicaciones importantes en su potencial oncogénico [Lichtig *et al.*, 2006, Qiu *et al.*, 2007, Zuna *et al.*, 2009, Gheit *et al.*, 2011, Jang *et al.*, 2011, Zehbe *et al.*, 2011 Cornet *et al.*, 2013]. Estudios realizados en México han reportado que las infecciones son más persistentes cuando son causadas por variantes de los sublinajes AFR o AA (AA-a y AA-c) en comparación con la E-Prototipo, provocando un mayor riesgo de desarrollar CaCU [Berumen *et al.* 2001, Lizano *et al.*, 2009, Illades-Aguiar *et al.*, 2010, Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015]. También se ha reportado que las variantes del sublinaje AA retienen la integridad del gen E2 y generan un alto número de copias virales en células infectadas, sugiriendo que estas variantes se replican más rápido que las del E [Casas *et al.*, 1999] y podrían favorecer la progresión de una lesión a CaCU invasivo. Estudios recientes sugieren que el rompimiento e integración del genoma del VPH 16 podría no llevarse a cabo por la presencia de polimorfismos identificados en el gen E2 de variantes de los sublinajes AFR1, AFR2, AA y E en casos de lesiones de alto y bajo grado [Giannoudis *et al.*, 2001, Azizi *et al.*, 2008, Tsakogiannis *et al.*, 2012].

La presencia de polimorfismos en el gen E2 de las variantes [Giannoudis *et al.*, 2001, Azizi, *et al.*, 2008, Tsakogiannis *et al.*, 2012, Cheung *et al.*, 2013] podría estar inhibiendo el

rompimiento e integración del genoma viral, la replicación del DNA viral o la actividad funcional de la proteína E2, manifestándose en la ausencia de integración en algunos casos de CaCU [Ordoñez et al 2004, Gray *et al.*, 2010, Cheung *et al.*, 2013]. Esto podría ser una de las razones por las cuales diversos estudios no han encontrado asociación de la carga viral alta e integración con las lesiones precursoras y CaCU [Arias-pulido *et al.*, 2006, Castle *et al.*, 2005, Briolat *et al.*, 2007, Guo et al 2007, Azizi *et al.*, 2008, Boulet *et al.*, 2009, Xi *et al.*, 2009, Schiffman *et al.*, 2010, manawapat *et al.*, 2012, Cheung *et al.*, 2013, Chang *et al.*, 2013]. Existen pocos estudios enfocados en el análisis del estado físico, la carga viral y la variabilidad genética del VPH 16 y su asociación con la presencia de lesiones precursoras y CaCU [Cheung *et al.*, 2006, Qiu *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2013]. Con la finalidad de generar información que permita entender mejor esta patología, el objetivo de este estudio fue determinar si el estado físico y la carga viral de VPH 16 se asocia con las variantes E6 identificadas y con la presencia de lesiones precursoras y CaCU en mujeres del Estado de Guerrero, México. Encontramos que la carga viral alta se asocia con las variantes E6 previamente reportadas como más oncogénicas y con el desarrollo de CaCU. Sin embargo, a pesar de que el estado físico difiere entre variantes, sólo la variante AA-a se asocia con el estado integrado, pero no con las lesiones precursoras o CaCU.

## **Resultados**

De un total de 330 muestras de DNA cervical, provenientes de mujeres con un rango de edad de 17 a 97 años (media±DS, 38.45±14.454), positivas a DNA de las variantes E6 del VPH 16, a 325 se les determinó la carga viral y estado físico mediante PCR en tiempo real, de las cuales fueron 96 sin lesión escamosa intraepitelial (LEI), 120 con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), 18 con lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG), 76 con carcinoma de células escamosas (CCE), 13 con adenocarcinoma (ADC) y 2 con otros tumores epiteliales.

*Carga viral del VPH 16 expresada en número de copias virales/equivalente celular por tipo de variante E6 y por grado de lesión cervical.*

La carga viral del VPH 16 en número de copias virales/ equivalente celular estuvo distribuida en un rango de 0.0002 a 5,778.5366 (media 169.7093±655.1394, mediana 2.2266,

rango intercuartilo 0.05175-27.7897). El análisis global utilizando la prueba de Kruskal-Wallis mostró que la distribución del número de copias virales/equivalente celular fue significativamente diferente entre variantes E6 del VPH 16 ( $p=0.007$ ), los 3 valores más altos fueron observados en las variantes E-G350, E-C188/G350 y AA-a respectivamente (tabla 1). Por otra parte, la distribución del número de copias virales/equivalente celular con respecto al grado de lesión también fue significativamente diferente ( $p<0.001$ ), los 3 valores más altos fueron observados en los grupos de LEIBG, sin LEI y CCE respectivamente (tabla 1).

El análisis comparativo realizado entre las seis variantes más frecuentes utilizando la prueba de Mann-Whitney, mostró diferencias significativas en la distribución del número de copias virales/equivalente celular entre la variante E-Prototipo y las variantes AA-a ( $p<0.001$ ), E-G350 ( $p<0.001$ ), AA-c ( $p<0.001$ ), E-C188/G350 ( $p<0.001$ ) y E-A176/G350 ( $p=0.001$ ), así como también entre la variante E-G350 y la variante AA-a ( $p=0.008$ ) (Figura 1a). Por otra parte, la distribución del número de copias virales/equivalente celular entre grupos de acuerdo al grado de lesión mostró diferencias significativas entre el grupo sin LEI y los grupos de LEIAG ( $p=0.010$ ) y de CCE ( $p<0.001$ ), así como, entre LEIBG y LEIAG ( $p=0.008$ ) y CCE ( $p<0.001$ ) (Figura 1b).

#### *Relación de la carga viral con las variantes E6 más frecuentes y con diagnóstico cito/histológico cervical.*

La carga viral en número de copias virales/equivalente celular fue dividida en tres centiles y categorizada en baja, media y alta, los valores del centil 1 correspondientes a valores menores a 0.224533 fueron considerados como carga viral baja, los valores del centil 2 correspondientes a valores iguales a 0.224533 y menores a 11.139533 fueron considerados como carga viral media y finalmente los valores del centil 3 iguales o mayores a 11.139533 fueron considerados como carga viral alta.

Observamos asociación significativa de las cinco variantes E6 de VPH 16 más frecuentes con la carga viral categorizada como baja, media y alta ( $p<0.001$ ). La frecuencia de carga viral media y alta es mayor en las variantes E-G350 (35.4% y 33.1% respectivamente), E-A176/G350 (29.4% y 41.2% respectivamente), E-C188/G350 (39.47% y 28.95% respectivamente), AA-a (31.4% y 54.3% respectivamente) y AA-c (50% y 40% respectivamente) en comparación con la E-Prototipo (11.6% y 14% respectivamente) (tabla 3).



También mostró asociación significativa de la carga viral con el grado de lesión ( $p < 0.001$ ). Se observó que la carga viral alta aumenta conforme aumenta el grado de la lesión cervical: CCE (55.26%), LEIAG (50%), LEIBG (24.2%) y sin LEI (24%) (tabla 3).

*Asociación de la carga viral con las variantes E6 más frecuentes y con las LEIBG, LEIAG, CCE y ADC.*

La asociación de la carga viral media y alta con las variantes más frecuentes del VPH 16, se evaluó usando a la variante E-Prototipo como referencia. Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas de la carga viral tanto media como alta con las variantes E-G350, E-A176/G350, E-C188/G350, AA-a, y AA-a (Tabla 6). En cuanto al grado de lesión cervical, la carga viral media presentó asociación estadísticamente significativa con la presencia de CCE (OR=6.31 IC=2.36-16.83) y ADC (OR=7.21 IC=1.27-41.07), mientras que la carga viral alta presentó asociación significativa con la presencia de LEIAG (OR=5.64 IC=1.38-23.01), CCE (OR=11.25 IC=4.31-29.35) y ADC (OR=6.38 IC=1.09-37.31) (Tabla 7).

*Proporción E2/E6 del VPH 16 en variantes E6 y por grado de lesión cervical.*

Para determinar el estado físico del genoma de VPH 16, se calculó la proporción E2/E6 usando sondas dirigidas hacia una región específica del gen E6 y hacia dos regiones del gen E2, una que codifican el dominio de transactivación (E2A) y otra que codifica la región de bisagra de la proteína E2 (E2B), en dichas regiones se han reportado los sitios de rompimiento del genoma viral más comunes. En base a la proporción E2/E6 el estado físico del DNA viral fue categorizado como: episomal cuando la proporción fue mayor a 0.8122 (E2A) y 0.8167 (E2B), integrado cuando fue menor de 0.001 y mixto cuando fue de 0.001 a 0.8122 (E2A) o 0.8167 (E2B).

La proporción E2/E6 obtenida usando la sonda E2A fue distribuida en un rango de 0 a 1.9334 (media  $0.4318 \pm 0.4040$ , mediana 0.3750, rango intercuartilo 0.0668-0.6489), mientras que la obtenida usando la sonda E2B en uno de 0 a 4.8029 (media  $0.782412 \pm 0.9182$ , mediana 0.41125, rango intercuartilo 0.0006-1.3891) (tabla 2). El análisis global de la distribución de la proporción E2A/E6, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en las variantes E6 ( $p = 0.010$ ), al igual que la distribución de la proporción E2B/E6 ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, con respecto al grado de lesión cervical, ni la proporción E2A/E6, ni la E2B/E6

mostraron diferencias significativas entre grupos ( $p=0.699$  y  $p=0.366$  respectivamente) (tabla 2). El análisis comparativo realizado con las seis variantes más frecuentes utilizando la prueba de Mann-Whitney, mostró diferencias significativas en la distribución de la proporción E2A/E6, entre la variante E-G350 y las variantes E-C188/G350 ( $p=0.027$ ) y AA-a ( $p<0.001$ ), así como entre la variante E-A176/G350 y las variantes E-C188/G350 ( $p=0.008$ ) y AA-a ( $p=0.001$ ) (Figura 2a). También se encontraron diferencias significativas en la distribución de la proporción E2B/E6, entre la variante E-Prototipo y las variantes E-G350 ( $p=0.003$ ), E-A176/G350 ( $p=0.025$ ), AA-a ( $p=0.001$ ), y AA-c ( $p=0.012$ ), entre la variante E-G350 y las variantes AA-a ( $p<0.001$ ) y AA-c ( $p= p<0.001$ ), entre la variante E-A176/G350 y AA-a ( $p<0.001$ ) y entre E-C188/G350 y las variantes AA-a ( $p<0.001$ ) y AA-c ( $p=0.001$ ) (Figura c). Sin embargo con respecto al grado de lesión cervical, la comparación entre grupos no mostró diferencias significativas tanto en la proporción E2A/E6, como en la E2B/E6 (Figura 2b y d).

#### *Relación del estado físico con las variantes E6 más frecuentes y con diagnóstico cito/histológico cervical.*

Observamos asociación significativa del estado físico con las variantes E6 más frecuentes del VPH16 ( $p<0.001$ ) cuando consideramos los datos generados con ambas sondas (E2A y E2B). El estado mixto del genoma viral fue más frecuente en las variantes E-G350 (70%), E-C188/G350 (63.2%) y E-A176/G350 (58.8%) pertenecientes al sublineaje EUR, mientras que el estado integrado fue más frecuente en las variantes AA-a (60%) y AA-a (77.1%) pertenecientes al sublineaje AA1 (tabla 3). El análisis del estado físico del genoma viral en base al sitio de rompimiento usando la prueba de  $X^2$ , mostró asociación significativa de las variantes con las dos regiones analizadas ( $p<0.001$ ). Con respecto a la sonda E2A, el estado mixto del genoma viral fue más frecuente en las variantes E-A176/G350 (52.9%), E-C188/G350 (65.8%), E-G350 (67.69%), AA-c (85%) y AA-a (97.1%). En cuanto a la sonda E2B, el estado integrado fue más frecuente en las AA-c (60%) y AA-a (77.1%). También se observó que en los diferentes grados de lesión cervical el estado físico no presentó asociación significativa, ya sea que se utilice una sonda o ambas (tablas 3 y 4).

Se observó que el rompimiento del gen E2 y la integración del genoma viral de las variantes E6 del VPH 16 difieren entre variantes y en función de la región del gen E2 analizada. Cuando el estado físico se evaluó con la sonda E2A el estado mixto predominó en

todas las variantes y en todos los grados de lesión cervical, observándose las frecuencias más altas en la variante AA-a (97.1%) y en el ADC (84.6%). Por otra parte, cuando se utilizó la sonda E2B el estado episomal predominó en las variantes del sublinaje EUR principalmente en la E-A176/G350 (64.7%) y en las LEIAG (55.6%), mientras que el estado integrado predominó en las variantes del sublinaje AA1 principalmente en la AA-a (77.1%) (tabla 4). Se evaluó la concordancia en la determinación del estado físico viral cuando este fue determinado por una o otra sonda (E2A o E2B), utilizando el índice Kappa, el cual mostró una concordancia de 50.95% (tabla 5), lo que sugiere la necesidad de utilizar ambas sondas en la determinación del estado físico viral para optimizar su detección y obtener resultados confiables, considerando que el gen E2 del VPH 16 puede romperse indistintamente en una u otra región del genoma viral.

*Asociación del estado físico y la carga viral con las variantes E6 del VPH 16 y con las LEIBG, LEIAG, CCE y ADC.*

Cuando el estado físico fue evaluado considerando los datos obtenidos con ambas sondas (E2A y E2B) mostró asociación significativa del estado integrado con la variante AA-a (OR=13.76 IC=1.58-∞) (Tabla 6), pero no mostró asociación significativa con el grado de lesión cervical (tabla 7). La evaluación del estado físico con la sonda E2A, mostró asociación significativa del estado mixto del genoma viral con las variantes E-C188/G350 (OR=4.52 IC=1.08-18.89), AA-c (OR=9.40 IC=1.07-82.36) y AA-a (OR=18.80 IC=2.20-160.59). Mientras que con la sonda E2B se encontró asociación significativa del estado integrado con las variantes AA-c (OR=12.74 IC=1.46-∞) y AA-a (OR=29.10 IC=3.48-∞) ambas pertenecientes al sublinaje AA1 (Tabla 8).

*Carga viral y estado físico de las variantes nuevas del VPH 16.*

Se determinó la carga viral y el estado físico de los once casos con variantes nuevas. De los nueve casos con variantes del sublinaje EUR dos presentaron cargas virales altas, cinco cargas virales medias y dos cargas virales bajas. Con respecto al estado físico, dos presentaron estado episomal y siete el estado mixto. Los dos casos con variantes del sublinaje AA1 presentaron cargas virales medias, sin embargo, al igual que en la mayoría de las variantes del sublinaje AA1 ambas mostraron el estado integrado de su genoma, sobre todo cuando este fue

determinado con la sonda E2B (tabla 9). Es necesario realizar estudios en un número mayor de muestras positivas a estas nuevas variantes de VPH 16, para conocer su capacidad de integración al genoma celular, así como los patrones de carga viral de las mismas.

