

# Distribución de variantes del virus del papiloma humano 16 (VPH 16) en mujeres con y sin neoplasia intraepitelial cervical grado 3 y cáncer cervical

## Distribution of Variants of the Human Papilloma Virus 16 (HPV 16) in Women with and without Grade 3 Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer

Esteban Lopera<sup>1</sup>, Patricia Acosta<sup>2</sup>, Yaliana Tafurt<sup>2</sup>, Mary Uribe<sup>1</sup>, Carlos Córdoba<sup>3</sup>, Piedad Acosta<sup>2,4</sup>, Katherine Quintero<sup>1</sup>, Yexania Arboleda<sup>2</sup>, Hernán Sierra<sup>2</sup>, Gloria Sánchez<sup>1</sup>, Astrid Bedoya<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Grupo Infección y Cáncer, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

<sup>3</sup>Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, Colombia

<sup>4</sup>Departamento de Ginecología y Obstetricia, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

<sup>5</sup>Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

## Resumen

**Objetivos:** Describir la distribución de variantes del virus del *papiloma humano 16* en mujeres con y sin neoplasia intraepitelial cervical grado 3 y cáncer cervical. **Métodos:** Se determinaron las variantes moleculares en casos de carcinoma escamocelular, adenocarcinoma cervical y en mujeres sin anomalías citológicas de alto grado y positivas para el virus del papiloma humano 16. Para la detección de las variantes moleculares se amplificó el marco abierto de lectura del gen E6 del virus del papiloma humano 16 y se utilizó una técnica de hibridación reversa para la detección de los principales cambios de nucleótidos que identifican las ramas filogenéticas y las clases de variantes. **Resultados:** Hubo diferencias estadísticamente significativas en la distribución de variantes de virus del papiloma humano 16. Los controles no presentaron infecciones con variantes *no europeas*, mientras que ellas estuvieron presentes en el 30% de los casos de carcinoma escamocelular o neoplasia intraepitelial cervical grado tres. En adenocarcinoma, el 65% de las infecciones fueron del tipo *no europeo*. **Conclusiones:** La prevalencia de variantes no europeas de virus de papiloma humano 16 fue de 31,2% en neoplasia intraepitelial cervical grado 3 y cáncer escamocelular, y de 64,1% en adenocarcinoma de cérvix, mientras que estas no se observaron en mujeres sin cáncer.

**Palabras clave:** Neoplasias del cuello uterino, Papilomavirus Humano 16, sondas de ADN de HPV, adenocarcinoma

## Correspondencia:

Astrid M. Bedoya, Grupo Infección y Cáncer, Carrera 51D No. 62-29, Laboratorio 283, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Teléfono (57 4) 219 6062. Correo electrónico: astridbedoya@hotmail.com

Fecha de recepción: 9 de mayo de 2012

Fecha de aprobación: 20 de noviembre de 2012

## Abstract

**Objectives:** To describe the distribution of the variants of the *human papilloma virus 16* in women with and without grade 3 cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Methods:** Molecular variants were established in cases of squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and in women with high grade Pap smear abnormalities who tested positive for human papilloma virus 16. For the detection of molecular variants the open reading framework for the E6 gene of the human papilloma virus 16 was amplified and a reverse hybridization technique was utilized for the detection of major changes in the nucleotides which identify the phylogenetic branches and classes of variants. **Results:** There were statistically significant results in the distribution of the variants of the human papilloma virus 16. Control cases showed no infections with non European variants, but they were present in 30% of squamous cell carcinoma or grade three cervical intraepithelial neoplasia. For adenocarcinoma, 65% of infections were of non European type. **Conclusions:** The prevalence of non European variants of the human papilloma virus 16 was 31.2% in grade 3 cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell cancer, and 64.1% in cervical adenocarcinoma; however, these were not observed among women without cancer.

**Keywords:** Uterine cervical neoplasms, human papillomavirus 16, DNA probes, HPV, adenocarcinoma

## Introducción

Aunque el cáncer cervical se ha logrado controlar en países desarrollados, aún es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en países en vía de desarrollo. En 2008 se diagnosticaron 529.409 nuevos casos y se presentaron 274.883 muertes por esta causa. Ochenta y cinco por ciento de los casos y 88% de las muertes ocurrieron en países en desarrollo (1). En Latinoamérica y el Caribe, el cáncer cervical contribuye a más años de vida perdidos que la tuberculosis, mortalidad materna y sida (2).

La relación causal entre el virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer cervical ha sido establecida claramente (3); el VPH 16 es el responsable del 50-60% de los casos (4). Esta infección se adquiere corto tiempo después del inicio de la actividad sexual, pero en la gran mayoría de mujeres es autocontrolada y se hace indetectable en el plazo de uno a dos años. En la pequeña proporción (10-20%) de mujeres que no eliminan la infección, es decir, tienen infección persistente, el riesgo de desarrollar cáncer es muy alto (5,6).

Diferentes datos biológicos y taxonómicos disponibles indican que existe un gran espectro de variación molecular del VPH, que se refleja en una alta diversidad en su comportamiento biológico. Más aún, la carcinogénesis de los genotipos de VPH refleja la evolución del virus. Por lo tanto, los virus agrupados más cercanamente en los

árboles filogenéticos en general comparten ciertas propiedades patogénicas (7).

Las variantes moleculares del VPH son definidas como aquellos aislados del mismo genotipo que presentan diferencia menor del 2% en la secuencia de nucleótidos del gen viral L1, comparados con el aislado viral referencia (8,9). Para el VPH 16 se han identificado entre 20 y 240 variantes moleculares (10,11). Las variantes de VPH 16 han sido clasificadas como *europas* (E), *asiáticas* (As), *asiático-americanas* (AA), *norteamericana* (NA), *africana-1* (Af1) y *africana-2* (Af2), basada en su distribución geográfica, que concuerda con la de los grupos étnicos de la población (12).

