

Título del artículo.

Asociación de la carga viral de las variantes E6 del VPH 16 con la presencia de lesiones precancerosas y cáncer cérvico uterino en Guerrero, México.

Título del artículo en idioma Inglés.

Association of viral load of E6 variants of VPH 16 with presence of precancerous lesions and cervical cancer in Guerrero, Mexico.

Autores.

Julio Ortiz-Ortiz
Oscar Del Moral-Hernández
Miguel Ángel Mendoza-Catalán
Marco Antonio Leyva-Vázquez
José Guadalupe Muñoz Camacho
Marco Antonio Jiménez-López
Víctor Hugo Garzón-Barrientos
Luz del Carmen Alarcón-Romero
Berenice Illades-Aguilar

Referencia bibliográfica:

MLA

Ortiz-Ortiz, Julio, Oscar Del Moral-Hernández, Miguel Ángel Mendoza-Catalán, Marco Antonio Leyva-Vázquez, José Guadalupe Muñoz Camacho, Marco Antonio Jiménez-López, Víctor Hugo Garzón-Barrientos, Luz del Carmen Alarcón-Romero, Berenice Illades-Aguilar. "Asociación de la carga viral de las variantes E6 del VPH 16 con la presencia de lesiones precancerosas y cáncer cérvico uterino en Guerrero, México". *Tlamati* 8.2 (2017): 5-11. Print.

APA

Ortiz-Ortiz, J., Del Moral-Hernández, O., Mendoza-Catalán, M. A., Leyva-Vázquez, M. A. Muñoz Camacho, J. G., Jiménez-López, M. A., Garzón-Barrientos, V. H., Alarcón-Romero, L. del C. e Illades-Aguilar, B. (2017). Asociación de la carga viral de las variantes E6 del VPH 16 con la presencia de lesiones precancerosas y cáncer cérvico uterino en Guerrero, México. *Tlamati*, 8(2), 5-11.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Diciembre del 2017

© 2017 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Asociación de la carga viral de las variantes E6 del VPH 16 con la presencia de lesiones precancerosas y cáncer cérvico uterino en Guerrero, México

Julio Ortiz-Ortiz^{1*}
Oscar Del Moral-Hernández¹
Miguel Ángel Mendoza-Catalán¹
Marco Antonio Leyva-Vázquez¹
José Guadalupe Muñoz Camacho²
Marco Antonio Jiménez-López²
Víctor Hugo Garzón-Barrientos²
Luz del Carmen Alarcón-Romero³
Berenice Illades-Aguilar¹

¹Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Laboratorio de Biomedicina Molecular. Av. Lázaro Cárdenas s/n. C.U. Zona Sur. C. P. 39070. Chilpancingo, Guerrero, México.
Tel: + (52) 747-1066-864

²Instituto Estatal de Cancerología "Dr. Arturo Beltrán Ortega", Ginecología Oncológica, Acapulco, Guerrero, México.

³Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Laboratorio de Citopatología.

