



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Tesis de Doctorado

Identificación y caracterización molecular de Papillomavirus Humanos con diferente tropismo

Bióloga Elisa María Bolatti

Rosario, Argentina

2016

Identificación y caracterización molecular de Papillomavirus Humanos con diferente tropismo

Elisa María Bolatti

Bióloga

Universidad Nacional de Córdoba

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Laboratorio de Virología Humana del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET) y en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), durante el período comprendido entre Abril de 2011 y Marzo de 2016, bajo la dirección de la Dra. Adriana A. Giri y la co-dirección del Dr. Diego Chouhy.

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todos, los que de alguna u otra manera, hicieron posible la finalización de este camino.

En primer lugar le agradezco a Adriana, mi directora, que allá por 2010, me recibió con los brazos abiertos, no dudó de mí aún sin conocerme. Por enseñarme a aprender de mis errores, por la paciencia, por las risas, por bajarme a tierra cada vez que mi ansiedad me sobrepasaba, por preocuparse por mí, por ser más que una jefa... Gracias Mencha por todo!

A Daniela y María Rosa por abrirme las puertas de la cátedra, por ser tan receptivas, por todo el cariño. A Dani especialmente por ser mi tutora, por enseñarme y guiarme. También le agradezco a la Dra. Graciela Scharowsky quien fue mi tutora de tesis y supo aconsejarme, guiarme y se tomó el tiempo necesario para leer y corregir mis trabajos.

A Miguel, por ser tan generoso, por tener siempre una sonrisa, por las bromas, por su disposición a ayudarme siempre.

A Hebe por el análisis estadístico de los datos, por la paciencia y predisposición. A Rubén por aclarar mis dudas y ayudarme en el análisis clínico de los datos.

Un agradecimiento especial para los Dres. Mario Poljak, Bostjan Kocjan y Lea Hozajak del Instituto de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Liubliana (Eslovenia), por recibirme en su laboratorio y permitirme realizar parte de los experimentos que forman parte de esta tesis.

Gracias de corazón a Sara, que sabe escucharme, y ha llegado a ser un apoyo importante en el final de esta etapa.

Quiero agradecerle por todas las experiencias vividas en estos 5 años a cada uno de los que me acompañaron en el laboratorio. A Ana Laura por transmitirme sus experiencias, por entender mis comentarios y reírse conmigo, a Amalia por la buena onda, a Sergio por ayudarme a dar los primeros pasos en la bioinformática, a Emma por su predisposición a ayudar y transmitir sus conocimientos.

A mis amigos, los Divorciados de SSS9... A Lola, por estar siempre, por su risa, su alegría, su enorme corazón; a Ale, por su tranquilidad que se transmite y por ser taaaan buena; a Rox, por sus palabras justas, en el momento justo, aunque a veces sean duras, son necesarias! A Flor, por ser tan especial, por esta amistad tan linda que empezó con tropiezos; a Clau por ser tan transparente, por su bondad, A mi melli, Nadica, por ser lo que necesitaba en el momento que lo necesite; a Marinica, por ser mi complemento, por esas miradas que hablan sin hablar, por compartir tanto, por estar ahí, por esos abrazos; a Pablito, porque no van a alcanzar las hojas de esta tesis para agradecerle, por su predisposición a ayudarme siempre, por llevarme el apunte en mis ocurrencias, por las risas, los mates fuentones, las charlas, los momentos, los chistes y sobre todo, por su complicidad; a Germán por su profesionalismo, por ayudarme y contestar todas mis preguntas, por sus palabras justas y sinceras; a Fede (Checho), por su inocencia, por su humor y por hacerme reír siempre, por ayudarme a volver a encontrar a Dios. A Konejo por los momentos y las risas. A todos ustedes (y a sus retoños Lolo, Maiqui, Luca, Guada y mini Melli) gracias por hacer este camino muchísimo más fácil y más lindo.

A mis amigas, por nunca dejarme caer, por estar al pie del cañón, por escucharme y preocuparse por mí. En especial quiero agradecerles a mis amigas del alma; a Ceci, por haberme bancado estos 5 años desde que llegué a Rosario, por todas las charlas, por levantarme el ánimo, por confiar en mí, por estar siempre, a Vani por entenderme y escucharme tanto, por ser tan parecidas y por nunca dejarme sola y a Verito por ser una de las

personas más importantes para mí, por ayudarme, contenerme y alentarme a la distancia, lejos pero cerca siempre!. A mis amigas de toda la vida Eve, Enana y Maui, por estar siempre y aguantarme tantos años.

A mi familia, por confiar en mí más que yo misma, por creer en mí, por alentarme y por estar tan pendientes.

A mis hermanas y a Emi y Pablo por preocuparse por mí, por consentirme, por darme a las personas más importantes de mi vida, mis sobrinos. A mi mamá, por enseñarme todo lo que sé de la vida, por llevarme por los pasos de la biología, por enseñarme a ser mejor persona y forjar mis valores. A mi papá, porque en los pocos años que estuvimos juntos sentó las bases de lo que soy, por darme las fuerzas para superarme, gracias papá por ser mi luz...

Les agradezco profundamente a mis sobrinos, Cata, Toto, Juanchi, Pepi y Cae por enseñarme otra manera de querer, por hacerme feliz, porque son los que me dan fuerza cada vez que caigo.

A mi tía Nana, por vivir por y para nosotras, por cada rezo y por creer y confiar tanto en mí.

A Lisandro, por esos abrazos y por tener las palabras justas cuando lo necesito, por la paciencia, por dejarme ser (y que se me pase sola), por entenderme, por la confianza, por sufrir y alegrarte conmigo, por ser mi amigo, mi compañero y mi amor...