En varias poblaciones se ha mostrado que la infección con variantes no europeas (Af1, Af2, AA, As, NA) del VPH 16 se encuentra asociada con un aumento de dos a nueve veces en el riesgo de cáncer cervical y lesiones precursoras de alto grado (13-18). Sin embargo, en poblaciones con bajo nivel de mezcla étnica, como las de Europa, esta asociación no se observa (19). Adicionalmente, la mutación del gen E6 T350G (mutación no sinónima que cambia el aminoácido 83 leucina a valina), que aparece tanto en variantes europeas como no europeas, fue asociada con un aumento en el riesgo para el desarrollo de lesiones (20). Por otro lado, se ha observado que la distribución de variantes no europeas entre casos de carcinoma escamocelular (CEC) y adenocarcinoma (ADC) es diferente; su frecuencia es mayor en casos de ADC (16).

Dada la alta diversidad y mezcla étnica que existe en Colombia (21), la caracterización de la distribución de variantes de VPH 16 puede contribuir a entender si estos cambios de nucleótidos permiten identificar con mayor precisión a las mujeres positivas para la infección por VPH 16 que tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical. El objetivo de este estudio fue describir la distribución de variantes del VPH 16 en mujeres con NIC3 o cáncer cervical, y en mujeres con lesiones de bajo grado o citología normal en la población de Antioquia y Cauca, dos departamentos de Colombia con diferente composición étnica.

## Métodos

Se diseñó un estudio de casos y controles. Se definieron como casos mujeres con diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical de grado tres (NIC3) o carcinoma escamocelular (CEC), obtenido mediante biopsia dirigida por colposcopia, y que fueran positivas para infección por VPH 16. Como controles, mujeres con resultado de citología normal, lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) o células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), y que fueran positivas para infección por VPH 16. Mujeres con incapacidad mental, en estado de embarazo, VIH+, con conización u otro tratamiento previo para cáncer cervical (radio o quimioterapia) o histerectomía radical, no se consideraron elegibles.

A todas las mujeres que accedieron a participar en el estudio y que firmaron el consentimiento informado se les realizó una encuesta sobre datos sociodemográficos, comportamiento sexual y reproductivo, y uso de cigarrillo. Finalmente, se les tomaron las muestras respectivas. Adicional a ello, se incluyeron como casos mujeres con diagnósticos de CEC y adenocarcinoma (ADC), cuyas muestras eran tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (FFIP). El estudio fue aprobado por los comités de ética de la Facultad de Medicina y de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia.

## Población de estudio y recolección de las muestras

Las mujeres con diagnóstico de NIC3 o cáncer cervical fueron reclutadas en diferentes centros de tratamiento de cáncer de Medellín y Popayán, entre mayo de 2008 y julio de 2010. Estas mujeres fueron elegibles porque presentaban un diagnóstico histopatológico previo de NIC3 o cáncer cervical, el cual fue confirmado posteriormente mediante búsqueda en la historia clínica del registro de patología, o por la impresión diagnóstica de los ginecólogos del estudio.

Las muestras de los casos correspondían a biopsias frescas y/o tejidos FFIP, mientras que las muestras de los controles eran cepillados cervicales. Las biopsias fueron obtenidas por los ginecólogos al momento del ingreso al estudio y

**Tabla 1.** Características de la población de estudio

| Característica   | Biopsias frescas | Tejidos FFIP | Controles |
|--|------------------|--------------|-----------|
| Total  | 102              | 159          | 39        |
| Edad en años (media/desviación)                        | 44,4/13,1        | 49,4/13,5    | 31,4/9,9  |
| <b>Centros de reclutamiento Medellín n (%)</b>         |                  |              |           |
| Hospital San Vicente de Paúl                           | 57 (55,9)        | 109          |           |
| Instituto de Cancerología Las Américas                 | 25 (24,5)        | 50           |           |
| IPS Dinámica   | -                | -            | 22 (56,4) |
| Servicio de citología Escuela de Microbiología         | -                | -            | 1 (2,6)   |
| Otras instituciones*                                   | 5 (4,9)          |              |           |
| <b>Centros de reclutamiento Popayán n (%)</b>          |                  |              |           |
| Susana López de Valencia, Universitario San José       | 15 (14,7)        | -            | -         |
| ESE Unidad Popayán                                     | -                | -            | 12 (30,8) |
| IPS Comfacauc, laboratorio de Genética Humana UniCauca | -                | -            | 4 (10,3)  |

\*Clínica Medellín, Clínica Vida, Congregación Mariana, Hospital La María y Hospital Marco Fidel Suárez en Medellín. Unicauca: Universidad del Cauca.

transportadas al laboratorio en 5 ml de medio RPMI-1640. En el laboratorio, las biopsias fueron lavadas con PBS, pesadas y congeladas a -30 °C, para posterior extracción de ADN. Los tejidos FFIP fueron obtenidos de los archivos y registros de casos diagnosticados entre 1998-2006, del Departamento de Patología y el Laboratorio de Patología del servicio de pensionados, ambos localizados en el Hospital de San Vicente de Paúl y del Laboratorio de Patología de la Clínica Las Américas.

Los cepillados cervicales de los controles fueron recolectados en los servicios de citología de la institución prestadora de servicios de salud (IPS) Dinámica y de la IPS Universidad de Antioquia (Laboratorio de la Escuela de Microbiología). Los cepillados cervicales obtenidos después de la preparación del *Papanicolaou* fueron almacenados en un tubo con medio de transporte (Listerine, McNeli LA LLC). Después de dar vortex y centrifugar la muestra, el *pellet* de células se congeló a -20 °C.