*Autor de correspondencia
julio338@hotmail.com

Resumen

El propósito del estudio fue determinar la carga viral de las variantes E6 de VPH 16 y su asociación con la presencia de lesiones precancerosas y Cáncer Cérvico Uterino [CaCU] en mujeres guerrerenses. Se amplificó por PCR el gen E6 del VPH 16 en 66 muestras de DNA provenientes de mujeres sin LEI, 87 con LEIBG, 13 con LEIAG y 73 con CaCU; los productos amplificados fueron secuenciados, para identificar las variantes E6 del VPH 16 mediante comparación con la secuencia de referencia (VPH 16R). Se clasificaron en linajes, sublinajes, clases y subclases. La carga viral se determinó cuantificando el número de copias del gen de la RNAsa P y del gen E6 mediante qPCR con tecnología de sondas TaqMan. La asociación entre la carga viral de las variantes y la presencia de lesiones precancerosas y CaCU se determinó mediante el cálculo de frecuencias y OR. De 239 pacientes incluidas en el estudio 105 tuvieron la variante E-G350 (43.93%), 35 la E-Prototipo (14.64%), 32 la E-C188/G350 (13.39%), 32 la AA-a (13.39%), 19 la AA-c (7.95%) y 16 la E-A176/G350 (6.69%). Se encontró asociación significativa entre CaCU y las variantes AA-a (OR=41.24, IC=4.47-380.28), E-A176/G350 (OR=21.45, IC=2.14-214.27), AA-c (OR= 11.87, IC=1.42-99.50), E-G350 (OR=9.56, IC=1.41-64.94) y con la carga viral alta (OR=2.31, IC=1.17-4.56). La asociación significativa CaCU con la carga viral alta y las variantes E-G350, E-A176/G350, AA-a y AA-c, sugiere que la determinación de la carga viral y las variantes en conjunto podría tener una utilidad clínica importante en el desarrollo de estrategias para el control de infecciones por VPH y la prevención de CaCU.

Palabras clave: Carga viral, variantes E6 de VPH 16, CaCU.

Como citar el artículo:

Ortiz-Ortiz, J., Del Moral-Hernández, O., Mendoza-Catalán, M. A., Leyva-Vázquez, M. A. Muñoz Camacho, J. G., Jiménez-López, M. A., Garzón-Barrientos, V. H., Alarcón-Romero, L. del C. e Illades-Aguilar, B. (2017). Asociación de la carga viral de las variantes E6 del VPH 16 con la presencia de lesiones precancerosas y cáncer cérvico uterino en Guerrero, México. *Tlamati*, 8(2), 5-11.

Abstract

Purpose of the study was to determine the viral load of E6 variants of VPH 16 and its association with presence of precancerous lesions and Cervical Uterine Cancer [CaCU] in women from the State of Guerrero, México. The E6 from VPH 16 gene was amplified by PCR in 66 DNA samples from women without LEI, 87 with LEIBG, 13 with LEIAG and 73 with CaCU; amplified products were sequenced, to identify E6 variants from VPH 16 by comparison with the reference sequence (VPH 16R). They were classified into lineages, sublineages, classes and subclasses. Viral load was determined quantifying the number of copies of RNase P gene and E6 gene by qPCR with TaqMan probe technology. Association between viral load of variants and presence of precancerous lesions and CaCU was determined calculating frequencies and OR. Of 239 patients included in this study, 105 had variant E-G350 (43.93%), 35 E-Prototype (14.64%), 32 E-C188 / G350 (13.39%), 32 AA-a (13.39%), 19 AA-c (7.95%) and 16 E-A176 / G350 (6.69%). A significant association was found between CaCU and the AA-a variants (OR = 41.24, CI = 4.47-380.28), E-A176 / G350 (OR = 21.45, CI = 2.14-214.27), AA-c (OR = 11.87, CI = 1.42-99.50), E-G350 (OR = 9.56, CI = 1.41-64.94) and with high viral load (OR = 2.31, CI = 1.17-4.56). Significant association of CaCU with high viral load and variants E-G350, E-A176 / G350, AA-a and AA-c, suggests that determination of viral load and variants as a whole could have an important clinical utility in development of strategies for control of infections by HPV and the prevention of CaCU.