## **Discusión**

Al igual que las variantes intratípicas del VPH 16, la carga viral y el estado físico del genoma viral han sido ampliamente estudiados. Se sabe que las variantes E-G350, AA-c y AA-a son más oncogénicas que la E-Prototipo y tres de las más frecuentes aisladas en mujeres del Sur de México junto con las variantes E- A176/G350 y E- C188/G350, las cuales también presentan una fuerte asociación con el desarrollo de CaCU (Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015). Se ha visto que las variantes de VPH 16 difieren geográficamente en todo el mundo debido a la evolución ligada a grupos étnicos y que el riesgo de CaCU debido a dichas variantes es dependiente de la población (Berumen *et al.*, 2001, Calleja-Macías *et al.*, 2004, Zuna *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2011, Yamada *et al.*, 1997, Villa *et al.*, 2000, Tornesello *et al.*, 2004, Tornesello *et al.*, 2011, Cornet *et al.*, 2013). A pesar de que diversos estudios epidemiológicos y moleculares, han reportado una fuerte asociación de la severidad de una lesión cervical con la carga viral alta (Carcopino *et al.*, 2012, van Duin *et al.*, 2002, Moberg *et al.*, 2005, Gravitt *et al.*, 2007, Sundstrom *et al.*, 2013, Hamaguchi *et al.*, 2013) y con el estado integrado del genoma del VPH 16 (Ramanakumar *et al.*, 2010, Peitsaro *et al.*, 2002, Kulmala *et al.*, 2006, Cricca *et al.*, 2007), existen otros que no han encontrado asociación de la carga viral alta e integración con las lesiones precursoras y CaCU [Arias-pulido *et al.*, 2006, Castle *et al.*, 2005, Briolat *et al.*, 2007, Guo *et al.* 2007, Azizi *et al.*, 2008, Boulet *et al.*, 2009, Xi *et al.*, 2009, Schiffman *et al.*, 2010, manawapat *et al.*, 2012, Cheung *et al.*, 2013, Chang *et al.*, 2013] y otros más que sugieren que el rompimiento del gen E2 y la integración no son necesarios para la sobreexpresión de E6 y E7, sobre todo en los casos de cáncer donde no hay integración del genoma viral, en los cuales se sugiere la existencia de mecanismos alternativos capaces de permitir la sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 (Cheung *et al.*, 2013). Debido a la variabilidad en los resultados de diversos estudios. La relación de la carga viral y el estado físico del genoma viral con las variantes del VPH 16 y con las lesiones precursoras y CaCU aun no está bien esclarecida. Por esta razón se ha limitado su uso clínico. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el estado físico y la carga viral en muestras sin

LEI, con LEIBG, LEIAG y CaCU positivas a la infección por variantes E6 del VPH 16, mediante el uso de la proporción E2/E6 y número de copias virales/equivalente celular, para analizar su asociación con dichas variantes y con el desarrollo del CaCU.

El análisis de la carga viral reveló diferencias significativas en el número de copias virales/equivalente celular entre las variantes identificadas, así como entre los diferentes grados de lesión cervical. La carga viral alta fue observada con mayor frecuencia en la variante AA-a, seguida por la E-A176/G350, AA-c, E-G350 y E-C188/G350 en comparación con la E-Prototipo, mostrando una fuerte asociación estadísticamente significativa de dichas variantes con la carga viral tanto media como alta. Con respecto al grado de lesión cervical, se observó que la frecuencia de la carga viral alta incrementa a medida que incrementa la severidad de la lesión cervical, es decir desde las muestras sin LEI hasta CaCU, mostrando una fuerte asociación de la carga viral media con el CCE y ADC, y de la carga viral alta con las LEIAG, CCE y ADC. Nuestros resultados difieren de lo reportado por Cheung et al., (2006) en un estudio realizado con variantes de los sublinajes As y EUR del VPH 16, en el cual no observaron asociación de la carga viral con las variantes ni con la severidad de la lesión cervical. La diferencia observada podría explicarse en parte por las variantes y población analizadas, pues como sabemos actualmente la función de ciertos genes en una célula puede variar en función de la variante que la infecta, alterando el comportamiento celular (Lichtig *et al.*, 2006, Pillai *et al.*, 2009, Zehbe *et al.*, 2009, Richard *et al.*, 2010, Zehbe *et al.*, 2011, Sichero *et al.*, 2012), también se ha sugerido que el potencial oncogénico de las variantes puede ser dependiente de la población estudiada (Cornet *et al.*, 2013) y que las variantes como la AA-a, E-A176/G350, AA-c, E-G350 y E-C188/G350 encontradas en México se asocian más fuertemente a CaCU en comparación con la E-Prototipo (Berumen *et al.*, 2001, Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015). Por lo tanto, la asociación significativa de la carga viral media y alta con las variantes E6 y con las LEIAG, el CCE y ADC sugiere que la carga viral podría estar jugando un papel importante en el potencial oncogénico de las variantes para favorecer la progresión de una lesión cervical a CaCU.

Actualmente se sabe que existen varios sitios de rompimiento en el genoma del VPH 16 localizados en todos los genes, con excepción de E7, E5 y la región URR, sin embargo, de todos los sitios de rompimiento identificados, se ha mostrado, que solo los localizados en el gene E2, E1 y en la región de traslape E2/E4 muestran asociación con CaCU y LEIAG, por lo

que se sugiere que el rompimiento del genoma del VPH 16 y su integración no son eventos aleatorios (Li *et al.*, 2013, Vega-Peña *et al.*, 2013). En el presente estudio, se determinó el estado físico del genoma viral, basado en la amplificación de dos fragmentos del gen E2 ubicados en las regiones que codifican para el dominio de transactivación y la región de bisagra de la proteína E2 del VPH 16, estos fragmentos incluyen sitios de rompimiento del genoma previamente reportados (Kalantari *et al.*, 2001, Arias-pulido *et al.*, 2006, Cheung *et al.*, 2006, Azizi *et al.*, 2008, Dall *et al.*, 2008, Collins *et al.* 2009, Tsakogiannis, *et al.*, 2012). El análisis del estado físico, reveló diferencias significativas en la proporción E2/E6 entre variantes, pero no entre los grados de lesión cervical, independientemente de la región analizada. Se observó que cuando el genoma viral se rompe en la región que codifica el dominio de transactivación, el estado mixto del genoma predomina en todas las variantes, siendo más frecuente en las variantes del sublinaje AA1. A pesar de que el estado mixto predominó en todas las variantes, la asociación significativa solo se observó con las variantes E-C188/G350, AA-c y AA-a. Por otra parte, se observó que cuando el genoma viral se rompe en la región de bisagra, en las variantes del sublinaje EUR predominó el estado episomal, mientras que en las del sublinaje AA1 (incluidas las variantes nuevas) predominó el integrado, el cual mostró una fuerte asociación estadísticamente significativa con las variantes AA-a y AA-c. La determinación del estado físico considerando ambas regiones reveló frecuencias diferentes en los grupos de estudio, mostrando asociación estadísticamente significativa únicamente del estado integrado con la variante AA-a. Las pruebas de concordancia entre las dos regiones amplificadas del gen E2 para determinar el estado físico del genoma viral, revelaron que para obtener datos más confiables del estado físico en base al análisis del gen E2, es necesario considerar la amplificación y análisis de ambas regiones, ya que el uso de una sola genera falsos positivos o falsos negativos del estado físico, dependiendo de la región amplificada. Con respecto al grado de lesión cervical, los resultados no mostraron asociación estadísticamente significativa del estado físico con el grado de lesión cervical, sin embargo, se observó que la integración es un evento temprano que se presenta desde las muestras sin LEI hasta CaCU, también encontramos casos de CaCU carente de integración del genoma viral.

Nuestros resultados coinciden de cierta manera con lo reportado por Cheung *et al.*, (2006), en un estudio donde observaron que la mayoría de los casos con eliminaciones de fragmentos largos fueron en variantes del sublinaje asiático, las cuales se asociaron con un

riesgo más alto de LEIAG y carcinoma de células escamosas, algo parecido a lo que encontramos en este estudio donde la mayoría de los casos con integración fueron positivos a variantes del sublinaje AA1 las cuales se han asociado con un mayor riesgo de LEIAG y CaCU (Berumen *et al.*, 2001, Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015). Al igual que en este estudio, Cheung *et al.*, (2006) reportan casos de CaCU carentes de integración del genoma viral, lo cual coincide con la propuesta de que el rompimiento del gen E2 no es obligatorio para el desarrollo del CaCU (Cheung *et al.*, 2013). Por otra parte, nuestros resultados difieren de los reportados por Tsakogiannis *et al.*, (2012) en su estudio enfocado en la búsqueda de sitios de rompimiento del gen E2 y análisis de la variabilidad genética en dicho gen, donde encontraron al gen E2 intacto en LEIBG y roto en todos los casos de LEIAG. Sin embargo, ellos reportan que la variación genética en el gen E2 fue detectada principalmente en las regiones que codifican la región de bisagra y el dominio de transactivación de la proteína E2, las cuales han sido reportadas como las regiones donde el genoma viral se rompe e integra con mayor frecuencia (Arias-Pulido *et al.*, 2006, Collins *et al.*, 2009). Además, ellos también encontraron que la variación de nucleótidos específicos se asocia con las variantes de los sublinajes AFR1, AFR2 y AA, y sugieren que las variaciones en E2 podrían estar involucradas en mecanismos alternativos para desregular la expresión de los oncogenes E6 y E7. La variación genética en el gen E2 podría ser una de las razones por las cuales el rompimiento del genoma viral y su integración al genoma celular varía entre las variantes E6 como lo muestran las altas frecuencias del estado integrado en las variantes del sublinaje AA1 (principalmente AA-c y AA-a) en comparación con las variantes del sublinaje EUR, sobre todo cuando el rompimiento del genoma ocurre en la región de bisagra. Este mismo patrón se observa en los 11 casos con nuevas variantes identificadas previamente por nuestro grupo de trabajo. Cuando el rompimiento del genoma ocurre en la región de bisagra en este pequeño grupo, nosotros observamos que las nuevas variantes pertenecientes al sublinaje EUR presentaron un estado mixto en su mayoría, mientras que las pertenecientes al sublinaje AA1 presentaron un estado integrado.

Finalmente, varios estudios reportan resultados similares a los encontrados en este estudio, como la asociación significativa de la carga viral alta con LEIAG y CaCU [Van Duin *et al.*, 2002, Gravitt *et al.*, 2007; Cricca *et al.*, 2007; Xi *et al.*, 2011, Carcopino *et al.*, 2012], con CaCU [Moberg *et al.*, 2005; Sundström *et al.*, 2013] o la nula asociación del estado físico integrado con progresión de la enfermedad [Arias-pulido *et al.*, 2006, Castle *et al.*, 2005,

Briolat *et al.*, 2007, Guo *et al.* 2007, Azizi *et al.*, 2008, Boulet *et al.*, 2009, Xi *et al.*, 2009, Schiffman *et al.*, 2010, manawapat *et al.*, 2012, Cheung *et al.*, 2013, Chang *et al.*, 2013], sin embargo, a diferencia de ellos, en este se evaluó la asociación de estos factores virales con las variantes del VPH 16 y se demostró que las variantes del VPH 16 son un factor importante que contribuye a las diferencias en la carga viral y estado físico del genoma del VPH 16, como lo sugieren estudios previos (Cheung *et al.*, 2006, Qiu *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2013, Shukla *et al.*, 2014).

## **Conclusiones**

Nuestros resultados muestran que la carga viral alta se asocia con las variantes E6 más frecuentes en guerrero y que presentan un riesgo alto de CaCU (AA-c, AA-a, E-A176/G350, E-G350 y E-C188/G350). La frecuencia de la carga viral alta incrementa a medida que aumenta la severidad de la lesión en la carcinogénesis cervical mediada por variantes E6 del VPH 16 y esta asociada al desarrollo del CaCU. El estado mixto fue más frecuente en las variantes del sublinaje EUR. Mientras que el estado integrado fue más frecuente en las variantes del sublinaje AA1. El mismo comportamiento se observó en las nuevas variantes. Solo la variante AA-a mostró asociación con la integración. La integración se asocia con las variantes del sublinaje AA1 cuando el rompimiento del gen E2 se lleva a cabo en la región de bisagra. Para determinar el estado físico del genoma del VPH 16 es necesario utilizar por lo menos 2 sondas; una dirigida a la región de bisagra y otra a la región que codifica el dominio de transactivación de la proteína E2. La integración del genoma del VPH 16 no es necesaria en un número considerable de casos de CaCU. Este estudio sugiere el riesgo oncogénico de la carga viral alta y la integración de la variante AA-a para la progresión del CaCU en México. Además, representa el estudio más grande realizado en México analizando el estado físico, la carga viral de las variantes europeas y no europeas del VPH 16 en el espectro completo de la enfermedad, desde citología sin LEI hasta CaCU, incluyendo CCE y ADC. Sin embargo, son necesarios más estudios que analicen la patogenicidad de las variantes E6 del VPH 16.



## **Métodos**

### *Muestras*

Un total de 330 muestras positivas al DNA de variantes del VPH 16, obtenidas de raspados cervicales y biopsias de mujeres residentes del estado de Guerrero, fueron consideradas para el análisis comparativo de este estudio. Las muestras fueron clasificadas en: sin LEI, previamente diagnosticadas con LEIBG, LEIAG y CaCU, este último reagrupado en CCE, ADC y otros tumores epiteliales. Las muestras fueron captadas en el periodo de 1997 a 2012 en el laboratorio de Citopatología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero y en el área de Ginecología Oncológica del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”. El diagnóstico citológico fue realizado por un citopatólogo experimentado con base a la clasificación del sistema Bethesda, indicada en la norma oficial mexicana (NOM-014-SSA2-1994 modificada). El diagnóstico histológico fue realizado por un patólogo experimentado de acuerdo al sistema de clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (FIGO Comité 2000). El DNA del VPH 16 fue detectado para su identificación mediante tres métodos en función del periodo de captación de la muestra: a) de 1997 a 2010 se detectó con el sistema PCR MY09/MY11-RFLPs, y se tipificó mediante digestión con siete enzimas de restricción: Bam HI, Dde I, Hae III, Inf. I, Pst I, Rsa I y Sau3 AI (GIBCO BRL), b) en las muestras que no se logró detectar e identificar con el método antes mencionado, se utilizó el sistema PCR GP5+/GP6+ y se tipificó por secuenciación (BigDye Terminator v 3.1 de Applied Biosystems, (Illades-Aguiar, *et al.*, 2010), c) de 2010 a 2012 se utilizó el kit de trabajo INNO LiPA genotyping Extra (Innogenetics) que puede identificar hasta 28 tipos virales (Kleter *et al.*, 1999). La identificación de las variantes E6 del VPH 16, fue realizada mediante el análisis de las secuencias en estudios previos (Illades-Aguiar *et al.*, 2010, Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015). El trabajo fue aprobado por el comité institucional de bioética. Todas las pacientes que participaron en el estudio firmaron un consentimiento informado.