Para obtener el ADN de las biopsias se usó el *kit* de purificación de ADN genómico Wizard® (A1125, Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Previo a la extracción del ADN de los tejidos FFIP, se confirmó la presencia del tumor; para ello, de cada tejido FFIP se hicieron cinco nuevos cortes histológicos, donde el primero y el último fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H & E). El análisis microscópico de las placas teñidas con H & E fue realizado por un patólogo experto, quien confirmó la calidad de la muestra y el

diagnóstico, y evaluó el tipo histológico. Los cortes internos fueron utilizados para marcación, disección de la lesión y obtención del ADN, siguiendo los procedimientos previamente descritos (22). A partir del cepillado cervical se obtuvo extracto crudo [células que, tratadas con una solución de proteinasa K (10 mg/ml proteinasa K en TRIS 50mM, pH = 8,3), pueden ser usadas para la determinación de la presencia del virus] (22).

### Tipificación del virus del papiloma humano

Para la detección del VPH se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), usando los iniciadores Gp5+/Gp6+ (23). Esta técnica amplifica un fragmento de 150 pares de bases del gen L1, altamente conservado en todos los genotipos de VPH. El genotipo del VPH fue identificado mediante una técnica de hibridación reversa (RLB, del inglés *reverse line blot*), con sondas específicas para 37 genotipos diferentes del VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82/IS39, 82/MM4, 83, 84, CP6108). Como control positivo, se empleó ADN obtenido de las líneas celulares SiHa y Hela, portadoras del genoma de VPH 16 y 18, respectivamente. Para comprobar la calidad del ADN, todas las muestras fueron evaluadas por medio de la amplificación de un fragmento del gen de la  $\beta$ -globina que genera un amplicón de 209 pb, utilizando los iniciadores BG03/BG05 (24).

**Tabla 2.** Frecuencia de variantes europeas y no europeas del gen E6 de VPH16 en mujeres con lesiones de bajo grado o citología normal, y con carcinoma escamocelular y adenocarcinoma

| Tipo histológico               |                         | Individuos incluidos | Individuos con resultado  | Variantes de VPH 16 |                 | Total de variantes encontradas |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|-----------------|--------------------------------|
|                                |                         | <i>n</i>             | <i>n</i> (%) <sup>a</sup> | Europeas (%)        | No europeas (%) | <i>m</i>                       |
| <b>Controles</b>               |                         | 39                   | 33 (84,6)                 | 33 (100)            | 0               | 33                             |
| <b>Carcinoma escamocelular</b> | <b>Biopsias frescas</b> | 102                  | 98 (96,1)                 | 80 (71,4)           | 32 (28,6)       | 112 <sup>b</sup>               |
|                                | <b>Tejidos FFIP</b>     | 109                  | 58 (53,2)                 | 39 (63,9)           | 22 (36,0)       | 61 <sup>c</sup>                |
| <b>Adenocarcinoma</b>          |                         | 50                   | 37 (74,0)                 | 14 (35,9)           | 25 (64,1)       | 39 <sup>d</sup>                |
| <b>Total</b>                   |                         | 300                  | 226 (75,3)                | 166 (67,8)          | 79 (32,2)       | 245                            |

<sup>a</sup> Porcentaje sobre el total de individuos incluidos

<sup>b</sup> Infecciones múltiples: Ocho (8) individuos están infectados con variantes Eu y AA simultáneamente, 6 individuos más, están infectados con 2 variantes Eu distintas simultáneamente.

<sup>c</sup> Infecciones múltiples: Tres (3) individuos están infectados con variantes Eu y AA simultáneamente.

<sup>d</sup> Infecciones múltiples: Dos (2) individuos están infectados con variantes Eu y AA simultáneamente.

Nota: La zona sombreada corresponde a la descripción de las infecciones. La parte blanca corresponde a la descripción de los individuos.

**Tabla 3.** Posición de nucleótido en el genoma de VPH 16

| Rama filogenética | Clase      | Posición de nucleótido en el genoma de VPH 16 |     |      |     |     |     |      |      |      |      |     | Frecuencia |
|-------------------|------------|---|-----|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|-----|------------|
|                   |            | 145*  | 176 | 183* | 187 | 286 | 289 | 335* | 350* | 442* | 449* | 532 |            |
| E                 | Referencia | G   | G   | T    | A   | T   | A   | C    | T    | A    | C    | A   | 29         |
| E                 | 350G       | —   | A   | —    | —   | —   | —   | —    | G    | —    | —    | —   | 1          |
| E                 | 350G       | —   | —   | —    | G   | —   | —   | —    | G    | —    | G    | —   | 1          |
| E                 | 350G       | —   | —   | —    | —   | —   | —   | —    | G    | C    | —    | —   | 1          |
| E                 | 350G       | —   | —   | —    | —   | —   | —   | —    | G    | —    | —    | —   | 109        |
| AA                | AA         | T   | —   | —    | —   | A   | G   | T    | G    | —    | —    | G   | 58         |
| AA                | AA(183G)   | T   | —   | G    | —   | A   | G   | T    | G    | —    | —    | G   | 8          |
| E y AA            | 350G       | G/T   | G/C | —    | —   | T/A | A/G | C/T  | G    | —    | —    | A/G | 1          |
| E y AA            | 350G       | G/T   | —   | —    | —   | T/A | A/G | C/T  | G    | —    | —    | A/G | 4          |
| E y AA            | 350G       | G/T   | —   | T/G  | —   | T/A | A/G | C/T  | G    | —    | —    | A/G | 1          |
| E y AA            | 350 T/G    | G/T   | —   | T/G  | —   | T/A | A/G | C/T  | T/G  | —    | —    | A/G | 1          |
| E y AA            | 350 T/G    | G/T   | —   | —    | —   | T/A | A/G | C/T  | T/G  | —    | —    | A/G | 2          |
| E y AA            | 350 T/G    | G/T   | G/A | —    | —   | T/A | A/G | C/T  | T/G  | —    | —    | A/G | 4          |
| E                 | 350 T/G    | —   | —   | —    | —   | —   | —   | —    | T/G  | —    | —    | —   | 6          |