Keywords: Viral load, E6 variants of HPV 16, CaCU

Introducción

El Virus del Papiloma Humano tipo 16 [VPH 16] se detecta en más del 50% de los casos de cáncer cérvico uterino [CaCU] (Li, Franceschi, Howell-Jones, Snijders y Clifford, 2011), siendo el más prevalente a nivel mundial en este tipo de cáncer (Guan, Howell-Jones, Li, Bruni, de Sanjose, Franceschi y Clifford 2012). Sin embargo, las causas por las que solo un pequeño porcentaje de lesiones asociadas a VPH16 progresan a cáncer aun no están totalmente esclarecidas. Diversos estudios han relacionado dicha progresión con la carga viral (Xi, Hughes, Castle, Edelstein, Wang, Galloway, Koutsky, Kiviat y Schiffman, 2011; Carcopino, Henry, Mancini, Giusiano, Boubli, Olive, Tamalet, 2012; Sundström, Ploner, Dahlström, Palmgren, Dillner, Adami, Ylitalo y Sparén, 2013; Hamaguchi, Miura, Abe, Kinoshita, Miura, Yamasaki, Yoshiura y Masuzaki, 2013) el estado físico del genoma viral y la variabilidad genética del VPH 16 (Berumen, Ordoñez, Lazcano, Salmerón, Galván, Estrada, Yunes, et al., 2001; Zuna, Moore, Shanesmith, Dunn, Wang, Schiffman, Blakey y Teel, 2009; Gheit, Cornet, Clifford, Iftner, Munk, Tommasino, Kjaer, 2011; Cornet, Gheit, Franceschi, Vignat, Burk, Sylila, Tommasino y Clifford, 2012).

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, Hankins, Monney, Rachlis, Pourreaux y Ferenczy, 2008; Xi, Hughes, Edelstein, Kiviat, Koutsky, Mao, Ho, Schiffman, et al., 2009), lesiones precancerosas (Xi, 2011) y cáncer invasivo (Moberg, Gustavsson, Wilander y Gyllensten, 2005). Por otro lado, estudios realizados en México reportan 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 las del E, provocando un mayor riesgo de desarrollar CaCU (Berumen et al. 2001, Lizano, Berumen y García-Carranca, 2009, Illades-Aguar, Alarcón-Romero, Antonio-Véjar, Zamudio-López, Sales-Linares, Flores-Alfaro, Fernández-Tilapa, et al., 2010). También se ha reportado que las variantes del sublinaje AA generan un alto número de copias virales en células infectadas, sugiriendo que estas variantes se replican más rápido que las europeas (Casas, Galván, Ordoñez, López, Guido y Berumen, 1999) favoreciendo la progresión de una lesión precancerosa a cáncer cervical invasivo. Por el contrario, otros

Tabla 1. Iniciadores y sondas para PCR en tiempo real.

Gen blanco	Iniciador o sonda	Secuencia	Ubicación
E6 de VPH 16	Iniciador sentido	5'- ACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTA-3'	385 – 413
	Iniciador antisentido	5'- GCTTTTTGTCCAGATGTCTTTGCTT-3'	446 – 470
	Sonda	5' FAM- AAAGCCACTGTGTCCTG-NFQ-3'	424 – 440
RNAsa P	Iniciador sentido	5'- AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'	5541 – 5559
	Iniciador antisentido	5'- GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'	5590 – 5600
	Sonda	5' VIC -TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1-3'	5570 – 5580

Tabla 2. Variación en la secuencia de nucleótidos en el gen E6 de VPH 16 y los cambios de aminoácidos que generan en la oncoproteína E6.

	Posición de los cambios de nucleótidos en E6																										
Variante	1	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	Cambio de aminoácido
	0	1	3	3	4	4	7	8	8	8	8	8	5	5	7	8	8	0	1	3	5	0	2	4	3	3	
	9	0	1	2	3	5	6	2	3	5	8	9	6	7	1	6	9	6	0	5	0	3	4	2	2	5	
VPH 16R	T	C	A	G	C	G	G	A	T	T	G	A	C	G	T	T	A	A	C	C	T	A	A	A	A	A	
E-Prototipo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin cambios
E-G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	L83V
E-A176/G350	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	D25N/L83V
E-C188/G350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	E29Q/L83V
AA-a	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	G	-	-	T	G	-	-	-	g	-	Q14H/H78Y/L83V
AA-c	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	-	-	-	-	-	a	G	-	-	T	G	-	-	-	g	-	Q14H/I27R/H78Y /L83V