### *Determinación del estado físico y la carga viral de las variantes E6 del VPH16*

El estado físico y la carga viral de cada variante previamente identificada, fueron determinados por PCR en tiempo real, amplificando dos regiones del gen E2, una región del gen E6 del VPH 16 y una región del gen de copia única RNAsa P para calcular el número

equivalente de células, usando iniciadores y sondas TaqMan (Applied Biosystems) (Cuadro 1). Los iniciadores y sondas fueron diseñados considerando que incluyeran el menor número de polimorfismos presentes tanto en el gen E2, como en E6 de las variantes E6 del VPH 16 previamente identificadas en el Estado de Guerrero. Además, los iniciadores y sondas para E2 fueron dirigidos hacia las regiones que codifican; el dominio de transactivación (sonda E2A) y la región de bisagra (sonda E2B), en los cuales se han reportado con mayor frecuencia sitios de rompimiento e integración del genoma de VPH 16 [Kalantari *et al.*, 2001, Arias-pulido *et al.*, 2006, Cheung *et al.*, 2006, Azizi *et al.*, 2008, Tsakogiannis, *et al.*, 2012]. La PCR de los tres genes fue realizada en un volumen final de reacción de 10 µl, la cual contenía; 50 ng de DNA diluidos en 2 µl, 5 µl de Universal MasterMix II (Applied Biosystems) y 0.5 µl de una mezcla de iniciadores y sondas específicos para cada gen y región. Se utilizó el equipo para PCR en tiempo real ABI-PRISM 7500 (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones; 2 min a 50° C, 10 min a 95° C, seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95° C y 1 min a 60° C. Todas las reacciones se corrieron por duplicado mostrando una alta reproducibilidad promediando los valores para el análisis. En cada corrida se incluyeron controles positivos y negativos. Los controles positivos fueron DNA extraído de las líneas celulares SiHa con 1-2 copias integradas del genoma del VPH 16. Los controles negativos fueron los componentes de la reacción sin DNA (Boulet, *et al.*, 2009, Saunier, *et al.*, 2008).

El número equivalente de células fue calculado en base a la curva estándar de RNAsa P, generada con DNA genómico obtenido de 10000, células previamente cuantificadas, con el cual se prepararon diluciones equivalentes a 10000, 5000, 2500, 1250 y 625 células, utilizando el kit comercial Taqman copy number reference assay RNase P (Applied Biosystems). Las curvas estándar para los genes E2 y E6 fueron generadas determinando el ciclo del umbral de detección de diluciones con  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  copias/µl del plásmido pUC8 que contiene insertado el genoma completo del VPH16. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. La ecuación para el cálculo del número de copias de cada gen por muestra, fue la siguiente:  $x = \exp((y - b)/m)$ . En la ecuación x representa el número de copias del gen; y representa el valor de Ct; b y m son valores constantes obtenidos de la ecuación del gráfico de la curva estándar de cada gen. La carga viral por célula fue obtenida dividiendo el número de copias de E6 entre el número equivalente de células obtenido a partir de la curva de RNAsa P

(Van Duin *et al.*, 2002, Flores *et al.*, 2006), para evaluar la carga viral los datos se dividieron en tres centiles considerados como baja, media y alta (centil 1, 2 y 3 respectivamente).

Tomando como base lo realizado por Chang *et al.*, 2013, el estado físico de las variantes del VPH 16 se determinó mediante el cálculo de la proporción E2/E6 para cada muestra dividiendo el número de copias de E2 obtenido con las sondas E2A y E2B entre el número de copias de E6. Para asegurar la validez del método, las proporciones E2A/E6 y E2B/E6 fueron determinadas utilizando las curvas estándar obtenidas de las diluciones del plásmido pUC8 que contiene el genoma completo del VPH16 que representó la forma episomal y DNA de células SiHa que representó la forma integrada 1 a 2 copias por célula con proporciones que varían de 0 a 1, cuando la proporción E2A/E6 fue menor de 0.001 se reportó como integrado, cuando fue entre 0.001 a 0.8122 coexistencia de forma episomal e integrada (mixto) y cuando fue mayor de 0.8122 se reportó como episomal, con respecto a la proporción E2B/E6, cuando fue menor de 0.001 se reportó como integrado, cuando fue entre 0.001 a 0.8167 como coexistencia de forma episomal e integrada (mixto) y cuando fue mayor de 0.8167 se reportó como episomal.

#### *Análisis estadístico*

La captura de datos y el análisis estadístico fueron realizados usando los programas estadísticos IBM SPSS Statistics V. 22 y STATA V.11. La carga viral de las variantes fue expresada en copias virales/equivalente celular, mientras que el estado físico evaluado en las dos regiones de E2 fue definido por la proporción E2/E6. Las diferencias de carga viral y de la proporción E2/E6 entre variantes y entre grados de lesión fueron comparadas usando las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. La relación entre la carga viral y estado físico de las variantes de VPH16 con el diagnóstico citológico se evaluó utilizando la prueba de dependencia estadística  $X^2$ . La concordancia entre sondas para ver cual era mejor método para determinar estado físico se calculó con el índice Kappa. Además, se calcularon Odds Ratios (OR) con intervalos de confianza del 95%, ajustado por edad para estimar el riesgo de desarrollar una lesión precursora o CaCU asociado con el estado mixto, la integración, carga viral media o alta, así como su asociación con las variantes E6 del VPH 16 más frecuentes en Guerrero.

## **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses

## **Contribución de los autores**

BIA y MALV diseño y supervisión de la investigación. JOO Determinación del estado físico y carga viral de VPH 16 JOO, y OdelMH análisis de resultados. JOO, y MAMC análisis estadísticos. LCAR, JGMC y MAJL Diagnóstico histológico y citológico de las muestras colectadas. JOO y BIA elaboración del manuscrito, HABS revisión crítica del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

## **Agradecimientos**

Este estudio fue apoyado con financiamiento de la UAGro en la convocatoria 2013 y por financiamiento de CONACYT, México.

## **Referencias**

1. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM: **Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication.** Int J Cancer 2011, **128**(4): 927-935.
2. Guan, P, Howell-Jones, R, Li, N, Bruni, L, de Sanjose, S, Franceschi, S, Clifford, GM: **Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer.** Int J Cancer 2012, **131**: 2349–2359.
3. Fontaine J<sup>1</sup>, Hankins C, Money D, Rachlis A, Pourreaux K, Ferenczy A; Canadian Women's HIV Study Group, Coutlée F: **Human papillomavirus type 16 (HPV-16) viral load and persistence of HPV-16 infection in women infected or at risk for HIV.** J Clin Virol 2008, **43**(3): 307-312.
4. Xi LF, Hughes JP, Edelstein ZR, Kiviat NB, Koutsky LA, Mao C, Ho J, Schiffman M: **Human Papillomavirus (HPV) Type 16 and Type 18 DNA Loads at Baseline and Persistence of Type-Specific Infection during a 2-Year Follow-Up.** J Infect Dis 2009, **200**(11): 1789-1797.
5. Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, Franco EL: **Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women.** BMC Infect Dis 2010, **10**:326.
6. Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H: **Initial Viral Load in Cases of Single Human Papillomavirus 16 or 52 Persistent Infection Is Associated With Progression of Later Cytopathological Findings in the Uterine Cervix.** J Med Virol 2013, **85**(12): 2093-100.

7. van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, van den Brule AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ: **Human Papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance.** *Int J Cancer* 2002, **98**(4): 590-5.
8. Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Rodriguez AC, Burk RD: **High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease.** *Int J Cancer* 2007, **121**(12): 2787-2793.
9. Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M: **Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions.** *Gynecol Oncol* 2007, **106**(3): 549-57.
10. Xi LF, Hughes JP, Castle PE, Edelstein ZR, Wang C, Galloway DA, Koutsky LA, Kiviat NB, Schiffman M: **Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Infection: A Nested Case-Control Study.** *J Infect Dis* 2011, **203**(10):1425-33.
11. Carcopino X, Henry M, Mancini J, Giusiano S, Boubli L, Olive D, Tamalet C: **Significance of HPV 16 and 18 Viral Load Quantitation in Women Referred for Colposcopy.** *J Med Virol* 2012, **84**(2): 306-313.
12. Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U: **High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma.** *Br J Cancer* 2005, **92**(5): 891-894.
13. Sundström K<sup>1</sup>, Ploner A, Dahlström LA, Palmgren J, Dillner J, Adami HO, Ylitalo N, Sparén P: **Prospective study of HPV16 viral load and risk of in situ and invasive squamous cervical cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013, **22**(1): 150-158.
14. Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Osler M, Iftner T: **Persistence of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women .** *J Med Virol* 2010, **82**(4): 616-623.
15. Manawapat A, Stubenrauch F, Russ R, Munk C, Kjaer SK, Iftner T: **Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study.** *Am J Cancer Res* 2012, **2**(2): 192-203.
16. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B: **Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis.** *Int J Gynecol Pathol* 1998, **17**(2): 146-153.
17. Peitsaro, P, Johansson, B, Syrjänen, S: **Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(3): 886-891.
18. Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, Syrjänen KJ, Johansson BC: **Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology.** *J Clin Pathol* 2006, **59**(5): 513-517.
19. Qiu AD<sup>1</sup>, Wu EQ, Yu XH, Jiang CL, Jin YH, Wu YG, Chen Y, Chen Y, Shan YM, Zhang GN, Fan Y, Zha X, Kong W: **HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China.** *Gynecol Oncol* 2007, **104**(1): 77-85.

20. Chang L, He X, Yu G, Wu Y: **Effectiveness of HPV 16 Viral Load and the E2/E6 Ratio for the Prediction of Cervical Cancer Risk Among Chinese Women.** *J Med Virol* 2013, **85**(4): 646-654.
21. Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teysse AR: **Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions.** *J Clin Virol* 2001, **21**(2):129-34.
22. Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M: **Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions.** *J Virol Methods* 2009, **158**(1-2):180-3.
23. Li H, Yang Y, Zhang R, Cai Y, Yang X, Wang Z, Li Y, Cheng X, Ye X, Xiang Y, Zhu B: **Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions.** *J Clin Virol* 2013, **56**(4): 342-347.
24. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K: **Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis.** *J Virol* 2004, **78**(21): 11451-11460.
25. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B: **Physical State of HPV16 and Chromosomal Mapping of the Integrated Form in Cervical Carcinomas.** *Diagn Mol Pathol* 2001, **10**(1): 46-54.
26. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM: **Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**(5): 1755-1762.
27. Cheung JL, Lo KW, Cheung TH, Tang JW, Chan PK: **Viral Load, E2 Gene Disruption Status, and Lineage of Human Papillomavirus Type 16 Infection in Cervical Neoplasia.** *J Infect Dis* 2006, **194**(12): 1706-1712.
28. Azizi N, Brazete J, Hankins C, Money D, Fontaine J, Koushik A, Rachlis A, Pourreaux K, Ferenczy A, Franco E, Coutlée F; Canadian Women's HIV Study Group: **Influence of human papillomavirus type 16 (HPV- 16) E2 polymorphism on quantification of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplásica.** *J Gen Virol.* 2008 Jul;89(Pt 7):1716-28.
29. Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, Winder DM, Stanley MA, Muralidhar B, Herdman MT, Pett MR, Coleman N: **Characterization of Naturally Occurring HPV16 Integration Sites Isolated from Cervical Keratinocytes under Noncompetitive Conditions.** *Cancer Res* 2008, **68**(20): 8249-8259
30. Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, Young LS, Roberts S, Murray PG, Woodman CB: **Disruption of the E2 Gene Is a Common and Early Event in the Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection: A Longitudinal Cohort Study.** *Cancer Res* 2009, **69**(9): 3828-3832.
31. Tsakogiannis D, Ruether I, Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Theoharopoulou A, Skordas V, Panotopoulou E, Nepka C, Markoulatos P: **Sequence variation analysis of the E2 gene of human papilloma virus type 16 in cervical lesions from women in Greece.** *Arch Virol* 2012, **157**(5): 825-832.
32. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M, Sahasrabudhe VV, Gravitt PE, Hsing AW, Burk RD: **Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67.** *PLoS One* 2011, **6**(5):e20183. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0020183>.

33. Huertas-Salgado A, Martín-Gámez DC, Moreno P, Murillo R, Bravo MM, Villa L, Molano M: **E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature.** *Virology* 2011, **410**(1): 201-215.
34. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, Tommasino M, Clifford GM; IARC HPV Variant Study Group: **Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR.** *J Virol* 2012, **86**(12): 6855-6861.
35. Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, Tommasino M, Zehbe I, Sherman L: **HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6.** *Virology* 2006, **350**(1): 216-227.
36. Zuna, RE, Moore, WE, Shanesmith, RP, Dunn, ST, Wang, SS, Schiffman, M, Blakey, GL, Teel, T: **Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population.** *Int J Cancer* 2009, **125**(11): 2609-2613.
37. Gheit, T, Cornet, I, Clifford, GM, Iftner, T, Munk, C, Tommasino, M, Kjaer, SK: **Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011, **20**(7): 1315-1321.
38. Jang, M, Rhee, JE, Jang, DH, Kim, SS: **Gene Expression Profiles are Altered in Human Papillomavirus-16 E6 D25E-Expressing Cell Lines.** *Virology* 2011, **8**:453.
39. Zehbe, I, Lichtig, H, Westerback, A, Lambert, PF, Tommasino, M, Sherman, L: **Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential.** *Mol Cancer* 2011, **10**:77  
<http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/77>
40. Cornet I, Gheit T, Iannacone MR, Vignat J, Sylla BS, Del Mistro A, Franceschi S, Tommasino M, Clifford GM: **HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide.** *Br J Cancer* 2013, **108**(1): 240-244.
41. Berumen, J, Ordoñez, RM, Lazcano, E, Salmerón, J, Galván, SC, Estrada, RA, Yunes, E, García-Carranca, A, González-Lira, G and Madrigal-de la Campa, A: **Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**(17): 1325-1330.
42. Lizano, M, Berumen, J, García-Carranca, A: **HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants.** *Arch Med Res* 2009, **40**(6): 428-434.
43. Illades-Aguiar B, Alarcón-Romero Ldel C, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, Fernández-Tilapa G, Vences-Velázquez A, Muñoz-Valle JF, Leyva-Vázquez MA: **Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico.** *Gynecol Oncol* 2010, **117**(2): 291-296.
44. Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero LdelC, Jiménez-López MA, Garzón-Barrientos VH, Calleja-Macías I, Barrera-Saldaña HA, Leyva-Vázquez MA, Illades-Aguiar B: **Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico.** *Virology*. Aceptado enero 2015.