Nota: Se muestran las variaciones de nucleótidos detectados en la secuencia E6 de aislados de VPH 16 de casos (NIC3, CEC, ADC) y controles (lesiones de bajo grado, ASC-US o normales). En la primera fila se muestran las posiciones del gen E6 de la variante referencia de VPH 16 para las cuales se detectaron variaciones. Las sustituciones de nucleótido se denotan con el nucleótido correspondiente (A, G, C, T). El guion bajo (—) denota posiciones sin variación. La barra diagonal (/) denota posiciones en las que se observó más de un nucleótido (ej. A/G). Las columnas sombreadas indican las posiciones de nucleótidos usados para definir las ramas filogenéticas y las clases. Los números con asterisco indican posiciones de nucleótidos que resultan con cambios en la secuencia de aminoácidos (no sinónimos). Se asumió que las clases de las variantes encontradas en infecciones múltiples serían las mismas que las encontradas en infecciones simples. En las infecciones múltiples, "350 T/G" indica que no se pueden determinar con certeza las clases presentes.

### Identificación de las variantes moleculares del gen E6 de VPH 16

La identificación de las variantes moleculares del gen E6 de VPH 16 fue realizada a través de un contrato de servicio con el Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología, empresa social del Estado, de Bogotá. En la técnica utilizada, se realizó una PCR que amplifica un fragmento de 562 pb desde el nucleótido 21 hasta el 582 del marco abierto de lectura del gen E6, con el uso de los iniciadores E6F1 (5'-AAACTAAGGGCG-TAACCG-3') y E6R1 (5'-TGTAGGTGTATCTC-CATGC-3'). Las muestras que obtuvieron un resultado negativo en esta PCR fueron sometidas a dos PCR más, utilizando dos iniciadores que se ubican aproximadamente en el centro de la secuencia de este gen, denominados E6R23 (5'-CGGTTTG-TTGTATTGCTG-3', ubicado del nucleótido 371 al 388) y E6F12 (5'-CGTGAGGTAGTATATGA-CTTTGC-3', ubicado del nucleótido 221 a 240), amplificando dos secuencias de la siguiente manera:

una de 367 pb del nucleótido 21 a 388, usando E6F1 y E6R23, y otra de 362 pb del nucleótido 221 al 528, usando E6F12 y E6R1 (26).

Los iniciadores antisentido de las PCR usadas estaban conjugados con biotina en su extremo 5', lo que generó productos de PCR marcados. Para identificar las variantes moleculares del gen E6 del VPH 16 se utilizó nuevamente un RLB con sondas que permitieran detectar los principales cambios de nucleótidos (G145T, T286A, C335T, G350T y A532G), que identifican las ramas filogenéticas de las variantes E, As, AA, NA, Af1, Af2, incluyendo además todas las mutaciones que originan cambio de aminoácidos descritas hasta la fecha (11,12,25). Las condiciones exactas de la prueba de PCR y el RLB de detección han sido descritas anteriormente (26).

### Análisis de datos

Siguiendo la clasificación de variantes de VPH de Bernard (10) y las descritas por Yamada (12) y

Sánchez (27), encontramos que en la población evaluada la mutación de la posición 145 ocurría simultáneamente con las otras mutaciones que marcan las diferencias generalmente usadas para la clasificación de las variantes. Con base en ello, se estableció una clasificación en dos grupos principales, determinados así: 145G como europeo y 145T como no europeo. Todas las infecciones fueron contadas una vez, tanto en casos como en controles, aun en los individuos con infecciones múltiples. De esta manera, los porcentajes de las variantes identificadas fueron calculados sobre el total de las infecciones.

Como se ha descrito anteriormente (27), para los análisis estadísticos, a los individuos que presentaron infecciones múltiples se les dio un peso proporcional al número de infecciones (por ejemplo, un individuo con infecciones AA + E(350G) se contó como 0,5 en el grupo no europeos y 0,5 en el grupo de europeos). Para comparar la distribución de variantes entre casos y controles, se emplearon las pruebas de  $\chi^2$  y Fisher, usando un nivel de significancia de 0,05. Los resultados fueron generados en el programa R, versión 2.13.0 (28).

## Resultados

Como se muestra en las tablas 1, y 2 durante todo el periodo del estudio se lograron obtener e identificar biopsias frescas de 102 mujeres (15 con diagnóstico de NIC3 y 87 con CEC). Adicionalmente, se recolectaron 159 tejidos FFIP (6 con diagnóstico de NIC3, 103 con CEC y 50 con diagnóstico de ADC). En 68 (26,1%) muestras no se obtuvo señal

**Tabla 4.** Diferencias en la distribución de variantes del gen E6 VPH 16 entre controles y casos de carcinoma escamocelular de cérvix (NIC3 o más severo)

| Variantes de E6 de VPH 16 | Controles<br>n = 33 (%) | Casos <sup>a</sup><br>n = 98 (%) | P <sup>b</sup> | P <sup>c</sup> |
|---------------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|
| No Europea                | 0                       | 28 (28,6)                        | 0,001          | < 0,001        |
| Europea                   | 33 (100)                | 70 (71,4)                        |                |                |
| 350G                      | 26 (78,8)               | 75,5 <sup>d</sup> (77,0)         | 0,97           | 1,00           |
| 350T                      | 7 (21,2)                | 22,5 (23,0)                      |                |                |

<sup>a</sup> ADN obtenido de biopsias frescas de casos con diagnóstico histológicamente confirmado.