Las letras mayúsculas representan polimorfismos que generan cambios de aminoácidos. Las letras minúsculas representan polimorfismos que no generan cambios de aminoácidos.

estudios no han encontrado asociación entre la carga viral alta y las lesiones precancerosas y CaCU (Arias-Pulido, Peyton, Joste, Vargas y Wheeler, 2006; Guo, Sneige, Silva, Jan, Cogdell, Lin, Luthra y Zhang, 2007; Azizi, Braze, Hankins, Money, Fontaine, Koushik, Rachlis et al., 2008; Boulet, Benoy, Depuydt, Horvath, Aerts, Hens, Verreeken y Bogers, 2009; Schiffman, Rodríguez, Chen, Wacholder, Herrero, Hildesheim, Desalle et al., 2010; Manawapat, Stubenrauch, Russ, Munk, Kjaer e Iftner, 2012; Chang, He, Yu y Wu, 2013). Hasta la fecha, son pocos los estudios enfocados en el análisis de la carga viral de las variantes E6 del VPH 16 y su asociación con la presencia de lesiones precancerosas y CaCU. El propósito del trabajo fue determinar si la carga viral es diferente entre las variantes E6 de VPH 16 identificadas, y hay asociación significativa con la presencia de lesiones precancerosas y

CaCU en mujeres del Estado de Guerrero.

Materiales y Métodos

Muestras

Un total de 239 muestras positivas al DNA del VPH 16 obtenidas de raspados cervicales y biopsias de mujeres residentes del estado de Guerrero, fueron incluidas en el análisis comparativo. Sesenta y seis sin lesión escamosa intraepitelial (sin LEI), 87 con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), 13 con lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) y 73 con CaCU, 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

Tabla 3. Clasificación y frecuencia de las variantes E6 de VPH16 identificadas en mujeres guerrerenses.

Linaje	Sublinaje	Clase	Subclase	Frecuencia N	%
Europea-Asiática	Europea (E)	E-T350	E-Prototipo	35	14.64%
			E-G350	105	43.93%
		E-G350	E- A176/G350	16	6.69%
			E-C188/G350	32	13.39%
Asiático-Americana/ Norte-americana	Asiático Americana 1	AA-a	AA-a	32	13.39%
		AA-c	AA-c	19	7.95%
Total				239	100%

De acuerdo a Cornet et al., 2012 y Huertas et al., 2011, las variantes se clasificaron en linajes, sublinajes, clases y subclases

Tabla 4. Variantes E6 de VPH16 asociadas al tipo de lesión.

Variantes	Sin LEI N (%)	LEIBG N (%)	OR (CI 95%) P	LEIAG N (%)	OR (CI 95%) P	CaCU N (%)	OR (CI 95%) P
E-Prototipo	12 (34.3%)	20 (57.1%)	1*	1(2.9%)	1*	2 (5.7%)	1*
E-G350	31(29.5%)	41(39.1%)	0.79 0.33-1.90 0.61	4(3.8%)	1.55 0.16-15.27 0.71	29(27.6%)	9.56 1.41-64.94 0.02
E-A176/G350	3(18.8%)	5(31.2%)	1.21 0.24-6.16 0.81	1(6.2%)	4.07 0.19-86.23 0.37	7(43.8%)	21.45 2.15-214.27 0.009
E-C188/G350	11(34.4%)	9(28.1%)	0.60 0.19-1.93 0.39	4(12.5%)	4.46 0.42-47.13 0.21	8(25.0%)	4.74 0.61-37.13 0.14
AA-a	3(9.4%)	9(28.1%)	2.1 0.46-9.57 0.34	2(6.3%)	8.14 0.53-123.99 0.13	18(56.3%)	41.24 4.47-380.28 0.001
AA-c	6(31.6%)	3(15.8%)	0.38 0.08-1.88 0.24	1(5.3%)	2.04 0.11-39.21 0.64	9(47.4%)	11.87 1.42-99.50 0.02