45. Casas, L, Galván, SC, Ordoñez, RM, López, N, Guido, M, Berumen, J: **Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas.** *Int J Cancer* 1999, **83**(4): 449–455.
46. Giannoudis A, Duin M, Snijders PJ, Herrington CS: **Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix.** *Br J Cancer* 2001, **84**(8): 1058-1063.
47. Cheung JL, Cheung TH, Yu MY, Chan PK: **Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome.** *Gynecol Oncol* 2013, **131**(2): 374-379.
48. Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendáriz-Borunda J, Berumen J: **Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription.** *J Gen Virol* 2004, **85**(Pt 6): 1433-1444.
49. Gray E, Pett MR, Ward D, Winder DM, Stanley MA, Roberts I, Scarpini CG, Coleman N: **In vitro progression of human papillomavirus 16 episome-associated cervical neoplasia displays fundamental similarities to integrant-associated carcinogenesis.** *Cancer Res* 2010, **70**(10):4081-91.
50. Castle PE, Schiffman M, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Schussler JE, Wacholder S, Lorincz AT: **Semiquantitative Human Papillomavirus Type 16 Viral Load and the Prospective Risk of Cervical Precancer and Cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**(5): 1311-1314.
51. Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Prétet JL, Birembaut P, Clavel C: **HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN.** *Int J Cancer* 2007, **121**(10): 2198-204.
52. Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, Luthra R, Zhang W: **Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma.** *Mod Pathol* 2007, **20**(2): 256-266.
53. Boulet GA, Benoy IH, Depuydt CE, Horvath CA, Aerts M, Hens N, Vereecken AJ, Bogers JJ: **Human Papillomavirus 16 Load and E2/E6 Ratio in HPV16-Positive Women: Biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia  $\geq 2$  in a Liquid-Based Cytology Setting?** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**(11): 2992-2999.
54. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, Desalle R, Befano B, Yu K, Safaeian M, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Solomon D, Castle PE, Burk RD: **A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia.** *Cancer Res* 2010, **70**(8): 3159-3169.
55. Jiang M, Baseman JG, Koutsky LA, Feng Q, Mao C, Kiviat NB, Xi LF: **Sequence Variation of Human Papillomavirus Type 16 and Measurement of Viral Integration by Quantitative PCR.** *J Clin Microbiol* 2009, **47**(3): 521-526.
56. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA: **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* 2004, **319**(2): 315-323.

57. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer C, Muñoz N, Bosh FX, Wheeler M: **Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective.** *J Virol* 1997, **71**(3): 2463-2472.

58. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL: **Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplásica.** *J Gen Virol* 2000, **81**: 2959–2968.

59. Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, Stellato G, Greggi S, Piccoli R, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Franceschi S, Buobaguro FM: **Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer.** *J Med Virol* 2004, **74**(1): 117-126.

60. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, Buonaguro L, Buonaguro FM: **Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix.** *Gynecol Oncol* 2011, **121**(1): 32-42.

61. Pillai MR<sup>1</sup>, Hariharan R, Babu JM, Lakshmi S, Chiplunkar SV, Patkar M, Tongaonkar H, Dinshaw K, Jayshree RS, Reddy BK, Siddiqui M, Roychoudury S, Saha B, Abraham P, Gnanamony M, Peedicayil A, Subhashini J, Ram TS, Dey B, Sharma C, Jain SK, Singh N. **Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population.** *Int J Cancer* 2009, **125**(1): 91-103.

62. Zehbe I, Richard C, Decarlo CA, Shai A, Lambert PF, Lichtig H, Tommasino M, Sherman L: **Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of humankeratinocyte differentiation and apoptosis.** *Virol* 2009, **383**: 69-77.

63. Richard C, Lanner C, Naryzhny SN, Sherman L, Lee H, Lambert PF, Zehbe: **The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer.** *Oncogene* 2010, **29** (23): 3435-3445.

64. Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL: **Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants.** *Virol* 2012, **432**: 127–132.

65. Vega-Pena A, Illades-Aguiar B, Flores-Alfaro E, Lopez-Bayghen E, Leyva-Vazquez MA, Castaneda-Saucedo E, Alarcon-Romero LdelC: **Risk of progression of early cervical lesions is associated with integration and persistence of HPV-16 and expression of E6, Ki-67, and telomerase.** *J Cytol* 2014, **30**: 226-32.

66. Shukla S, Mahata S, Shishodia G, Pande S, Verma G, Hedau S, Bhambhani S, Kumari A, Batra S, Basir SF, Das BC, Bharti AC: **Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cáncer.** *Indian J Med Res* 2014, **139** (4):531-543.

67. Benedet JL, Bender H, Jones H3rd, Ngan HY, Pecorelli S: **FIGO staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology.** *Int J Gynecol Obstet* 2000, **70**:209–62.

68. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, Lindeman J, ter Harmsel B, Burger M, Quint W: **Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus.** J Clin Microbiol 1999, **37**(8):2508-17.
69. Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwarz E, Mougin C, Pretet JL: **Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for Identification of HPV16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma.** J Clin Microbiol 2008, **46**:3678–36
70. Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR: **Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia.** Int J Cancer 2006, **118**:1187-1193.

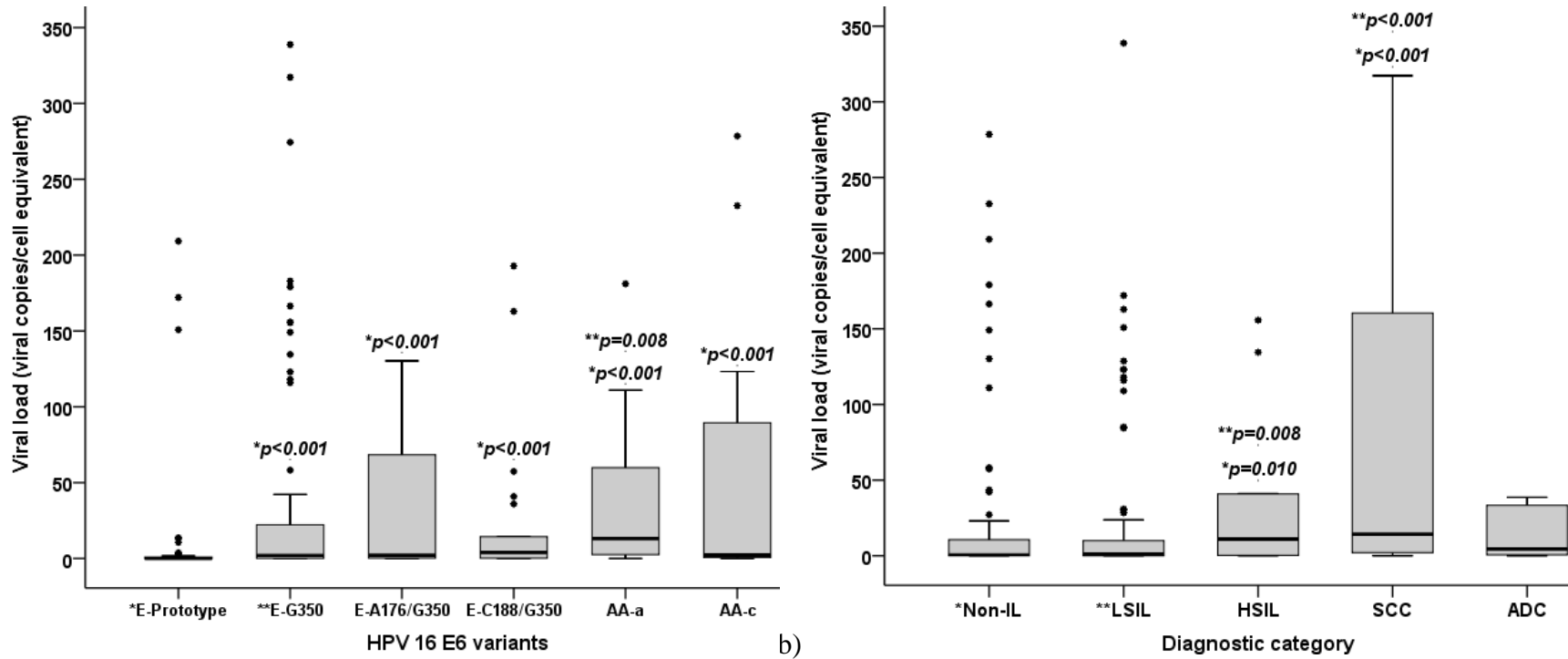
**Cuadro 1. Iniciadores y sondas para calcular la proporción E2/E6 y la carga viral de las variantes E6 del VPH 16.**

<b>Primers and probes</b>	<b>Sequence</b>	<b>Location</b>
<b>E6 F</b>	5'- ACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTA-3'	385 – 413
<b>E6 R</b>	5'- GCTTTTGTCCAGATGTCTTTGCTT-3'	446 – 470
<b>E6 probe</b>	5'FAM- AAAGCCACTGTGTCCTG-NFQ-3'	424 – 440
<b>E2A F</b>	5'- TGGATATACAGTGAAGTGCAGTTTG-3'	3094 – 3118
<b>E2A R</b>	5'- CCACAGTTACTGATGCTTCTTCACA-3'	3173 – 3197
<b>E2A probe</b>	5'FAM- ATGGAGACATATGCAATACAAT-NFQ-3'	3120 – 3141
<b>E2B F</b>	5'- CAGCAACGAAGTATCCTCTCCT-3'	3357 – 3378
<b>E2B R</b>	5'- GCGACGGCTTTGGTATGG-3'	3420 – 3437
<b>E2B probe</b>	5'FAM- AAGTGCTGCCTAATAATTTC-NFQ-3'	3379 – 3398
<b>RNAse P F</b>	5'- AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'	5541 – 5559
<b>RNAse P R</b>	5'- GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'	5590 – 5600
<b>RNAse P probe</b>	5'VIC -TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-TAMRA-3'	5570 – 5580

Table 1. Carga viral y su relación con las variantes E6 del VPH 16 y el diagnóstico cito/histológico cervical.

Variants	N=325	Viral load (viral copies/Cell equivalent)			p value
		Min-Max	Mean±SD	Median	
<b>Lineage EAS / Sublineage EUR</b>	<b>266</b>	<b>0.0002-5778.5366</b>	<b>162.0871±648.5054</b>	<b>1.55900</b>	
<b>Class E-T350</b>	<b>50</b>	<b>0.0002-2163.1201</b>	<b>67.3441±314.3571</b>	<b>0.01150</b>	
E-Prototype	43	0.0002-534.3509	25.9572±91.6997	0.01260	
E-G131	7	0.0003-2163.1201	321.5775±812.7046	0.00330	
<b>Class E-G350</b>	<b>216</b>	<b>0.0003-5778.5366</b>	<b>184.0183±702.3326</b>	<b>2.74690</b>	
E-G350	130	0.0003-5778.5366	190.3859±703.5911	2.09195	
E-C109/G350	5	1.4840-542.6919	117.5779±238.1516	2.95850	
E-G110/G350	2	0.5774-128.6797	64.6286±90.5820	64.62855	
E-G131/G350	2	0.0042-165.2418	82.6230±116.8406	82.62300	
E-G131/C188/G350	2	43.4892-85.0532	64.2712±29.3902	64.27120	
E-A176/G350	17	0.0033-1397.3353	110.1874±334.6717	2.16890	
**E-A176/G424/G350	1	69.4714	69.4714	69.47140	
E-T182/G350	4	0.0272-11.7879	4.8415±5.1514	3.77550	
E-C182/G350	2	1.8851-19.8687	10.8769±12.7163	10.87690	
**E-C183/G350	3	0.0974-5.3647	3.5965±3.0304	5.32750	
E-G185/G350	2	0.0050-511.9263	255.9657±361.9830	255.96565	
E-A188/G350	1	65.0971	65.0971	65.09710	
E-C188/G350	38	0.0012-5450.5623	299.7918±1023.5156	3.98230	*0.007
**E-C188/G310/G350	2	0.4964-15.3711	7.9338±10.5180	7.93375	
**E-G189/T256/G350	1	3.2736	3.2736	3.27360	
E-G257/G350	1	3.0694	3.0694	3.06940	
**E-C306/G350	1	0.8641	0.8641	0.86410	
E-C442/G350	1	0.0064	0.0064	0.00640	
**G535/G350	1	0.1014	0.1014	0.10140	
<b>Lineage AA/NA / Sublineage AA1</b>	<b>58</b>	<b>0.0022-4330.5944</b>	<b>207.4357±694.4805</b>	<b>7.71955</b>	
<b>Class AA-a</b>	<b>36</b>	<b>0.0022-4330.5944</b>	<b>282.3570±861.8588</b>	<b>12.78910</b>	
AA-a	35	0.0022-4330.5944	294.3607±873.0829	13.15730	
**AA-a/C188	1	2.2266	2.2266	2.22660	
<b>Class AA-c</b>	<b>22</b>	<b>0.0093-976.8268</b>	<b>84.8371±213.8666</b>	<b>2.07990</b>	
AA-c	20	0.0093-976.8268	93.1414±223.0584	2.26000	
**AA-c/G185	1	2.0058	2.0058	2.00580	
AA-c/C271	1	1.5838	1.5838	1.58380	
<b>Lineage AFR2 / Sublineage Afr2a</b>	<b>1</b>	<b>9.1023</b>	<b>9.1023</b>	<b>9.10230</b>	
<b>Class Af2-a</b>	<b>1</b>	<b>9.1023</b>	<b>9.1023</b>	<b>9.10230</b>	
Af2-a/C109/G403	1	9.1023	9.1023	9.10230	
<b>Diagnostic category</b>					
Non-IL	96	0.0003-5450.5623	131.6656±687.1133	0.70150	
LSIL	120	0.0002-5778.5366	128.7247±619.6123	1.14495	
HSIL	18	0.0182-1278.5307	100.0869±297.9894	11.09965	
SCC	76	0.0014-4330.5944	301.0082±755.9704	14.27495	* <0.001
ADC	13	0.0053-1397.3353	185.9837±442.7574	4.54470	
Other epithelial tumors	2	0.1382-8.5536	4.3459±5.9506	4.34590	
<b>Total</b>		<b>0.0002-5778.5366</b>	<b>169.7093±655.1394</b>	<b>2.22660</b>	

\*\* , Variantes nuevas. \* , Prueba de Kruskal-Wallis.



a) **Distribución de la carga viral en (copias virales/equivalente celular).** a) Entre las variantes más frecuentes. b) De acuerdo al grado de lesión por categoría diagnóstica. Cada caja indica el rango intercuartil, las líneas que se extienden de cada caja indican los extremos de los valores, los asteriscos indican los valores demasiado altos. La línea que atraviesa cada caja indica la mediana en cada grupo. La comparación entre grupos se realizó con la prueba de Mann-Whitney.

Table 2. Proporción E2/E6 y su relación con las variantes E6 del VPH 16 y el diagnóstico cito/histológico cervical.