<sup>b</sup> Prueba  $\chi^2$  sin corrección de Yates.

<sup>c</sup> Prueba exacta de Fisher unilateral.

<sup>d</sup> Números decimales: los individuos que mostraron infección con múltiples variantes fueron proporcionalmente atribuidos a los grupos de variantes europeas y no europeas.

**Tabla 5.** Diferencias en la distribución de variantes del gen E6 de VPH 16 entre controles y casos (tejidos FFIP) de carcinoma escamocelular (NIC3 o más severo)

| Variantes de E6 de VPH 16 | Controles<br>n = 33 (%) | Casos <sup>a</sup><br>n = 58 (%) | P <sup>b</sup> | P <sup>c</sup> |
|---------------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|
| No europea                | 0                       | 20,5 (35,3) <sup>d</sup>         | < 0,001        | < 0,001        |
| Europea                   | 33 (100)                | 37,5 (64,7)                      |                |                |
| 350G                      | 26 (76,9)               | 54,5 (93,9)                      | 0,066          | 0,090          |
| 350T                      | 7 (23,1)                | 3,5 (6,0)                        |                |                |

<sup>a</sup> ADN proveniente de tejidos FFIP.

<sup>b</sup> Prueba  $\chi^2$  sin corrección de Yates.

<sup>c</sup> Prueba exacta de Fisher unilateral.

<sup>d</sup> Números decimales: los individuos que mostraron infección con múltiples variantes fueron proporcionalmente atribuidos a los grupos de variantes E y NE.

de hibridación, por lo que no se realizó identificación de variantes y fueron excluidas de posteriores análisis. Finalmente, entre las 193 muestras de casos en los que se logró resultado para la determinación de variantes, 98 correspondían a biopsias frescas (14 NIC3 y 84 CEC); 58, a tejidos FFIP de pacientes con NIC3 o CEC (5 con diagnóstico NIC3 y 53 con CEC), y 37 a tejidos FFIP de pacientes con ADC (tabla 2).

Un total de 2.185 potenciales controles fueron recolectados en el estudio, de los cuales 39 fueron positivas para la infección con VPH 16. Se logró obtener el resultado de la determinación de las variantes de VPH 16 en 33 (84,6%) de los controles (tabla 2). Al comparar las características sociodemográficas de las mujeres cuyas muestras fueron excluidas del análisis porque no se logró la tipificación de variantes y aquellas tipificadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

## Distribución de variantes moleculares del gen E6 del VPH 16

En la tabla 2 se observa que entre todas las 226 muestras, incluyendo casos y controles, de las cuales se logró la detección de variantes, se identificaron 245 infecciones, de las cuales 19 (7,8%) presentaban infecciones múltiples (con más de una variante). El 67,8% correspondieron a infecciones con variantes E. En el análisis, incluyendo biopsias frescas y tejidos FFIP con diagnóstico de NIC3 o CEC, el porcentaje de infecciones con variantes E fue de 71,4% y 63,9%, respectivamente, mientras que en

tejidos FFIP con diagnóstico de ADC solo el 35,9% presentaban infecciones con variantes E. Todos los 33 controles tenían infecciones con variantes E.

En la tabla 3 se describe la distribución de todas las mutaciones puntuales y variantes moleculares del gen E6 de VPH 16 halladas en este estudio. Se identificaron 5 variantes E, incluyendo la variante referencia (8), de las cuales cuatro portaban guanina (G) en la posición 350 y diferían entre ellas por cambios de un solo nucleótido. Se identificaron, además, dos variantes AA que portaban timina (T) en la posición 145, una de ellas portaba además G en la posición 183. Las variantes E (350G) fueron las más frecuentes (aproximadamente 50% de las variantes), seguidas por las variantes AA (aproximadamente 26% de las variantes).

### *Comparación de la distribución de variantes del gen E6 de VPH 16 entre controles y casos con NIC3 y cáncer cervical*

La tabla 4 presenta la comparación de la distribución de variantes del gen E6 de VPH 16 entre mujeres con infecciones identificadas en 98 biopsias frescas de CEC y 33 controles. Las variantes europeas y no europeas se observaron en el 71,4% y 28,6% de los casos, respectivamente, mientras en los controles, todas las 33 muestras portaban infecciones europeas. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). En el análisis de la distribución de las mutaciones en la posición 350 del gen E6, se observó que la mutación 350G estuvo presente en el 77% y 78% de casos y controles, respectivamente, y por tanto no se observaron diferencias en la distribución de esta mutación ( $p = 0,97$ ).

**Tabla 6.** Diferencias en la distribución de variantes del gen E6 de VPH 16 entre de controles y casos de adenocarcinoma

| Variantes de E6 de VPH 16 | Controles<br>n = 33 (%) | Casos<br>n = 37 (%)      | p <sup>a</sup> | p <sup>b</sup> |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|----------------|
| No europea                | 0                       | 24 (64,9)                | < 0,001        | < 0,001        |
| Europea                   | 33 (100)                | 13 (35,1)                |                |                |
| 350G <sup>c</sup>         | 26 (76,9)               | 32,5 (90,3) <sup>d</sup> | 0,321          | 0,330          |
| 350T                      | 7 (23,1)                | 3,5 (9,7)                |                |                |

<sup>a</sup> Prueba  $\chi^2$  sin corrección de Yates.

<sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher unilateral.

<sup>c</sup> Un individuo no obtuvo información para esta posición (n = 36).

<sup>d</sup> Números decimales: los individuos que mostraron infección con múltiples variantes fueron proporcionalmente atribuidos a los grupos de variantes E y NE.