*Categoría de referencia (E-Prototipo). Ajustado por edad

Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”. El diagnóstico citológico fue realizado con base a la clasificación del sistema Bethesda (Secretaría de salud, 2007). El diagnóstico histológico fue realizado de acuerdo al sistema de clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). El DNA del VPH 16 fue detectado 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-Aguir 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. Las variantes E6 del VPH 16, fueron identificadas en cada muestra mediante el análisis de las secuencias (Illades-Aguir et al., 2010). Las variantes identificadas fueron clasificadas en tres linajes EAS, AA/NA y

AFR2 con sus respectivos sublinajes (Cornet et al., 2012). Los sublinajes fueron a su vez estratificados en clases y subclases (Huertas-Salgado, Martín-Gómez, Moreno, Murillo, Bravo, Villa y Molano, 2011).

Determinación de la carga viral de las variantes E6 del VPH16

La carga viral de cada variante, fue determinada por PCR en tiempo real amplificando el gen de copia única RNAsa P y el gen E6 del VPH 16 usando iniciadores y sondas TaqMan específicos (véase tabla 1). Los iniciadores y sondas fueron diseñados tomando en cuenta los polimorfismos presentes en el gen E6 de las variantes E6 del VPH 16 previamente identificadas. La PCR para ambos genes fue realizada en un volumen final de reacción de 10 µl, la cual contenía; 50 ng de DNA en 2 µl, 5 µl de universal master mix II, y 0.5 µl de una mezcla de iniciadores y sondas utilizando el equipo 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

Tabla. 5. Carga viral de las variantes E6 del VPH 16.

Variante	N=239	(%)	Carga viral (Copias/Célula)		
			Min-Max	Media±DS	Valor de p*
E-Prototipo	35	14.64%	0.000-105.566	6.942±21.271	1**
E-G350	105	43.93%	0.000-470.804	33.792±93.297	0.041
E-A176/G350	16	6.69%	0.001-663.491	52.165±164.268	0.396
E-C188/G350	32	13.39%	0.017-392.000	32.158±84.002	0.012
AA-a	32	13.39%	0.020-513.344	48.078±104.951	0.000
AA-c	19	7.95%	0.010-354.157	41.521±96.887	0.060

*Prueba de Kruskal-Wallis **Categoría de comparación

Tabla 6. Variantes E6 de VPH16 y su relación con la carga viral.

Variantes	Carga viral baja N (%)	Carga viral alta	Valor de p*
E-Prototipo	24 (68.57%)	11 (31.43%)	0.015
E-G350	54 (51.43%)	51 (48.57%)	
E-A176/G350	7 (43.75%)	9 (56.25%)	
E-C188/G350	15 (46.88%)	17 (53.13%)	
AA-a	8 (25.00%)	24 (75.00%)	
AA-c	11 (57.89%)	8 (42.11%)	

*Prueba exacta de Fisher

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 (Boulet et al., 2009). La curva estándar para la cuantificación del gen de la RNAsa P se utilizó un kit comercial con DNA genómico obtenido de 10,000, 5,000, 2,500, 1,250 y 625 células previamente cuantificadas (Applied Biosystems). La curva estándar para cuantificar E6 fue generada usando diluciones con 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 copias del plásmido (pEGFP-N1) con E6 del VPH16 realizada por triplicado. La ecuación para el cálculo del número de copias de cada gen por muestra fue la siguiente (1):

$$x = \exp((y-b)/m) \quad (1)$$

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 normalizada fue obtenida dividiendo el número de copias de E6 entre el número de copias de RNAsa P (Cheung, Lo, Cheung, Tang y Chan, 2006; Chang et al., 2013) se consideró como carga viral alta todos aquellos valores de número de copias por célula iguales o mayores a la mediana.