Variants	E2A/E6 ratio (Transactivation domain)					E2B/E6 ratio (Hinge domain)				
	N=325	Min-Max	Mean±SD	Median	P value	N=316	Min-Max	Mean±SD	Median	P value
<b>Lineage EAS / Sublineage EUR</b>	<b>266</b>	<b>0.0000-1.9334</b>	<b>0.4649±0.4191</b>	<b>0.43345</b>		<b>257</b>	<b>0.0000-4.8029</b>	<b>0.9590±0.9324</b>	<b>0.73810</b>	
Class E-T350	50	0.0000-1.6901	0.3817±0.4526	0.17420		48	0.0000-2.3513	0.6530±0.7395	0.26725	
E-Prototype	43	0.0000-1.6901	0.4128±0.4652	0.25100		43	0.0000-2.3513	0.6455±0.7133	0.26900	
E-G131	7	0.0000-0.7612	0.1907±0.3302	0.00000		5	0.0000-2.2661	0.7180±1.0381	0.00000	
Class E-G350	216	0.0000-1.9334	0.4842±0.4096	0.45250		209	0.0000-4.8029	1.0293±0.9590	0.82910	
E-G350	130	0.0000-1.9334	0.4798±0.3851	0.47270		130	0.0000-4.8029	1.0888±0.9791	0.89930	
E-C109/G350	5	0.0367-1.1150	0.3280±0.4470	0.17510		5	0.2299-1.9023	0.6571±0.7049	0.43160	
E-G110/G350	2	0.5261-1.3411	0.9336±0.5763	0.93360		1	0.4024	0.4024	0.40240	
E-G131/G350	2	0.0000-0.2330	0.1165±0.1648	0.11650		2	0.0948-0.6806	0.3877±0.4142	0.38770	
E-G131/C188/G350	2	0.4378-0.4648	0.4513±0.0191	0.45130		1	1.6191	1.6191	1.61910	
E-A176/G350	17	0.0000-1.1819	0.6124±0.3799	0.62480		17	0.0000-3.2479	1.1445±0.8817	1.15950	
**E-A176/G424/G350	1	1.7600	1.7600	1.7600		1	3.3195	3.3195	3.31950	
E-T182/G350	4	0.0000-0.8852	0.4232±0.4896	0.40375		1	0.0002-1.7011	0.5762±0.7834	0.30180	
E-C182/G350	2	0.4344-0.6226	0.5285±0.1331	0.52850		0	-	-	-	
**E-C183/G350	3	0.6174-1.1858	0.9073±0.2844	0.91880		3	0.3156-0.6712	0.4559±0.1893	0.38080	
E-G185/G350	2	0.0969-0.7558	0.4264±0.4659	0.42635		1	0.4032	0.4032	0.40320	
E-A188/G350	1	0.8357	0.8357	0.83570		1	1.9172	1.9172	1.91720	
E-C188/G350	38	0.0000-1.8315	0.3623±0.4488	0.28300	*0.010	38	0.0000-3.3886	0.8776±0.9957	0.55465	*<0.001
**E-C188/G310/G350	2	0.7228-1.3531	1.0380±0.4457	1.03795		1	1.6726	1.6726	1.67260	
**E-G189/T256/G350	1	0.7565	0.7565	0.75650		1	0.5808	0.5808	0.58080	
E-G257/G350	1	0.2562	0.2562	0.25620		0	-	-	-	
**E-C306/G350	1	0.5570	0.5570	0.55700		1	0.5979	0.5979	0.59790	
E-C442/G350	1	0.4001	0.4001	0.40010		1	0.4031	0.4031	0.40310	
**G535/G350	1	0.4332	0.4332	0.43320		1	2.1271	2.1271	2.12710	
<b>Lineage AA/NA / Sublineage AA1</b>	<b>58</b>	<b>0.0000-1.5478</b>	<b>0.2819±0.2881</b>	<b>0.17800</b>		<b>58</b>	<b>0.0000-0.2296</b>	<b>0.0133±0.0408</b>	<b>0.00040</b>	
Class AA-a	36	0.0085-0.8373	0.2033±0.1870	0.15000		36	0.0000-0.2296	0.0161±0.0452	0.00035	
AA-a	35	0.0085-0.8373	0.2065±0.1888	0.15020		35	0.0000-0.2296	0.0165±0.0458	0.00030	
**AA-a/C188	1	0.0939	0.0939	0.09390		1	0.0008	0.0008	0.00080	
Class AA-c	22	0.0000-1.5478	0.4104±0.3731	0.35590		22	0.0000-0.1543	0.0087±0.0327	0.00055	
AA-c	20	0.0000-1.5478	0.4094±0.3679	0.35590		20	0.0000-0.1543	0.0095±0.0342	0.00055	
**AA-c/G185	1	0.8393	0.8393	0.83930		1	0.0002	0.0002	0.00020	
AA-c/C271	1	0.0005	0.0005	0.00050		1	0.0006	0.0006	0.00060	
<b>Lineage AFR2 / Sublineage Afr2a</b>	<b>1</b>	<b>0.3179</b>	<b>0.3179</b>	<b>0.31790</b>		<b>1</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.00000</b>	
Class Af2-a	1	0.3179	0.3179	0.31790		1	0.0000	0.0000	0.00000	
Af2-a/C109/G403	1	0.3179	0.3179	0.31790		1	0.0000	0.0000	0.00000	
<b>Diagnostic category</b>										
Non-IL	96	0.0000-1.9334	0.4477±0.4435	0.36640		91	0.0000-4.8029	0.7372±0.8824	0.45480	
LSIL	120	0.0000-1.6002	0.4342±0.3827	0.38810		116	0.0000-4.3131	0.8876±0.9312	0.76285	
HSIL	18	0.0000-1.0884	0.4608±0.2853	0.50825		18	0.0000-3.3549	1.1638±1.1759	1.16385	
SCC	76	0.0000-1.8315	0.4151±0.4297	0.23220	*0.699	76	0.0000-3.3195	0.6464±0.8826	0.22645	*0.366
ADC	13	0.0071-1.0004	0.4112±0.3111	0.48910		13	0.0000-1.8381	0.5453±0.7329	0.01980	
Other epithelial tumors	2	0.0251-0.0398	0.0325±0.0104	0.03245		2	0.0007-0.0323	0.0165±0.0223	0.01650	
<b>Total</b>		<b>0.0000-1.9334</b>	<b>0.4318±0.4040</b>	<b>0.37500</b>			<b>0.0000-4.8029</b>	<b>0.7791±0.9178</b>	<b>0.41125</b>	

\*\*, Variantes nuevas. \*, Prueba de Kruskal-Wallis.

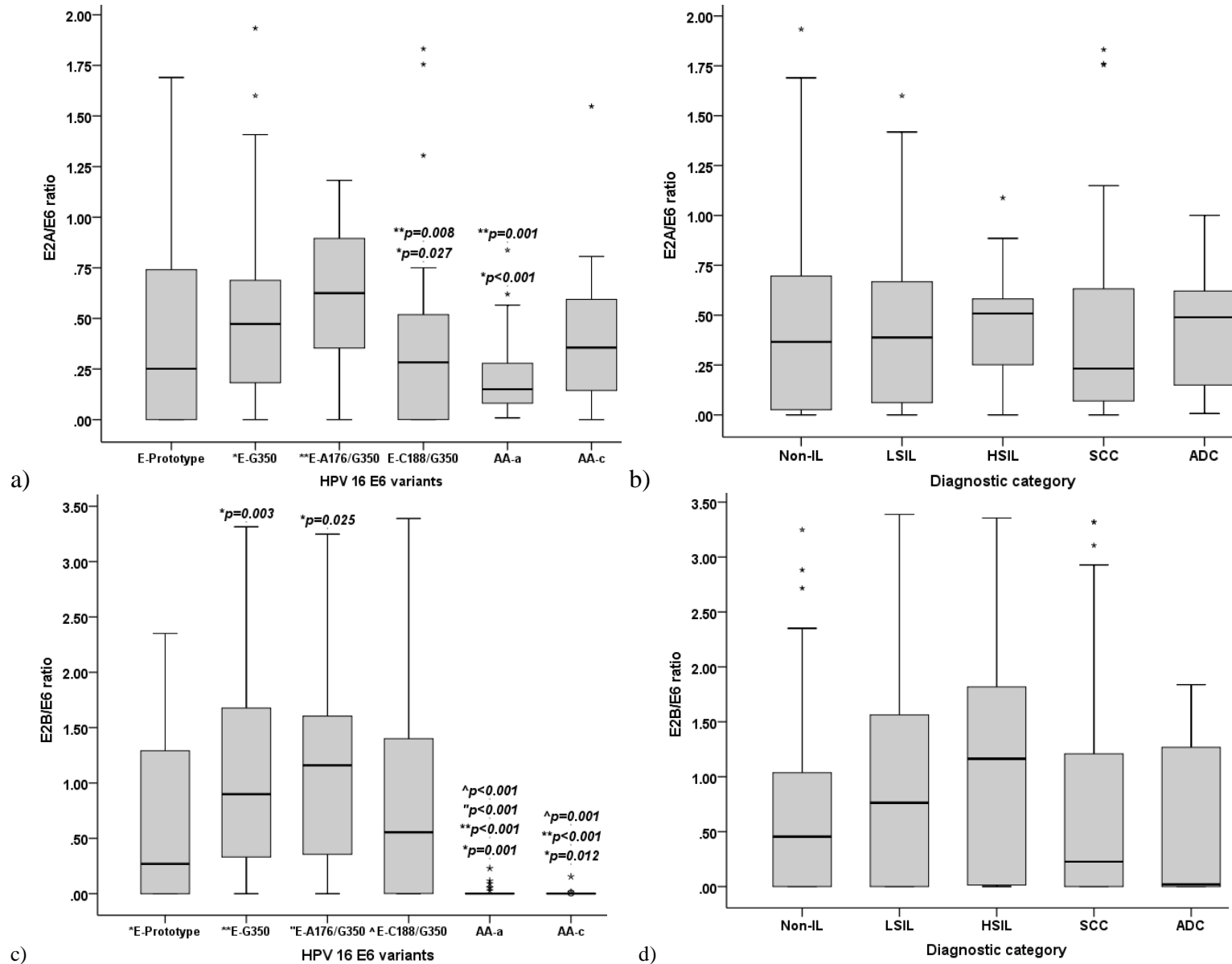


Figura 2. Distribución de la proporción E2/E6 entre variantes y de acuerdo al grado de lesión cervical por categoría diagnóstica. (a y b) Proporción E2A/E6 (Dominio de transactivación). (c y d) Proporción E2B/E6 (Región de bisagra). Cada caja indica el rango intercuartil, la línea que se extiende de cada caja indica los extremos de los valores, los asteriscos indican valores demasiado altos. La línea que atraviesa cada caja indica la mediana de cada grupo. La comparación entre grupos se realizó con la prueba de Mann-Whitney.

Tabla. 3. Relación del estado físico y la carga viral con las variantes E6 del VPH 16 y el diagnóstico cito/histológico cervical.

Variants	Viral load				p value	Physical state (E2A and E2B)				p value
	N= 325	Low	Mean	High		N= 325	Episomal	Mixed	Integrated	
<b>E variants</b>	<b>266</b>	<b>101 (37.97%)</b>	84 (31.58%)	81 (30.45%)		<b>266</b>	39 (14.66%)	<b>168 (63.16%)</b>	59 (22.18%)	
Class E-T350	<b>50</b>	<b>37 (74%)</b>	5 (10%)	8 (16%)		<b>50</b>	9 (18%)	20 (40%)	<b>21 (42%)</b>	
E-Prototype	43	<b>32 (74.4%)</b>	5 (11.6%)	6 (14.0%)		43	9 (20.9%)	<b>18 (41.9%)</b>	16 (37.2%)	
Class E-G350	<b>216</b>	64 (29.63%)	<b>79 (36.57%)</b>	73 (33.8%)		<b>216</b>	30 (13.89%)	<b>148 (68.52%)</b>	38 (17.59%)	
E-G350	130	41 (31.5%)	<b>46 (35.4%)</b>	43 (33.1%)		130	16 (12.3%)	<b>91 (70.0%)</b>	23 (17.7%)	
E-A176/G350	17	5 (29.4%)	5 (29.4%)	<b>7 (41.2%)</b>		17	6 (35.3%)	<b>10 (58.8%)</b>	1 (5.9%)	
E-C188/G350	38	12 (31.58%)	<b>15 (39.47%)</b>	11 (28.95%)		38	3 (7.9%)	<b>24 (63.2%)</b>	11 (28.9%)	
<b>AA variants</b>	<b>58</b>	7 (12.07%)	24 (41.38%)	<b>27 (46.55%)</b>	*<0.001	<b>58</b>	0 (0.0%)	16 (27.59%)	<b>42 (72.41%)</b>	*<0.001
Class AA-a	<b>36</b>	5 (13.89%)	12 (33.33%)	<b>19 (52.78%)</b>		<b>36</b>	0 (0.0%)	8 (22.22%)	<b>28 (77.78%)</b>	
AA-a	35	5 (14.3%)	11 (31.4%)	<b>19 (54.3%)</b>		35	0 (0.0%)	8 (22.9%)	<b>27 (77.1%)</b>	
Class AA-c	<b>22</b>	<b>2 (9.09%)</b>	<b>12 (54.55%)</b>	<b>8 (36.36%)</b>		<b>22</b>	0 (0.0%)	8 (36.36%)	<b>14 (63.64%)</b>	
AA-c	20	2 (10.0%)	<b>10 (50.0%)</b>	8 (40.0%)		20	0 (0.0%)	8 (40.0%)	<b>12 (60.0%)</b>	
<b>Af variants</b>	<b>1</b>	-	<b>1 (100%)</b>	-		<b>1</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	<b>1 (100%)</b>	
Class Af2-a	<b>1</b>	-	<b>1 (100%)</b>	-		<b>1</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	<b>1 (100%)</b>	
Other less common	42	11 (26.2%)	17 (40.5%)	14 (33.3%)		33	5 (11.9%)	25 (59.5%)	12 (28.6%)	
<b>Diagnostic category</b>										
Non-IL	96	43 (44.8%)	30 (31.2%)	23 (24.0%)		91	11 (11.46%)	<b>55 (57.29%)</b>	30 (31.25%)	
LSIL	120	49 (40.8%)	42 (35.0%)	29 (24.2%)		116	14 (11.7%)	<b>69 (57.5%)</b>	37 (30.8%)	
HSIL	18	3 (16.7%)	6 (33.3%)	<b>9 (50.0%)</b>	*<0.001	18	2 (11.1%)	<b>11 (61.1%)</b>	5 (27.8%)	*0.999
SCC	76	10 (13.16%)	<b>24 (31.58%)</b>	<b>42 (55.26%)</b>		76	<b>10 (13.2%)</b>	<b>42 (55.3%)</b>	24 (31.6%)	
ADC	13	2 (15.4%)	<b>6 (46.1%)</b>	<b>5 (38.5%)</b>		13	<b>2 (15.4%)</b>	<b>6 (46.1%)</b>	5 (38.5%)	
Other epithelial tumors	2	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)		2	0 (0.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	

\*, Prueba de X<sup>2</sup>.



Tabla. 4. Integración del VPH 16 de acuerdo al sitio de rompimiento del gene E2 y su relación con las variantes E6 y el grado de lesión cervical.