Cuando se llevó a cabo este mismo análisis, pero incluyendo solamente los datos obtenidos en muestras de tejidos FFIP (tabla 5), se observó que el 64,7% y 35,3% de los casos portaban variantes europeas y no europeas, respectivamente, y esta distribución fue estadísticamente diferente de las distribuciones de variantes observadas en los controles, que, como se mencionó, solo portaban infecciones europeas. En cuanto a la distribución de las mutaciones en la posición 350, en infecciones identificadas en tejidos FFIP, se observó con mayor frecuencia la mutación 350G en casos (93,9%) que en controles (76,9%), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,06$ ).

### *Comparación de la distribución de variantes del gen E6 de VPH 16 entre controles y casos de adenocarcinoma*

En la tabla 6 se describe la comparación de la distribución de variantes moleculares del gen E6 del VPH 16 entre controles y casos de ADC. El 35,1% y 64,9% de las infecciones de VPH 16 en ADC presentaron variantes europeas y no europeas, respectivamente. Las comparaciones con los controles, que contienen exclusivamente infecciones con variantes europeas, mostraron distribuciones con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Las pruebas  $\chi^2$  y Fisher demuestran que la distribución de las variantes entre casos de CEC y ADC es estadísticamente diferente, y esta diferencia fue significativa ( $p < 0,001$ ) (resultados no mostrados).

## Discusión

El estudio describe la comparación de la distribución de variantes europeas y no europeas de VPH 16, clasificadas con base en mutaciones puntuales del gen E6, entre mujeres con y sin NIC3 y cáncer cervical, de Medellín y Popayán. Se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas cuando se compara la distribución de variantes de VPH 16 entre las mujeres con cáncer cervical y las mujeres del grupo control. Estos resultados confirman los hallazgos en otras poblaciones latinoamericanas, en las cuales se ha observado un mayor riesgo de cáncer cervical asociado con variantes no europeas (13,14,29,30).

Este fue un estudio en el que se incluyeron como casos muestras de tejido fresco y tejidos FFIP, con diagnóstico de NIC3/CEC y ADC. Usamos NIC3, lesión de alto grado o carcinoma *in situ*, porque es considerado un desenlace apropiado para estimar riesgo para el desarrollo de cáncer, y ha sido usado para tal fin en los estudios de casos y controles de Muñoz y colaboradores (31,32), y en los ensayos clínicos, para evaluar la eficacia de la vacuna de VPH (33-35).

Como controles se incluyeron mujeres que acudieron a los servicios de toma de muestras de citologías de 2 IPSs de Medellín, que atienden al 50% de la población del régimen subsidiado y 50% del régimen contributivo de esta misma ciudad. En Popayán, las muestras fueron recolectadas en entidades prestadoras de servicios a las que acude la mayoría de la población de esta ciudad. A pesar de que los controles no fueron seleccionados aleatoriamente mediante un muestreo poblacional, las mujeres con citología de alto grado de estas IPSs son remitidas para tratamiento en los hospitales donde fueron recolectados los casos. Sin embargo, no se puede excluir la probabilidad de que en los controles se incluyera mayor proporción de mujeres que hayan residido por más tiempo en el área urbana de las mencionadas ciudades, y en los casos de mujeres remitidas de centros de toma de citología de lugares por fuera del área urbana de estas.

Además, se llevó a cabo un análisis comparando la historia de la citología entre casos y controles, y se pudo comprobar que, a pesar de que las mujeres del grupo control fueron reclutadas a través de centros de citología, el número de citologías que habían recibido durante su vida no era diferente al número de citologías que los casos habían recibido durante este mismo periodo (datos no mostrados).

En biopsias frescas y tejidos FFIP de casos se observó que el 71,4% y 64,7% de las infecciones son variantes europeas, y el 28,6% y 35,3%, variantes no europeas, específicamente variantes AA. Estos resultados son similares a lo descrito por Bravo y colaboradores (29), quienes analizaron variantes moleculares del gen L1 de VPH 16 y encontraron que un 60% de las mujeres con cáncer cervical portaban variantes E, y un 40%, variantes AA (no europeas).

La clasificación de variantes es similar, independientemente de la región o gen que se utilice para detectar la variabilidad genética del genoma viral. Por tanto, aunque en nuestro estudio se hizo la determinación de variantes en el gen E6, se puede concluir que los hallazgos en ambos estudios en cuanto a la distribución de variantes E y no europea en casos de cáncer cervical son similares.

Respecto a la distribución de las variantes en mujeres con lesiones de bajo grado o citología normal, en este estudio se observó que las 33 muestras positivas para infección por VPH 16 portaban infecciones con variantes europeas. Estos resultados difieren a los descritos por Bravo y colaboradores, quienes observaron en mujeres sanas una distribución del 92% de variantes europeas, 4% de variantes AA y 4% de Af (29). Por otro lado, Huertas-Salgado (36) reportó una distribución muy similar en las frecuencias de variantes en mujeres sin cáncer (87%, 11% y 2%, de infecciones con variantes E, AA y Af, respectivamente). Una posible explicación puede deberse al tamaño de la muestra.

Dado que se ha descrito que la prevalencia del VPH 16 en población normal de mujeres de Bogotá es del 2,42% (37) y estudios en poblaciones latinoamericanas han mostrado que entre las personas positivas para infección por VPH 16 con citologías normales, lesiones de bajo grado o ASC-US la prevalencia de variantes no europeas es de 5% a 11% (14,29,38,39), se necesitaría analizar alrededor de 7.500 individuos de población sana para encontrar al menos una variante AA con una potencia estadística del 80%. Sin embargo, un estudio en población mexicana reportó ausencia de variantes AA (no europeas) en un grupo control de 15 individuos (39), mientras otros estudios, también en poblaciones mexicanas, muestran prevalencias bajas (7% a 10%) de variantes no europeas en grupos de controles VPH 16 positivos, con tamaños de muestra no mayores a 30 individuos (14,38).