Análisis estadístico

La prueba exacta de Fisher o X^2 , fueron usadas para asegurar la significancia de las diferencias en la frecuencia

de variantes de VPH 16 y su carga viral entre los grupos clasificados por tipo de lesión. Para estimar el riesgo de desarrollar una lesión precancerosa o cáncer asociado con la variante de VPH 16 o carga viral alta, se calcularon Odds Ratios (OR) con intervalos de confianza del 95%, ajustado por edad. La carga viral fue expresada en número de copias/célula, y la diferencia entre grupos fue comparada usando la prueba de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico fue realizado usando los programas IBM SPSS Statistics V. 22 y STATA V.11

Resultados

Análisis de las secuencias e identificación de las variantes E6 de VPH 16

El análisis de las secuencias amplificadas en las 239 muestras permitió identificar polimorfismos en 9 nucleótidos ubicados entre la posición 104 y 559 del gen E6. Algunos de los polimorfismos presentes en estas variantes, tienen como resultado cambios de aminoácidos en la oncoproteína E6, los cuales pueden ser deducidos por la secuencia de nucleótidos (véase tabla 2).

Clasificación, frecuencia y asociación de las variantes E6 del VPH 16 con lesiones y CaCU

De las 239 muestras, el 78.66% presentó variantes del sublinaje E y el 21.34% del sublinaje AA1. La variante más frecuente fue la E-G350 (43.93%) seguida de las variantes E-Prototipo (14.64%), E-C188/G350 (13.39%), AA-a (13.39%), AA-c (7.95%) y E-A176/G350 (6.69%) (véase tabla 3).

Tabla 7. Carga viral alta asociada con el tipo de lesión.

Carga Viral	Sin LEI N (%)	LEIBG N (%)	OR (CI 95%) p	LEIAG N (%)	OR (CI 95%) p	CaCU N (%)	OR (CI 95%) p
Baja	37(31.1%)	51(42.9%)	1*	5(4.2%)	1*	26 (21.9%)	1*
Alta	29(24.2%)	36(30.0%)	0.90 0.47-1.72 0.47	8(6.7%)	2.04 0.60-6.90 0.25	47(39.2%)	2.31 1.17-4.56 0.016

*Categoría de referencia (Carga viral baja)

Mediante el cálculo de OR se determinó la asociación entre las variantes E-G350, E-A176/G350, E-C188/G350, AA-c, AA-a y el tipo de lesión (véase tabla 4). Se encontró que las mujeres infectadas con las variantes AA-a, E-A176/G350, AA-c y E-G350 presentan 41.24, 21.45, 11.87 y 9.56 veces más riesgo respectivamente de presentar CaCU en comparación con la variante E-Prototipo.

Asociación de la carga viral con las variantes E6 de VPH 16 y CaCU.

Se cuantificó el número de copias del gen de copia única RNAsa P y del gen E6 para determinar la carga viral en número de copias/célula de las variantes E6 del VPH 16. Se observó diferencia significativa en el número de copia/célula de las variantes E-G350, E-C188/G350 y AA-a en comparación con la E-Prototipo (véase tabla. 5). Al evaluar la carga viral como el número de copias por célula, se encontró que la mediana de carga viral fue 0.853, los valores iguales a la mediana y mayores fueron considerados como carga viral alta y los valores por debajo de la mediana se consideraron como carga viral baja. La variante AA-a presentó una carga viral alta en el 75% de las muestras positivas a la misma, mientras que sólo el 25% presentó carga viral baja. Por otra parte, la variante E-T350 mostró carga viral baja en más del 68% de los casos. El resto de las variantes mostraron una distribución equitativa en la carga viral alta o baja (véase tabla. 6).

Mediante el cálculo de OR se determinó la asociación entre la carga viral alta y el tipo de lesión (véase tabla. 7). Se encontró que las mujeres que presentan una infección por VPH 16 con una carga viral alta presentan 2.31 veces más riesgo de presentar CaCU en comparación con aquellas con carga viral baja.