Variants	Physical state E2A (Transactivation domain)				p value	Physical state E2B (Hinge domain)				p value
	N= 325	Episomal	Mixed	Integrated		N= 316	Episomal	Mixed	Integrated	
<b>E variants</b>	<b>266</b>	49 (18.42%)	<b>163 (61.28%)</b>	54 (20.30%)		<b>257</b>	<b>125 (48.64%)</b>	89 (34.63%)	43 (16.73%)	
<b>Class E-T350</b>	<b>50</b>	10 (20%)	<b>21 (42%)</b>	19 (38%)		<b>48</b>	<b>19 (39.58%)</b>	12 (25%)	17 (35.42%)	
E-Prototype	43	10 (23.26%)	<b>19 (44.19%)</b>	14 (32.56%)		43	<b>17 (39.5%)</b>	12 (27.9%)	14 (32.6%)	
<b>Class E-G350</b>	<b>216</b>	39 (18.06%)	<b>142 (65.74%)</b>	35 (16.20%)		<b>209</b>	<b>106 (50.72%)</b>	77 (36.84%)	26 (12.44%)	
E-G350	130	21 (16.15%)	<b>88 (67.69%)</b>	21 (16.15%)		130	<b>71 (54.6%)</b>	44 (33.9%)	14 (11.5%)	
E-A176/G350	17	7 (41.2%)	<b>9 (52.9%)</b>	1 (5.9%)		17	<b>11 (64.7%)</b>	5 (29.4%)	1 (5.9%)	
E-C188/G350	38	3 (7.9%)	<b>25 (65.8%)</b>	10 (26.3%)		38	<b>17 (44.7%)</b>	12 (31.6%)	9 (23.7%)	
<b>AA variants</b>	<b>58</b>	3 (5.17%)	<b>52 (89.66%)</b>	3 (5.17%)	**<0.001	<b>58</b>	0 (0.0%)	16 (27.59%)	<b>42 (72.41%)</b>	**<0.001
<b>Class AA-a</b>	<b>36</b>	1 (2.78%)	<b>35 (97.22%)</b>	0 (0.0%)		<b>36</b>	0 (0.0%)	8 (22.22%)	<b>28 (77.78%)</b>	
AA-a	35	1 (2.9%)	<b>34 (97.1%)</b>	0 (0.0%)		35	0 (0.0%)	8 (22.99%)	<b>27 (77.1%)</b>	
<b>Class AA-c</b>	<b>22</b>	2 (9.09%)	<b>17 (77.27%)</b>	3 (13.64%)		<b>22</b>	0 (0.0%)	8 (36.36%)	<b>14 (63.64%)</b>	
AA-c	20	1 (5.0%)	<b>17 (85.0%)</b>	2 (10.0%)		20	0 (0.0%)	8 (40.0%)	<b>12 (60.0%)</b>	
<b>Af variants</b>	<b>1</b>	0 (0.0%)	<b>1 (100%)</b>	0 (0.0%)		<b>1</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	<b>1 (100%)</b>	
<b>Class Af2-a</b>	<b>1</b>	0 (0.0%)	<b>1 (100%)</b>	0 (0.0%)		<b>1</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	<b>1 (100%)</b>	
Other less common	42	9 (21.43%)	<b>24 (57.14%)</b>	9 (21.43%)		33	9 (27.3%)	<b>16 (48.5%)</b>	8 (24.2%)	
<b>Diagnostic category</b>										
Non- IL	96	18 (18.8%)	<b>56 (58.3%)</b>	22 (22.9%)		91	32 (35.1%)	<b>36 (39.6%)</b>	23 (25.3%)	
LSIL	120	16 (13.33%)	<b>79 (65.83%)</b>	25 (20.83%)		116	<b>57 (49.1%)</b>	28 (24.1%)	31 (26.7%)	
HSIL	18	2 (11.1%)	<b>15 (83.3%)</b>	1 (5.6%)	**0.251	18	<b>10 (55.6%)</b>	4 (22.2%)	4 (22.2%)	**0.114
SCC	76	14 (18.42%)	<b>53 (69.74%)</b>	9 (11.84%)		76	22 (28.95%)	<b>32 (42.11%)</b>	22 (28.95%)	
ADC	13	2 (15.4%)	<b>11 (84.6%)</b>	0 (0.0%)		13	4 (30.8%)	4 (30.8%)	<b>5 (38.4%)</b>	
Other epithelial tumors	2	0 (0.0%)	<b>2 (100.0%)</b>	0 (0.0%)		2	0 (0.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	

\*\* , Prueba de X<sup>2</sup>.

Table 5. Concordancia de las sondas E2A y E2B para la determinación del estado físico del genoma de VPH 16.

Physical state E2A	Physical state E2B				Concordance	Kappa
	Episomal	Mixed	Integrated	Total		
Episomal	39	11	2	52	50.95%	0.2655
Mixed	85	81	43	209		
Integrated	1	13	41	55		
Total	125	105	86	316		

Tabla 6. Variantes E6 del VPH 16 y el riesgo de carga viral alta e integración.

Variants	Viral load					Physical state (E2A/E6 and E2B/E6)				
	Low N (%)	Mean N (%)	OR (CI 95%) P	High N (%)	OR (CI 95%) P	Episomal N (%)	Mixed N (%)	OR (CI 95%) P	Integrated N (%)	OR (CI 95%) P
<b>Class E-T350</b>	<b>37 (74%)</b>	5 (10%)	-	8 (16%)	-	9 (18%)	20 (40%)	-	<b>21 (42%)</b>	-
E-Prototype	32 (74.4%)	5 (11.6%)	1*	6 (14.0%)	1*	9 (20.9%)	<b>18 (41.9%)</b>	1*	16 (37.2%)	1*
<b>Class E-G350</b>	64 (29.63%)	<b>79 (36.57%)</b>	<b>8.42</b> <b>3.08-23.02</b> <b>0.000</b> <b>0.46</b>	<b>73 (33.80%)</b>	<b>6.01</b> <b>2.36-15.31</b> <b>0.000</b>	30 (13.89%)	<b>148 (68.52%)</b>	<b>2.52</b> <b>1.03-6.16</b> <b>0.043</b>	38 (17.59%)	0.69 0.27-1.79 0.444
E-G350	41 (31.5%)	<b>46 (35.4%)</b>	<b>7.45</b> <b>2.64-21.04</b> <b>0.000</b>	<b>43 (33.1%)</b>	<b>5.57</b> <b>2.11-14.71</b> <b>0.001</b>	16 (12.3%)	<b>91 (70.0%)</b>	<b>2.87</b> <b>1.10-7.52</b> <b>0.032</b>	23 (17.7%)	0.80 0.28-2.25 0.670
E-A176/G350	5 (29.4%)	<b>5 (29.4%)</b>	<b>7.58</b> <b>1.57-36.55</b> <b>0.012</b> <b>9.43</b>	<b>7 (41.2%)</b>	<b>7.30</b> <b>1.72-31.01</b> <b>0.007</b> <b>4.76</b>	6 (35.3%)	10 (58.8%)	0.24-3.21 0.838 4.18	1 (5.9%)	0.09 0.01-0.86 0.036 1.92
E-C188/G350	12 (31.58%)	<b>15 (39.47%)</b>	<b>2.75-32.28</b> <b>0.000</b> <b>18.52</b>	<b>11 (28.95%)</b>	<b>1.43-15.87</b> <b>0.011</b> <b>19.40</b>	3 (7.9%)	24 (63.2%)	0.98-17.88 0.054 4.19	11 (28.9%)	0.42-8.86 0.401 <b>14.51</b>
<b>Class AA-a</b>	5 (13.89%)	<b>12 (33.33%)</b>	<b>4.43-77.32</b> <b>0.000</b> <b>17.45</b>	<b>19 (52.78%)</b>	<b>5.15-73.10</b> <b>0.000</b> <b>19.54</b>	0 (0.0%) <sup>a</sup>	8 (22.22%)	0.45-∞ 0.209 4.15	<b>28 (77.78%)</b>	<b>1.67-∞</b> <b>0.015</b> <b>13.76</b>
AA-a	5 (14.3%)	<b>11 (31.4%)</b>	<b>4.12-73.89</b> <b>0.000</b> <b>48.97</b>	<b>19 (54.3%)</b>	<b>5.17-73.79</b> <b>0.000</b> <b>20.26</b>	0 (0.0%) <sup>a</sup>	8 (22.9%)	0.44-∞ 0.212 4.27	<b>27 (77.1%)</b>	<b>1.58-∞</b> <b>0.018</b> 7.12
<b>Class AA-c</b>	2 (9.09%)	<b>12 (54.55%)</b>	<b>8.12-295.28</b> <b>0.000</b> <b>41.03</b>	<b>8 (36.36%)</b>	<b>3.38-121.32</b> <b>0.001</b> <b>20.52</b>	0 (0.0%) <sup>a</sup>	8 (36.36%)	0.45-∞ 0.204 4.18	14 (63.64%)	0.79-∞ 0.081 6.05
AA-c	2 (10.0%)	<b>10 (50.0%)</b>	<b>6.69-251.61</b> <b>0.000</b> <b>41.03</b>	<b>8 (40.0%)</b>	<b>3.43-122.82</b> <b>0.001</b> <b>20.52</b>	0 (0.0%) <sup>a</sup>	8 (40.0%)	0.45-∞ 0.211 4.18	12 (60.0%)	0.66-∞ 0.111 6.05
<b>Class Af2-a</b>	0 (0.0%)	<b>1 (100%)</b>	-	<b>0 (0.0%)</b>	-	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-	<b>1 (100%)</b>	-

\*, Indica la categoría de referencia.

<sup>a</sup>, Para calcular OR e IC en el estado mixto e integrado de las variantes AA-a y AA-c se generó un caso artificial.

OR: Ajustado por edad.

Tabla 7. Carga viral, estado físico y riesgo de cáncer cervical.

	Non-IL N (%)	LSIL N (%)	OR (CI 95%) P	HSIL N (%)	OR (CI 95%) P	SCC N (%)	OR (CI 95%) P	ADC N (%)	OR (CI 95%) P	Other Epithelial Tumor N (%)	Total cervical cancer N (%)	OR (CI 95%) P
<b>Viral Load</b>												
<b>Low</b>	43 (44.8%)	49 (40.8%)	1* 1.06	3 (16.7%)	1* 2.97	10 (13.16%)	1* <b>6.31</b>	2 (15.4%)	1* <b>7.21</b>	1 (50.0%)-	13 (14.3%)	1* <b>5.99</b>
<b>Mean</b>	30 (31.2%)	42 (35.0%)	0.56-2.01 0.852	6 (33.3%)	0.68-12.96 0.148	<b>24 (31.58%)</b>	<b>2.36-16.83</b> <b>0.000</b>	<b>6 (46.1%)</b>	<b>1.27-41.07</b> <b>0.026</b>	1 (50.0%)	<b>31 (34.1%)</b>	<b>2.43-14.79</b> <b>0.000</b>
<b>High</b>	23 (24.0%)	29 (24.2%)	0.50-2.01 0.990	9 (50.0%)	<b>1.38-23.01</b> <b>0.016</b>	<b>42 (55.26%)</b>	<b>4.31-29.35</b> <b>0.000</b>	<b>5 (38.5%)</b>	<b>1.09-37.31</b> <b>0.040</b>	-	<b>47 (51.6%)</b>	<b>3.74-22.22</b> <b>0.000</b>
<b>Physical state</b>												
<b>Episomal</b>	11 (11.46%)	14 (11.7%)	1** 0.98	2 (11.1%)	1** 1.01	10 (13.16%)	1** 0.83	2 (15.38%)	1** 0.60	-	12 (13.19%)	1** 0.81
<b>Mixed</b>	55 (57.29%)	69 (57.5%)	0.41-2.36 0.978	11 (61.1%)	0.21-5.67 0.910	42 (55.26%)	0.29-2.37 0.731	6 (46.15%)	0.10-3.46 0.564	1 (50.0%)	49 (53.85%)	0.30-2.20 0.686
<b>Integrated</b>	30 (31.25%)	37 (30.8%)	1.12 0.44-2.87 0.808	5 (27.8%)	0.92 0.15-5.51 0.930	24 (31.58%)	0.55 0.18-1.68 0.290	5 (38.46%)	0.63 0.10-3.95 0.621	1 (50.0%)	30 (32.97%)	0.60 0.21-1.73 0.340

\*, Indica la categoría de referencia (Low).

\*\* , Indica la categoría de referencia (Episomal).

OR: Odds ratio ajustado por edad.

Tabla 8. Variantes E6 del VPH 16 y el riesgo de integración del genoma viral en base sitio de rompimiento en el gen E2.

Variants	Physical state E2A				Physical state E2B					
	Episomal N (%)	Mixed N (%)	OR (CI 95%) P	Integrated N (%)	OR (CI 95%) P	Episomal N (%)	Mixed N (%)	OR (CI 95%) P	Integrated N (%)	OR (CI 95%) P
<b>Class E-T350</b>	10 (20%)	<b>21 (42%)</b>	-	<b>19 (38%)</b>	-	<b>19 (39.58%)</b>	12 (25%)	-	17 (35.42%)	-
E-Prototype	10 (23.2%)	<b>19 (44.2%)</b>	1*	14 (32.6%)	1*	<b>17 (39.5%)</b>	12 (27.9%)	1*	14 (32.6%)	1*
<b>Class E-G350</b>	39 (18.06%)	<b>142 (65.74%)</b>	<b>1.94</b> <b>0.83-4.51</b> <b>0.126</b>	<b>35 (16.20%)</b>	<b>0.63</b> <b>0.25-1.61</b> <b>0.335</b>	<b>106 (50.72%)</b>	77 (36.84%)	1.01 0.46-2.25 0.972	26 (12.44%)	0.28 0.12-0.65 0.003
E-G350	21 (16.15%)	<b>88 (67.69%)</b>	2.22 0.90-5.47 0.083	21 (16.15%)	0.71 0.26-1.95 0.505	<b>71 (54.6%)</b>	44 (33.9%)	0.87 0.38-2.01 0.752	15 (11.5%)	0.25 0.10-0.62 0.003
E-A176/G350	7 (41.2%)	<b>9 (52.9%)</b>	0.70 0.20-2.46 0.577	1 (5.9%)	0.10 0.01-0.92 0.039	<b>11 (64.7%)</b>	5 (29.4%)	0.63 0.17-2.31 0.488	1 (5.9%)	0.10 0.01-0.88 0.038
E-C188/G350	3 (7.9%)	<b>25 (65.8%)</b>	<b>4.52</b> <b>1.08-18.89</b> <b>0.039</b>	10 (26.3%)	2.26 0.49-10.47 0.298	<b>17 (44.7%)</b>	12 (31.6%)	0.98 0.34-2.82 0.974	9 (23.7%)	0.59 0.20-1.74 0.335
<b>Class AA-a</b>	1 (2.78%)	<b>35 (97.22%)</b>	<b>19.17</b> <b>2.25-163.19</b> <b>0.007</b>	<b>0 (0.0%)</b>	-	0 (0.0%) <sup>a</sup>	<b>8 (22.22%)</b>	<b>10.99</b> <b>1.21-∞</b> <b>0.033</b>	<b>28 (77.78%)</b>	<b>30.18</b> <b>3.61-∞</b> <b>0.002</b>
AA-a	1 (2.9%)	<b>34 (97.1%)</b>	<b>18.80</b> <b>2.20-160.59</b> <b>0.007</b>	0 (0.0%)	-	0 (0.0%) <sup>a</sup>	<b>8 (22.9%)</b>	<b>11.06</b> <b>1.21-∞</b> <b>0.033</b>	<b>27 (77.1%)</b>	<b>29.10</b> <b>3.48-∞</b> <b>0.002</b>
<b>Class AA-c</b>	2 (9.09%)	<b>17 (77.27%)</b>	4.67 0.88-24.82 0.070	3 (13.64%)	1.01 0.14-7.31 0.996	0 (0.0%) <sup>a</sup>	<b>8 (36.36%)</b>	<b>10.87</b> <b>1.19-∞</b> <b>0.035</b>	<b>14 (63.64%)</b>	<b>14.56</b> <b>1.68-∞</b> <b>0.015</b>
AA-c	1 (5.0%)	<b>17 (85.0%)</b>	<b>9.40</b> <b>1.07-82.36</b> <b>0.043</b>	2 (10.0%)	1.31 0.10-16.80 0.834	0 (0.0%) <sup>a</sup>	<b>8 (40.0%)</b>	<b>11.01</b> <b>1.20-∞</b> <b>0.034</b>	<b>12 (60.0%)</b>	<b>12.74</b> <b>1.46-∞</b> <b>0.021</b>
<b>Class Af2-a</b>	0 (0.0%)	<b>1 (100%)</b>	-	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-	<b>1 (100%)</b>	-

\*, Indica la categoría de referencia.