Aunque estudios en el ámbito mundial han comprobado que las variantes no europeas circulan con mayor frecuencia en Suramérica (40), estos estudios se han concentrado en la población con cáncer cervical y no en la población normal. Otra explicación posible para la ausencia de variantes no europeas en

los controles de nuestro estudio es la probabilidad de haber incluido en la muestra de los controles mayor proporción de mujeres con componente ancestral europeo. Estudios recientes en los que se evalúa la composición ancestral de diferentes poblaciones de Colombia revelan que la composición ancestral en Medellín es del 70% europeo, 20% amerindio y 10% africano (41), y en Bogotá el promedio del componente ancestral amerindio es dos veces mayor que en Medellín (21), lo que soporta esta explicación, aunque no justificaría lo observado en Popayán, donde la composición ancestral es 60% europeo, 36% amerindio y 4% africano (21). Sin embargo, ni en nuestro estudio, ni en los estudios de Bravo y Huertas-Salgado se recolectó información que pueda ser usada para evaluar esta posibilidad.

A pesar de la ausencia de variantes no europeas, nuestro estudio, como los otros conducidos por Bravo y colaboradores, y Huertas-Salgado y colaboradores, demuestran que la frecuencia de variantes europeas es muy alta en mujeres con lesiones de bajo grado o citología normal. Para confirmar estos hallazgos es aconsejable tener un análisis de casos y controles con mayor tamaño de muestra, y una selección poblacional y muestreo representativo de diferentes grupos étnicos.

Como se observa en la tabla 3, se encontraron en la población siete variantes moleculares en el gen E6 de VPH 16; 5 E y 2 AA, aunque esta variabilidad es baja, es similar a la observada en estudios llevados a cabo en otras poblaciones latinoamericanas, con números similares de mujeres positivas para infección por VPH 16 (11,13,14). Lo que sugiere que el patrón de distribución de las variantes es similar entre las poblaciones latinoamericanas. En este estudio se observó un 8,4% de infecciones múltiples (Tabla 3). Aunque representa el porcentaje más alto de infecciones múltiples reportado hasta ahora, sigue siendo comparable con otros trabajos (25,27).

Nosotros encontramos una amplia variación en el porcentaje de muestras que tuvieron éxito en la detección e identificación de las variantes (96% en biopsias, 53% y 74% en tejidos FFIP de CEC y ADC, respectivamente). Estas diferencias están probablemente relacionadas con la calidad del material genético, que sufre una degradación debido

a los procesos de preparación de los tejidos FFIP (42,43) y posterior extracción (44). Sin embargo, esta limitación no tuvo impacto en la validez de los resultados, pues la distribución de frecuencias de las variantes E y no europeas fue similar entre biopsias y tejidos FFIP de CEC, y a que estas se estimaron con base en las muestras de buena calidad (positivos en la prueba de  $\beta$ -globina). Adicionalmente, se encontró que en ADC la distribución de las variantes fue completamente inversa a la observada en CEC, ya que el 65% de las infecciones en este tipo histológico fueron no europeas.

Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Quint y colaboradores en 2010, y Tornesello en 2011, quienes encontraron mayor frecuencia de variantes AA que E en casos de ADC (45,46). A pesar de las limitaciones observadas en todos esos estudios que reportan resultados para variantes no europeas de VPH 16 en el 70% de los tejidos FFIP de casos de ADC, dada la baja frecuencia de este tipo histológico, dichos resultados son comparables y sustentan la hipótesis de un rol biológico de variantes de VPH en los diferentes tipos histológicos del cáncer cervical.

Hasta el momento no hay estudios concluyentes que determinen las características biológicas de las variantes no europeas que justificarían la mayor agresividad de los adenocarcinomas. Sin embargo, se ha postulado que la expresión de los receptores de progesterona y estrógenos en células columnares endocervicales puede ser un mecanismo asociado con la agresividad de este tipo de tumor (16); por lo tanto, es necesario realizar estudios que evalúen esta hipótesis.

Varios estudios han observado un riesgo elevado de cáncer cervical asociado con variantes no europeas (Af1, Af2, AA, As) de VPH 16 (13-15). Las posibles explicaciones biológicas de esta asociación podrían ser: que algunas de estas variantes moleculares podrían activarse más eficientemente por proteínas de unión al ADN, que desregulen más eficientemente el control del crecimiento celular o que tengan un papel en la capacidad del virus para evadir la respuesta inmune. Aunque algunas de estas explicaciones ya se han evaluado, no se han encontrado evidencias concluyentes que las soporten (47-50).

Las mayores ventajas de nuestro estudio las constituye el reclutamiento de casos y controles por áreas definidas de diferentes lugares de Colombia, y la clasificación apropiada de la variable respuesta (confirmación exhaustiva de los casos de cáncer). Esto no excluye que los resultados deban interpretarse a la luz de las limitaciones de este: debido a la selección de casos y controles positivos para infección por VPH 16, no se logra emparejar por edad; la carencia de emparejamiento por edad en un estudio cuya variable desenlace es el cáncer representa una limitación seria, ya que los casos tienen mayor probabilidad de haber estado expuestos a ciertas variables. A pesar de estas limitaciones, el estudio complementa otros llevados a cabo en Latinoamérica, donde se ha demostrado que las variantes asiático americanas están preferentemente relacionadas con NIC3 y cáncer cervical, y en muy baja frecuencia en mujeres con lesiones de bajo grado y citología normal; sin embargo, estos hallazgos son insuficientes aún como para otorgarle a la identificación de variantes de VPH 16 una aplicación clínica.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a las mujeres voluntarias de este estudio y a las instituciones que participaron en la realización de este proyecto: en Medellín, al Hospital Universitario San Vicente de Paúl, la Clínica Las Américas, Dinámica IPS. En Popayán, al Hospital Universitario San José, Hospital Susana López de Valencia, Unidad Popayán ESE, Coomeva EPS, Comfacaucá IPS, Centro de Diagnóstico Perinatal IPS, y a la Unidad de Salud y Laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca. A su vez, agradecen a la Universidad de Antioquia y a la Universidad del Cauca por el apoyo para la ejecución del estudio.