Discusión y conclusiones

Además de las variantes E-prototipo, E-G350, AA-a y AA-c reportadas con altas frecuencias por estudios previos en México (Berumen et al., 2001; Lizano et al., 2009; Illades-Aguir et al., 2010), nosotros encontramos que existen otras variantes frecuentes en el estado, tal es el caso de las variantes E-C188/G350 y E-A176/G350. Nuestros hallazgos refuerzan la propuesta de que la distribución de las variantes E6 del VPH 16 es dependiente de la población. Las asociaciones significativas entre las variantes E-G350, E-A176/G350, AA-a y AA-c de VPH 16 y el riesgo elevado de CaCU en comparación con la E-Prototipo, refuerzan lo reportado por Cornet, Gheit, Iannacone, Vignat, Sylla, Del Mistro et al. (2013) donde sugiere que la distribución mundial de las variantes de VPH 16 y su riesgo relativo de CaCU son dependientes de la población. Al igual que otros estudios nosotros encontramos que la frecuencia de las variantes AA-a y AA-c, es ascendente en relación con el desarrollo de la lesión, además, observamos este mismo comportamiento en la variante E-A176/G350. La alta frecuencia de la variante AA-a con carga viral alta en CaCU y la asociación significativa entre la carga viral alta y el CaCU, sugieren una fuerte relación de esta variante con el desarrollo de la carcinogénesis cervical, por tal motivo consideramos que el análisis de la carga viral de las variantes podría tener una utilidad clínica importante en el desarrollo de estrategias para el control de infecciones por VPH y CaCU.

Agradecimientos

A la UAGro por el financiamiento proporcionado para el desarrollo de la investigación en convocatoria 2013.

Al Dr. José Guadalupe Muñoz Camacho, M en C. Noelio Zamudio López, QBP. Natividad Sales Linares, QBP. Eric Genaro Salmerón Bárcenas y a los estudiantes Citlali Suástegui Ventura y Jonatán Vázquez Rivera por su valiosa colaboración en el desarrollo de esta investigación.