<sup>a</sup>, Para calcular OR e IC en el estado mixto e integrado de las variantes AA-a y AA-c se generó un caso artificial.

OR: Ajustado por edad.

Table 9. Carga viral y estado físico de las variantes E6 de VPH16 nuevas.

Patient	HPV 16 E6 novel variant	Accession number GenBank	Viral load	E2A/E6 ratio	E2B/E6 ratio	Physic state	Diagnosis/ Sampling year	Follow up Diagnosis/ Year
1	E-A176/G424/G350	KJ465994	69.4714 alta	1.7600	3.3195	Episomal	Cervical carcinoma 2003	-
2	E-C183/G350	KJ465995 cq1130	5.3647 media	0.6174	0.6712	Mixto	Non-IL 2004	LSIL 2006
3	E-C183/G350	KJ465995 th897	5.3275 media	1.1858	0.3808	Mixto	Non-IL 2006	LSIL 2009
4	E-C183/G350	KJ465995 th618	0.0974 baja	0.9188	0.3156	Mixto	Non-IL 2002	-
5	E-C188/G310/G350	KJ465996 cq1367	15.3711 alta	0.7228	-	Mixto	Non-IL 2004	Non-IL 2005
6	E-C188/G310/G350	KJ465996 th1092	0.4964 media	1.3531	1.6726	Episomal	LSIL 2009	LSIL 2012
7	E-G189/T256/G350	KJ465998	3.2736 media	0.7565	0.5808	Mixto	LSIL 2008	LSIL 2009
8	E-C306/G350	KJ465997	0.8641 media	0.5570	0.5979	Mixto	Non-IL 2003	-
9	E-G535/G350	KJ465999	0.1014 baja	0.4332	2.1271	Mixto	LSIL 2006	-
10	AA-a/C188	KJ465992	2.2266 media	0.0939	<b>0.0008</b>	<b>Integrado</b>	Non-IL 1997	-
11	AA-c/G185	KJ465993	2.0058 media	0.8393	<b>0.0002</b>	<b>Integrado</b>	Cervical carcinoma 1998	-

## **Discusión**

Los datos epidemiológicos muestran que las regiones con alta incidencia de CaCU como Latino América, África y Asia, también tienen una alta prevalencia de variantes de los sublinajes AA y Af (Tornesello *et al.*, 2004). También se ha reportado que la distribución geográfica de las variantes intratípicas del VPH 16 y su riesgo de producir CaCU son dependientes de la población (Berumen *et al.*, 2001, Calleja-Macías *et al.*, 2004, Cornet *et al.*, 2013, Yamada *et al.*, 1997, Villa *et al.*, 2000, Tornesello *et al.*, 2004, Tornesello *et al.*, 2011, Cornet *et al.*, 2013). Estudios hechos en México han reportado que el riesgo de producir CaCU es más alto cuando la infección por VPH es causada por variantes del sublinaje AA1 en comparación con las del EUR (Berumen *et al.*, 2001, Casas *et al.*, 1999, Lizano *et al.*, 2009, Lopez-Revilla *et al.*, 2009). En un estudio previo, encontramos las variantes AA-a y AA-c (Illades-Aguiar *et al.*, 2010), las cuales se han propuesto como más oncogénicas que las variantes del sublinaje EUR (Berumen *et al.*, 2001, Richard *et al.*, 2010).

Diversos estudios epidemiológicos y moleculares, han reportado una fuerte asociación de la severidad de una lesión cervical con la carga viral alta (Carcopino *et al.*, 2012, van Duin *et al.*, 2002, Moberg *et al.*, 2005, Gravitt *et al.*, 2007, Xi *et al.*, 2007, Sundstrom *et al.*, 2013, Hamaguchi *et al.*, 2013) y con el estado integrado del genoma del VPH 16 (Ramanakumar *et al.*, 2010, Peitsaro *et al.*, 2002, Kulmala *et al.*, 2006, Cricca *et al.*, 2007). Sin embargo, hay otros más que no han encontrado asociación de la carga viral alta e integración con las lesiones precursoras y CaCU (Arias-pulido *et al.*, 2006, Castle *et al.*, 2005, Briolat *et al.*, 2007, Guo *et al.* 2007, Azizi *et al.*, 2008, Boulet *et al.*, 2009, Xi *et al.*, 2009, Schiffman *et al.*, 2010, manawapat *et al.*, 2012, Cheung *et al.*, 2013, Chang *et al.*, 2013). También se ha sugerido que el rompimiento del gen E2 y la integración del genoma viral no son eventos necesarios para la sobreexpresión de E6 y E7 en todos los casos de CaCU sobre todo en aquellos que carecen de integración (Cheung *et al.*, 2013). Debido a la variabilidad en los resultados de los múltiples estudios enfocados en el estado físico y la carga viral del VPH 16 en CaCU, su papel en la progresión de una LEI cervical hacia CaCU aun no está bien esclarecido. Estudios recientes sugieren que la carga viral y la

integración del VPH 16 pueden verse afectados por la presencia de polimorfismos en el genoma de las variantes de VPH 16 (Cheung et al., 2006, Qiu et al., 2007; Azizi, et al., 2008, Jiang et al., 2009; Tsakogiannis et al., 2012, Cheung et al., 2013). El objetivo del presente estudio fue Investigar que variantes E6 del VPH 16, han circulado en un periodo de 16 años en mujeres del Estado de Guerrero, y analizar su asociación con lesiones precursoras y CaCU, así como, determinar el estado físico y la carga viral del VPH 16, y analizar su asociación con las variantes E6 identificadas, las lesiones precursoras y el CaCU.

De acuerdo al análisis de 330 secuencias del gen E6 del VPH 16 aislado de 97 mujeres sin LEI, 123 con LEIBG, 19 con LEIAG y 91 con CaCU, se encontraron 27 variantes E6, de las cuales las variantes del sublinaje EUR fueron las más comunes seguidas por las variantes del sublinaje AA1. La variante E6 más frecuente fue E-G350 (40%), seguida por la E-Prototipo (13.03%), E-C188/G350 (11.82%), AA-a (10.61%), AA-c (6.07%) y E-A176/G350 (5.15%). A diferencia de otras regiones de Centro y Sudamérica, Norte América, Europa, Asia, Oceanía y África (Tornesello et al., 2011) en el presente se encontró que en el Estado de Guerrero la frecuencia de la variante E-Prototipo es más baja que en el resto del mundo, mientras que la clase E-G350 (62.65%) es más frecuente. Las variantes del sublinaje AA1 fueron hasta 15 veces más prevalentes en CaCU que la E-prototipo. Los estudios sobre variantes de VPH 16 realizados en México han mostrado que aun en el mismo país su distribución difiere dependiendo de la región analizada (Berumen, et al. 2001; Calleja.Macías, et al., 2004; González-Loza, et al., 2004; Lizano, et al., 2009; Illades-Aguilar, et al., 2010). En este estudio, el cual es más grande que los realizados previamente en México, nosotros encontramos que la variante E6 más común en la mayoría de los grados histológicos fue E-G350, excepto en ADC, donde la AA-a fue la más común. Además, este estudio mostró que una infección con la variante AA-a tiene una asociación fuerte con un riesgo alto de desarrollar una LEIAG y CaCU tanto CCE como ADC en comparación con la E-Prototipo. También se observó que una infección con la variante E-A176/G350, AA-c, E-G350 o E-C188/G350 tiene una

fuerte asociación con un riesgo alto de desarrollar CaCU en particular CCE en comparación con la E-Prototipo.

Estudios realizados en los últimos años han sugerido al estado físico y la carga viral del VPH 16 como un marcador de progresión de una infección persistente hasta CaCU, ésto debido a la asociación que han mostrado con lesiones precursoras y CaCU. Sin embargo, la variabilidad de los resultados entre estudios han limitado su uso clínico (Van Duin *et al.*, 2002, Peitsaro *et al.*, 2002; Moberg *et al.*, 2005; Kulmala *et al.*, 2006; Gravitt *et al.*, 2007; Cricca *et al.*, 2007; Fontaine *et al.*, 2008, Xi *et al.*, 2009; Ramanakumar *et al.*, 2010; Xi *et al.*, 2011, Carcopino *et al.*, 2012; Hamaguchi *et al.*, 2013; Sundström *et al.*, 2013, Chang *et al.*, 2013; Shukla, *et al.*, 2014). Diversos estudios han mostrado que las variantes del VPH 16, presentan en su genoma polimorfismos que se traducen en proteínas alteradas que conllevan a diferencias en el potencial oncogénico de cada variante y en el riesgo de producir una LEIAG y CaCU a partir de una infección persistente. En base a este hecho, en años recientes se han realizado estudios epidemiológicos y moleculares enfocados en la identificación de polimorfismos que pudieran tener un efecto positivo o negativo sobre la integración del genoma de VPH 16 al genoma celular, o en la replicación de su genoma, aumentando el riesgo de producir LEIAG o CaCU debido a una alta frecuencia de integración y de carga viral alta. Cheung *et al.*, (2006) en un estudio realizado con variantes de los sublinajes As y EUR del VPH 16, no reportan asociación de la carga viral con las variantes estudiadas, ni con la severidad de la lesión cervical. Sin embargo, ellos reportan que la mayoría de los casos con eliminaciones de fragmentos largos se encuentran en variantes del sublinaje asiático, y que estas variantes se asocian con un riesgo más alto de LEIAG y CCE. En el presente estudio, se encontró que la mayoría de los casos con integración fueron los positivos a variantes del sublinaje AA1 las cuales también se asociaron con un riesgo alto de LEIAG y CaCU. Al igual que Cheung *et al.*, (2006) también encontramos casos de CaCU carentes de integración, nuestros resultados refuerzan la propuesta de que el rompimiento del gen E2 y la integración del genoma no son eventos indispensables para el desarrollo del CaCU (Cheung *et al.*, 2013). La fuerte



asociación de la carga viral media con las variantes E6 y con el CCE y ADC, sugiere que no solo la carga viral más alta juega un papel importante en el potencial oncogénico de las variantes para favorecer la progresión de una LEI cervical hacia CaCU.

Actualmente se sabe que existen varios sitios de rompimiento distribuidos en todo el genoma de VPH 16, con excepción de los genes E7, E5 y la región URR. Sin embargo, Li, *et al.*, (2013) y Vega-Peña *et al.*, (2013) reportan que los sitios ubicados en el gene E2 y en la región de traslape E2/E4 han mostrado mayor asociación con CaCU y lesiones precursoras, por lo que se sugiere que el rompimiento del genoma del VPH 16 y su integración no son eventos aleatorios (Li *et al.*, 2013). Basados en la amplificación de dos fragmentos del gen E2 ubicados en las regiones que codifican para el dominio de transactivación y la región de bisagra de la proteína E2 del VPH 16, los cuales incluyen sitios de rompimiento del genoma previamente reportados (Kalantari *et al.*, 2001, Arias-pulido *et al.*, 2006, Cheung *et al.*, 2006, Azizi *et al.*, 2008, Dall *et al.*, 2008, Collins *et al.* 2009, Tsakogiannis, *et al.*, 2012), nosotros observamos que cuando el genoma viral se rompe en la región del dominio de transactivación, la frecuencia del estado integrado es baja todas las variantes del VPH 16. Sin embargo, cuando el genoma viral se rompe en la región de bisagra, el estado integrado predomina en las variantes del sublinaje AA1 (incluidas las variantes nuevas) mostrando una fuerte asociación del estado integrado con las variantes AA-a y AA-c. Estos resultados sugieren que el sitio de rompimiento del genoma viral y la integración dependen de la variante E6 del VPH 16. Estos resultados se relacionan con lo reportado por Tsakogiannis *et al.*, (2012), donde ellos reportan que la variación de nucleótidos en el gen E2 ocurre principalmente en las regiones que codifican la región de bisagra y el dominio de transactivación, las cuales han sido reportadas como las regiones donde el genoma viral se rompe e integra con mayor frecuencia (Arias-Pulido *et al.*, 2006, Collins *et al.*, 2009). Además, también reportan que la variación de nucleótidos específicos se asocia con las variantes de los sublinajes AFR1, AFR2 y AA, y sugieren que las variaciones en E2 podrían estar involucradas en mecanismos alternativos para desregular la expresión

de los oncogenes E6 y E7. Por lo tanto, la variación genética en el gen E2 podría ser una de las razones por las cuales el rompimiento del genoma viral y su integración al genoma celular varían entre las variantes E6 como lo muestran las altas frecuencias del estado físico integrado en las variantes del sublinaje AA1 (AA-c y AA-a) en comparación con las variantes del sublinaje EUR, principalmente cuando el rompimiento del genoma ocurre en la región de bisagra. Además, el mismo patrón se observó en los 11 casos con nuevas variantes identificadas, cuando el rompimiento del genoma ocurrió en la región de bisagra. En este pequeño grupo de casos, también observamos que las nuevas variantes pertenecientes al sublinaje EUR presentaron un estado físico mixto en su mayoría, mientras que las pertenecientes al sublinaje AA1 presentaron un estado integrado. A pesar de que no encontramos asociación del estado físico integrado con el CaCU, éste estudio demuestra que las variantes del VPH 16 son un factor importante que contribuye a las diferencias en la carga viral y estado físico del genoma del VPH 16, como lo sugieren estudios previos (Cheung *et al.*, 2006, Qiu *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2013, Shukla *et al.*, 2014).

En conclusión, nuestros resultados muestran que en 16 años, al menos 27 variantes E6 del VPH 16 estuvieron presentes en Guerrero. Ocho de las cuales fueron variantes nuevas y pueden ser consideradas como variantes específicas de esta región mexicana. Las variantes más frecuentemente encontradas en mujeres con CaCU son E-G350, AA-a, AA-c, E-C188/G350 y E-A176/G350. Todas se asociaron con el desarrollo de CaCU. La variante AA-a presentó la asociación más alta y además fue la única que presentó asociación con LEIAG. Todas las variantes que mostraron un riesgo alto de CaCU (AA-a, E-A176/G350, AA-c, E-G350 y E-C188/G350), también mostraron asociación con la carga viral media y alta. La frecuencia de la carga viral alta incrementa a medida que aumenta la severidad de la lesión en la carcinogénesis cervical mediada por VPH 16. El estado mixto fue más frecuente en las variantes del sublinaje EUR, sin embargo solo la variante E-G350 mostró asociación estadísticamente significativa ( $p=0.032$ ). El estado integrado fue más frecuente en las variantes del sublinaje AA1, sin embargo solo la variante AA-a

mostró asociación estadísticamente significativa ( $p=0.018$ ). Las variantes del sublinaje AA1 mostraron una fuerte asociación con la integración debida al rompimiento del gen E2 en la región de bisagra. Para determinar el estado físico del genoma del VPH 16 es necesario utilizar una sonda dirigida a la región de bisagra y otra dirigida a la región que codifica el dominio de transactivación de la proteína E2. La eliminación del gen E2 del VPH 16 para la integración de su genoma no fue necesaria en un número considerable de casos de CaCU. Este estudio muestra que la carga viral alta y la integración del genoma de la variante AA-a representa un alto riesgo oncogénico para la progresión del CACU en México. Este representa el estudio más grande realizado en México, analizando el estado físico, la carga viral y las variantes europeas y no europeas en el espectro completo de la enfermedad, desde citología sin lesión intraepitelial hasta CaCU incluyendo CCE y ADC. Además, estos datos serán útiles para entender la relación de la carga viral y el estado físico con las variantes E6 del VPH 16 en la progresión de la enfermedad, contribuirá a mejorar el diagnóstico integral utilizando tecnología molecular, la toma de decisiones respecto al seguimiento y diseño de estrategias terapéuticas individualizadas para los pacientes con cáncer cervical asociado al VPH 16. Sin embargo se requiere de más estudios que analicen la patogenicidad de las variantes E6 del VPH 16.