## Financiación

Este trabajo fue soportado por el Comité Carrera Terry Fox Colombia, código del proyecto CPT 0615, y Colciencias, código del proyecto 1115-343-19317. Los jóvenes investigadores Yaliana Tafurt y Esteban Lopera fueron beneficiarios de la convocatoria nacional para el Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores Colciencias 2008 y 2010, respectivamente.

## Referencias

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
2. Yang BH, Bray FI, Parkin DM, Sellors JW, Zhang ZF. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost. *Int J Cancer* 2004;109:418-24.
3. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55:244-65.
4. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.*2003;88:63-73.
5. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-27.
6. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1072-9.
7. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology.* 2005;337:76-84.
8. Myers G. Human Papillomaviruses, 1996. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Álamos: National Laboratory; 1996.
9. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17-27.
10. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32(Suppl 1):S1-6.
11. Huertas-Salgado A, Martín-Gámez DC, Moreno P, Murillo R, Bravo MM, Villa L, et al. E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: an updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology.* 2011;410:201-15.
12. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol.* 1995;69:7743-53.

13. Villa L, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18 Preferentially Associated with Cervical Neoplasia. *J Gen Virol.* 2000;81:2959-68.
14. Berumen J, Ordóñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1325-30.
15. Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Lee SK, et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:343-51.
16. Burk RD, Teraï M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res.* 2003;63:7215-20.
17. de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, et al. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol.* 2004;94:488-94.
18. Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, et al. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol.* 2004;74:117-26.
19. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet.* 1998;352:1441-2.
20. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer.* 1996;69:364-8.
21. Rojas W, Parra MV, Campo O, Caro MA, Lopera JG, Arias W, et al. Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *Am J Phys Anthropol.* 2010;143:13-20.
22. Gornick MC, Castellsague X, Sanchez G, Giordano TJ, Vinco M, Greenson JK, et al. Human papillomavirus is not associated with colorectal cancer in a large international study. *Cancer Causes Control.* 2010;21:737-43.
23. van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol.* 2002;40:779-87.
24. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003;158:486-94.
25. Schlecht NF, Burk RD, Palefsky JM, Minkoff H, Xue X, Massad LS, et al. Variants of human papillomaviruses 16 and 18 and their natural history in human immunodeficiency virus-positive women. *J Gen Virol.* 2005;86:2709-20.
26. Molano M, Huertas-Salgado A. A Method for Detection and Identification of HPV 16 Variants Using Primers and Probes. World Intellectual Property Organization (WIPO) 2010. PCT No: WO/2010/125420. Disponible en "http://www.wipo.int/pctdb".
27. Sánchez GI, Kleter B, Gheit T, van Doorn LJ, de Koning MN, de Sanjosé S, et al. Clinical evaluation of polymerase chain reaction reverse hybridization assay for detection and identification of human papillomavirus type 16 variants. *J Clin Virol* 2011;51:165-9.
28. R Project for Statistical Computing. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 [internet]. 2010. [citado: 25 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.R-project.org>
29. Bravo MM. Variantes moleculares en el gen L1 del virus del papiloma humano tipo 16, y regiones de la proteína L1 probablemente involucradas en la interacción virus-célula epitelial. *IATREA.* 2004;17:314.
30. 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;80:1639-45.
31. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992;52:743-9.
32. Bosch FX, Muñoz N, de Sanjosé S, Navarro C, Moreo P, Ascunce N, et al. Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: a case-control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993;2:415-22.
33. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer.* 2006;95:1459-66.
34. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy

- up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*. 2006;367:1247-55.
35. Denny L, Kuhn L, Hu CC, Tsai WY, Wright TC, Jr. Human papillomavirus-based cervical cancer prevention: long-term results of a randomized screening trial. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:1557-67.
36. Huertas-Salgado A. Presencia y persistencia de variantes de VPH 16 en mujeres con citología normal y en mujeres que desarrollaron lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado, de la cohorte de Bogotá. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2008.
37. Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*. 2002;87:324-33.
38. López-Revilla R, Pineda MA, Ortiz-Valdez J, Sánchez-Garza M, Riego L. Human papillomavirus type 16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosí City, Mexico. *Infect Agent Cancer*. 2009;4:3.
39. González-Losa M, Laviada Mier y Tera M, Puerto-Solis M, García-Carranca A. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol*. 2004;29:95-8.
40. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Muñoz N, Bosch FX, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997;71:2463-72.
41. Bedoya G, Montoya P, Garcia J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal L, et al. Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7234-9.
42. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem*. 1991;39:351-4.
43. García P, Benavente F, Melo A, Roa I, Roa JC. Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Rev Españ Patol*. 2006;39:5.
44. Steinau M, Patel SS, Unger ER. Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2011;13:377-81.
45. Quint KD, 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;117:297-301.
46. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, et al. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2011;121:32-42.
47. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated Cancer. *Nature*. 1998;393:229-34.
48. Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky, Jackman A, et al. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology*. 2006;350:216-27.
49. Zehbe I, Mytilineos J, Wikstrom 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;64:538-42.
50. Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD, et al. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol*. 2005;79:7014-23.