Referencias

- Arias-Pulido H, Peyton, C. L., Joste, N. E., Vargas, H. y Wheeler, C. M. (2006). Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(5), 1755-1762.
- Azizi, N., Brazete, J., Hankins, C., Money, D., Fontaine, J., Koushik, A., Rachlis, A., Pourreaux, K., Ferenczy, A., Franco, E. y Coutlée, F. (2008). 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 neoplasia. *Journal of General Virology*. 89(7), 1716-28.
- Berumen, J., Ordoñez, R. M., Lazcano, E., Salmerón, J., Galván, S. C., Estrada, R. A., Yunes, E., García-Carranca, A., González-Lira, G. y Madrigal-de la Campa, A. (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, G. A, Benoy, I. H., Depuydt, C. E., Horvath, C. A., Aerts, M., Hens, N., Vereecken, A. J. y Bogers, J. J. (2009). Human Papillomavirus 16 Load and E2/E6 Ratio in HPV16-Positive Women: Biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia ≥ 2 in a Liquid-Based Cytology Setting? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 18(11), 2992-2999.
- Carcopino, X., Henry, M., Mancini, J., Giusiano, S., Boubli, L., Olive, D. y Tamalet, C. (2012). Significance of HPV 16 and 18 Viral Load Quantitation in Women Referred for Colposcopy. *Journal of Medical Virology*. 84 (2), 306-313.
- Casas, L., Galván, S. C., Ordoñez, R. M., López, N., Guido, M. y 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. y Wu, Y. (2013). Effectiveness of HPV 16 Viral Load and the E2/E6 Ratio for the prediction of cervical cancer risk among chinese women. *Journal of Medical Virology*. 85(4), 646-654.
- Cheung, J. L., Lo, K. W., Cheung, T. H., Tang, J. W. y Chan, P. K. (2006). Viral Load, E2 Gene Disruption Status, and Lineage of Human Papillomavirus Type 16 Infection in Cervical Neoplasia. *Journal of Infectious Diseases*. 194(12), 1706-1712.
- Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., Tommasino, M. y Clifford, G. M. (2012). IARC HPV Variant Study Group: 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., Iannacone, M. R., Vignat, J., Sylla, B. S., Del Mistro, A., Franceschi, S., Tommasino, M. y Clifford, G.M. (2013). HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *British Journal of Cancer*. 108(1), 240-244.
- Fontaine, J., Hankins, C., Money, D., Rachlis, A., Pourreaux, K. y Ferenczy, A. (2008). 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. *Journal of Clinical Virology*. 43(3), 307-312.
- Gheit, T., Cornet, I., Clifford, G. M., Iftner, T., Munk, C., Tommasino, M. y Kjaer, S. K. (2011). Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 20(7), 1315-1321.
- Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., de Sanjose, S., Franceschi, S. y Clifford, G. M. (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *International Journal of Cancer*. 131, 2349-2359.
- Guo, M., Sneige, N., Silva, E. G., Jan, Y. J., Cogdell, D. E., Lin, E., Luthra, R. y Zhang, W. (2007). Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Modern Pathology*. 20(2), 256-266.
- Hamaguchi, D., Miura, K., Abe, S., Kinoshita, A., Miura, S., Yamasaki, K., Yoshiura, K. y 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. *Journal of Medical Virology*. 85(12), 2093-100.
- Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, D. C., Moreno, P., Murillo, R., Bravo, M. M., Villa, L. y Molano, M. (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, L. del C., Antonio-Véjar, V., Zamudio-López, N., Sales-Linares, N., Flores-Alfaro, E., Fernández-Tilapa, G., Vences-Velázquez, A., Muñoz-Valle, J.F. y Leyva-Vázquez, M. A. (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.
- Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J., y Clifford, G. M. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International Journal of Cancer*. 128(4), 927-935.
- Lizano, M., Berumen, J. y García-Carranca, A. (2009). HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants. *Archives of Medical Research*. 40(6), 428-434.
- Manawapat, A., Stubenrauch, F., Russ, R., Munk, C., Kjaer, S. K. e Iftner, T. (2012). Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *American Journal of Cancer Research*. 2(2), 192-203.
- Moberg, M., Gustavsson, I., Wilander, E. y Gyllensten, U. (2005). High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *British Journal of Cancer*. 92(5), 891-894.
- Secretaría de Salud (2007). Modificación a la norma oficial mexicana NOM-014-SSA2-1994. *Diario oficial de la Federación*. Gobierno de la República Mexicana
- Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., Desalle, R., Befano, B., Yu, K., Safaeian, M., Sherman, M. E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Solomon, D., Castle P. E. y Burk, R. D. (2010). A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia. *Cancer Research*. 70(8), 3159-3169.
- Sundström, K., Ploner, A., Dahlström, L. A., Palmgren, J., Dillner, J., Adami, H. O., Ylitalo, N. y Sparén, P. (2013). Prospective study of HPV16 viral load and risk of in situ and invasive squamous cervical cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 22(1), 150-158.
- Xi, L. F., Hughes, J. P., Edelstein, Z. R., Kiviat, N. B., Koutsky, L. A., Mao, C., Ho, J. y 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. *Journal of Infectious Diseases*. 200(11), 1789-1797.
- Xi, L. F., Hughes, J. P., Castle, P. E., Edelstein, Z. R., Wang, C., Galloway, D. A., Koutsky, L. A., Kiviat, N. B. y Schiffman M. (2011). Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Infection: A Nested Case-Control Study. *Journal of Infectious Diseases*. 203(10), 1425-33.
- Zuna, R. E., Moore, W. E., Shanesmith, R. P., Dunn, S. T., Wang, S. S., Schiffman, M., Blakey, G. L., Teel, T. (2009). Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *International Journal of Cancer*. 125(11): 2609-2613.