## Referencias

Arias-Pulido, H., Peyton, C. L., Joste, N. E., Vargas, H. & Wheeler, C. M. (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*, 44, 1755-62.

Azizi, N., Brazete, J., Hankins, C., Money, D., Fontaine, J., Koushik, A., *et al.*, (2008). Influence of human papillomavirus type 16 (HPV- 16) E2 polymorphism on quantification of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of General Virology*, 89(7), 1716-1728.

Bernard, HU., Burk, RD., Chen, Z., van Doorslaer, K., zurHausen, H., and de Villiers, EM. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70-79.

Bernard, HU., Calleja-Macías, IE., and Dunn, ST. (2006). Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118(1), 1071-1076.

Berumen, J., Ordoñez, RM., Lazcano, E., Salmerón, J., Galván, SC., Estrada, RA., *et al.*, (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(17), 1325-1330.

Boulet, GAV., Horvath, CAJ., Berghmans, S., and Bogers, J. (2008). Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 17(4), 810-817.

Burk, RD, Chen, A., Harari, BC., Smith, BJ., Kocjan, PJ., and Maver, MP. (2011). Classification and nomenclature system for human alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenerol. Alp. PanonicaAdriat.* 20:113–123.

Calleja-Macías, IE., Kalantari, M., Huh, J., Ortiz-López, R., Rojas-Martínez, A., Gonzalez-Guerrero, JF., *et al.*, (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, 315-323.

Carcopino X, Henry M, Mancini J, Giusiano S, Boubli L, Olive D, Tamalet C, (2012). Significance of HPV 16 and 18 Viral Load Quantitation in Women Referred for Colposcopy. *J Med Virol*, 84(2): 306-313.

Casas, L., Galván, SC., Ordoñez, RM., López, N., Guido, M., and Berumen, J. (1999). Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *International Journal of Cancer*, 83(4), 449–455.

Chang, L., He, X., Yu, G., and Wu, Y., (2013). Effectiveness of HPV 16 Viral Load and the E2/E6 Ratio for the Prediction of Cervical Cancer Risk Among Chinese Women. *J. Med. Virol.* 85:646-654.

Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., De Salle, R., Anastos, k., Segondy, M., *et al.*, (2011, Mayo). Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *Plos One*, 6(5).

Cheung, J. L., Lo, K. W., Cheung, T. H., Tang, J. W. & Chan, P. K. (2006) Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis*, 194, 1706-12.

- Cheung JL, Cheung TH, Yu MY, Chan PK, (2013). Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. *Gynecol Oncol*, 131(2): 374-379.
- Clifford, GM., Smith, JS., Plummer, M., Muñoz, N., and Franceschi, S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 88(1), 63-73.
- Collin, SI., Constandinou-Williams, C., Wen, K., Young, LS., Roberts, S., Murray, PG., *et al.*, (2009). Disruption of the E2 Gene Is a Common and Early Event in the Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection: A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Research*, 69(9), 3828-3832.
- Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk RD., *et al.*, and the IARC HPV Variant Study Group. (2012) Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal of Virology* 86 (12), 6855-6861.
- Cornet, I., Gheit, T., Lannacone MR., Vignat, J., Sylla B S., *et al.*, and the IARC HPV Variant Study Group. (2013) HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *British Journal of Cancer*. 108. 240-244.
- Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M (2009). Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods*, 158(1-2):180-3.
- Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, Winder DM, Stanley MA, Muralidhar B, Herdman MT, Pett MR, Coleman N (2008). Characterization of Naturally Occurring HPV16 Integration Sites Isolated from Cervical Keratinocytes under Noncompetitive Conditions. *Cancer Res*, 68(20): 8249-8259.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, and zurHausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, (2013). *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11* [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 15/01/2014.
- Fontaine J, Hankins C, Money D, Rachlis A, Pourreaux K, Ferenczy A (2008). Canadian Women's HIV Study Group, Coutlée F. (2008). Human papillomavirus type 16 (HPV-16) viral load and persistence of HPV-16 infection in women infected or at risk for HIV. *J Clin Virol*, 43(3): 307-312.
- Garnett, TO., and Duerksen-Hughes, PJ. (2006). Modulation of Apoptosis by Human Papillomavirus (HPV) Oncoproteins. *Archives of Virology*, 151(12), 2321-2335.
- Gobierno del Estado de Guerrero. Plan Estatal de Desarrollo del Estado de Guerrero 2011-2015. 185.
- González-Losa, MDR., Laviada Mier y Teran, M.A., Puerto-Solís, M., and García-Carrancá, A., (2004). Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *Journal Clinical of Virology*. 29, 95-98.
- Gottschling, M., Stamatakis, A., Nindl, I., Stockfleth, E., Alonso, A., and Bravo iG. (2007). Multiple Evolutionary Mechanisms Drive Papillomavirus Diversification. *Molecular Biology and Evolution*, 24(5), 1242-1258.
- Gravitt, PE., Kovacic, MB., Herrero, R., Schiffman, M., Bratti, C., Hildesheim, A., *et al.*, (2007). High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *International Journal Cancer*, 121(12), 2787-2793.

Greco, D., Kivi, N., Qian, K., Leivonen, SK., Auvinen, P., and Auvinen E. (2011, Julio). Human Papillomavirus 16 E5 Modulates the Expression of Host MicroRNAs. *Plos One*, 6 (7).

Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., de Sanjose, S., Franceschi, S. and Clifford, GM. (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer* 131:2349–2359

Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H. (2013). Initial Viral Load in Cases of Single Human Papillomavirus 16 or 52 Persistent Infection Is Associated With Progression of Later Cytopathological Findings in the Uterine Cervix. *J Med Virol*, 85(12): 2093-100.

Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, DC., Moreno, P., Murillo, R., Bravo, MM., Villa, L., *et al.*, (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology*, 410(1), 201-215.

Illades-Aguilar, B., Alarcón-Romero, LC., Antonio-Véjar, V., Zamudio-López, N., Sales-Linares, N., Flores-Alfaro, E., *et al.*, (2010). Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecologic Oncology*, 117(2), 291-296.

Jeon, S., Allen-Hoffmann, BL and Lambert, PF. (1995). Integration of Human Papillomavirus Type 16 into the Human Genome Correlates with a Selective Growth Advantage of Cells. *J. Virol.* 69(5), 2989-2997.

Jiang, M., Baseman, JG., Koutsky, LA., Feng, Q., Mao, C., Kiviat, NB., *et al.*, (2009). Sequence Variation of Human Papillomavirus Type 16 and Measurement of Viral Integration by Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3), 521-526.

Kalantari, M., Karlsen F., Kristensen, G., Holm, R., Hagmar, B., Johansson, B., (1998). Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol*, 17(2): 146-153.

Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001): Physical State of HPV16 and Chromosomal Mapping of the Integrated Form in Cervical Carcinomas. *Diagn Mol Pathol*, 10(1): 46-54.

Kim, YM., Park, JY., Lee, KM., Kong, TW., Yoo, SC., Kim.WY., *et al.*, (2008). Does pretreatment HPV viral load correlate with prognosis in patients with early stage cervical carcinoma? *Journal of Gynecologic Oncology*, 19(2), 113-116.

Koshiol, J., Lindsay, L., Pimenta, JM., Poole, C., Jenkins, D., and Smith, JS. (2007). Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology*, 168(2), 123-137.

Koskimaa, HM., Kurvinen, K., Costa, S., Syrjänen, K., and Syrjänen, S. (2010). Molecular Markers Implicating Early Malignant Events in Cervical Carcinogenesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 19(8), 2003-2012.

Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, Syrjänen KJ, Johansson BC (2006). Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*, 59(5): 513-517.

Lacruz C., (2003). Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolaou a Bethesda 2001). *Rev Esp Patol*, 36: 5-10.

- Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM (2011). 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): 927-935.
- Li H, Yang Y, Zhang R, Cai Y, Yang X, Wang Z, Li Y, Cheng X, Ye X, Xiang Y, Zhu B. (2013). Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *J. Clin Virol.* 56(4):342-347.
- Lizano, M., Berumen, J., and García Carranca, A. (2009). HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants. *Archives of Medical Research*, 40(6), 428-434.
- López-Revilla, R., Pineda, MA., Ortíz-Valdez, J., Sánchez-Garza, M., and Riego, L. (2009). Human papillomavirus type 16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosi City, Mexico. *Infectious Agents and Cancer*, 4(3).
- López-Saavedra, A., y Lizano-Soberón, M. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1(1), 31-55.
- Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. (2005). High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer*, 92(5): 891-894.
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. (2004), Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 78(21):11451-11460.
- Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de González A, and Gissmann L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24S3(S3), S3/1-10.
- Narisawa-Saito, Mako, and TohruKiyono. "Basic Mechanisms of High-risk Human Papillomavirus-induced Carcinogenesis: Roles of E6 and E7 Proteins." *Cancer Science* 98, no. 10 (October 2007): 1505–1511. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00546
- Peitsaro, P., Johansson, B. and Syrjänen S. (2002). Integrated human papilloma virus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *Journal Of Clinical Microbiology*. 40(3).886–891.
- Qiu AD, Wu EQ, Yu XH, Jiang CL, Jin YH, Wu YG, Chen Y, Chen Y, Shan YM, Zhang GN, Fan Y, Zha X, Kong W (2007). HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China. *Gynecol Oncol*, 104(1): 77-85.
- Ramanakumar AV, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, Franco EL (2010). Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect Dis*, 10:326.
- Richard, C., Lanner, C., Naryzhny, SN., Sherman, L., Lee, H., *et al.* (2010). The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene*, 29 (23). 3435-3445.
- Rogers, A., Waltke, M., and Angeletti, PC. (2011). Evolutionary variation of papillomavirus E2 protein and E2 binding sites. *Virology Journal*, 8(379).
- Schiffman, M., Rodríguez, AC., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., *et al.*, (2010). A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia. *Cancer Research*, 70(8), 3159-3169.

- Seedorf, K., Krämmer, G., Dürst, M., Suhai, S., Röwekamp, W.G., (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145, 181–185.
- Smith, B., Chen, Z., Reimers, L., Doorslaer, K., Schiffman, M., DeSalle, R., *et al.* (2011). Sequence Imputation of HPV16 Genomes for Genetic Association Studies. *PLoS ONE*, 6(6).
- Shukla S, Mahata S, Shishodia G, Pande S, Verma G, Hedau S, Bhambhani S, Kumari A, Batra S, Basir SF, Das BC, Bharti AC. (2014). Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. *Indian J Med Res*, 139(4):531-543.
- Sundström K, Ploner A, Dahlström LA, Palmgren J, Dillner J, Adami HO, Ylitalo N, Sparén P. (2013). Prospective study of HPV16 viral load and risk of in situ and invasive squamous cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 22(1):150-158.
- Taylor, ER., Dornan, ES., Boner, W., Connolly, JA., McNair, S., Kannouche, P., *et al.* (2003). The Fidelity of HPV16 E1/E2-mediated DNA Replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52223-52230.
- Theelen, W., Speel, EJM., Herfs, M., Reijans, M., Simons, G., Meulemans, EV., *et al.*, (2010). Increase in Viral Load, Viral Integration, and Gain of Telomerase Genes during Uterine Cervical Carcinogenesis can be Simultaneously Assessed by the HPV 16/18 MLPA-Assay. *The American Journal of Pathology*, 177(4), 2022-2033.
- Tonon SA, Picconi MA, Bos PD, Zinovich JB, Galuppo J, Alonio LV, Teyssie AR (2001). Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol*, 21(2):129-34.
- Tornesello, ML., Duraturo, ML., Salatiello, I., Buonaguro, L., Losito, S., Botti, G., *et al.*, (2004). Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Journal of Medical Virology*, 74(1), 117-126.
- Tornesello, ML., Losito, S., Benincasa, G., Fulciniti, F., Botti, G., Greggi, S., *et al.*, (2011). Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology*, 121(1), 32-42.
- Tsakogiannis, D., Ruether, I., Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., Theoharopoulou, A., Skordas, V., Panotopoulou, E., Nepka, C. & Markoulatos, P. (2012) Sequence variation analysis of the E2 gene of human papilloma virus type 16 in cervical lesions from women in Greece. *Arch Virol*, 157, 825-32.
- Tungteakkhum, SS., Filippova, M., Neidigh, JW., Fodor, N., and Duerksen-Hughes, PJ. (2008) The Interaction between Human Papillomavirus Type 16 and FADD Is Mediated by a Novel E6 Binding Domain. *J. Virol*. 82(19), 9600 – 9614.
- Van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, *et al.*, (2002) Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *International Journal of Cancer*. 98: 590-595.
- Vega-Pena, A., Illades-Aguiar, B., Flores-Alfaro, E., Lopez-Bayghen, E., Leyva-Vazquez, M. A., Castaneda-Saucedo, E. & Alarcon-Romero Ldel, C. (2014) Risk of progression of early cervical lesions is associated with integration and persistence of HPV-16 and expression of E6, Ki-67, and telomerase. *J Cytol*, 30, 226-32.
- Villa, LL., Sichero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T. and Franco EL. (2000) Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology* 81: 2959–2968.



Woodman CBJ, Collins SI, Young L.S., (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer* 7, 11–22.

Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, *et al.* (2007). Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 4-10.

Xi LF, Hughes JP, Edelstein ZR, Kiviat NB, Koutsky LA, Mao C, Ho J, Schiffman M. (2009). Human Papillomavirus (HPV) Type 16 and Type 18 DNA Loads at Baseline and Persistence of Type-Specific Infection during a 2-Year Follow-Up. *J Infect Dis*, 200(11): 1789-1797.

Xi LF, Hughes JP, Castle PE, Edelstein ZR, Wang C, Galloway DA, Koutsky LA, Kiviat NB, Schiffman M. (2011). Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Infection: A Nested Case–Control Study. *J Infect Dis*, 203(10):1425-33.

Yamada, T., Manos, MM., Peto, J., Greer, C., Muñoz, N., Bosh, FX., *et al.*, (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology*, 71(3), 2463-2472.

Zheng, ZM., and Baker, CC. (2006). Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *Front Biosci*, 11(1), 2286-2302.

Zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342–350.

*“Everybody is a genius. But if you judge a fish by its ability to climb a tree,  
it will live its whole life believing that it is stupid.”*