A Naomi, por su incondicional amor y compañía, que fue indispensable en todos los momentos de mi vida y sobre todo en este.

Por último, y no por eso menos importante (al contrario), quiero agradecerle profundamente a una persona sin la cual esta tesis no hubiese sido posible, a mi co-director Diego Chouhy, porque no van a alcanzar las palabras para darle las gracias, por la paciencia, por enseñarme que equivocarse no importa, lo importante es aprender de los errores, por los "retos" (merecidos), por bajar mi ansiedad, por la sinceridad, por dejarme ser, por tomar mi mano cuando lo necesité y soltarla cuando se dio cuenta de que podía volar (aunque me resistía), por acompañarme en cada paso, por contestar todas mis preguntas, por confiar en mí, por sus palabras de aliento y por sus silencios, por su calidad de persona, por enseñarme a no solo a ser mejor profesional, sino a ser mejor persona. Gracias Chui por ser tan buen compañero y amigo. Te quiero!!!

A mis sobrinos

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

Trabajos publicados y enviados a publicar

- Chouhy D, **Bolatti EM**, Perez GR, Giri AA. “Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types”. *Journal of General Virology* 2013;94(11):2480-2488.
- Bostjan J Kocjan, Anja Terbenc, Lea Hosnjak, Diego Chouhy, **Elisa M Bolatti**, Adriana A Giri, Mario Poljak. *Genome announcement: complete genome sequence of a novel Mupapillomavirus, HPV204. Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica* (ISSN 1581-2979) 2015;24:21-23.
- **Elisa M. Bolatti***, Diego Chouhy*, Pablo E. Casal, Germán R. Pérez, Emma J. Stella, Adriana Sanchez, Ramón Fernandez-Bussy, Adriana A. Giri. *Characterization of novel human papillomavirus types 157, 158 and 205 from healthy skin and recombination analysis in genus γ -Papillomavirus. Infection, Genetics and Evolution* 2015 (enviado).

Presentaciones en reuniones científicas

- Chouhy Diego; Paolini Francesca; **Bolatti Elisa**; Giri Adriana A; Venuti Aldo. HPV in oral cavity: different methods for the detection of a large number of Alpha-PV and Beta-PV genera. *ICGEB DNA Tumour Virus Meeting*. Trieste (Italia), 19-24/07/2011.
- **Bolatti Elisa**; Chouhy Diego; Paolini Francesca; Venuti Aldo; Giri Adriana A. HPV en la cavidad oral: aplicación de diferentes métodos para la detección de un amplio número de géneros de HPV. *X Congreso Argentino de Virología, III Simposio de Virología Clínica y I Simposio de Virología Veterinaria. Asociación Argentina de Microbiología*. Buenos Aires, 26-29/09/2011.
- Nocito Ana L; Montenegro S; **Bolatti Elisa**; Rathge Juan Pablo; Rulloni German; Chouhy Diego; Giri Adriana A. Correlación anatomopatológica y molecular de la infección por papilomavirus humanos en mucosa laríngea. *Curso Internacional de la Sociedad Argentina de Patología (SAP)*. Mendoza 6-7/11/2011. **Premio al mejor trabajo presentado en el Curso Internacional SAP 2011.**
- Nocito A, Montenegro S, **Bolatti E**, Rathge J, Rulloni G, Chouhy D, Giri A. “Correlación anatomopatológica y molecular de la infección por papilomavirus humanos en mucosa laríngea”. *II Foro del Hospital Universitario - I Jornada Científica del Hospital Provincial del Centenario*. Rosario, 21/11/2011.

- **Bolatti EM**; Chouhy D; Perez GR; Piccirilli G; Quattrocchi C; Fernandez Bussy R Jr; Sánchez A.; Fernandez Bussy R.; Giri AA. “Identificación de nuevos tipos de HPV por una nueva estrategia de PCR genérica y altamente sensible para fragmentos largos de ADN”. *XXXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología*. Encuentro. Valle Hermoso, 12/2012. Comunicación oral (expositora).
- **Bolatti EM**, Mamprin D’Andrea R, Giri AA, Chouhy D. “Epidemiología molecular de la infección por HPV en cérvix de mujeres infectadas y no vacunadas”. *VI Jornada de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Rosario*. Jornada. Rosario, 11/2012. Poster (disertante).
- **Bolatti Elisa**; Piccirilli Gustavo; Quattrocchi Cristian; Sanchez Adriana; Fernandez Bussy Ramón; Giri Adriana A; Chouhy Diego. Identificación del HPV-156, el prototipo de una nueva especie del género gama-papillomavirus, mediante una estrategia de PCR genérica y altamente sensible para fragmentos largos de ADN. *XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario*. Rosario, 29-30/11/2012.
- **Bolatti E**, Chouhy D, Perez GR, Casal P, Giri AA. “Aplicación de una estrategia de amplificación genérica para identificar nuevos genomas de papillomavirus humanos”. *XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores. AUGM*. Corrientes (Argentina) 14-16/09/2013. Presentación oral (disertante). **Premio a la mejor presentación oral del núcleo Virología Molecular**. (ISBN: 978-987-3619-00-7).
- **Elisa M. Bolatti**; Diego Chouhy; Pablo E. Casal; Emma J. Stella; Adriana A. Giri. “Molecular epidemiology of HPV in cutaneous and mucosal epithelia from individuals with different immunological status”. *First ICGEB Workshop Human Papillomavirus*. Rosario, Argentina. 19-21/11/2014. Poster.
- Ramon Fernandez Bussy; **Elisa Bolatti**; Jesica Nipoti; Diego Chouhy; Gustavo Piccirilli; Adriana Sanchez; Adriana Giri; Ramon Alfredo Fernandez Bussy “Incidencia y persistencia de la infección por papilomavirus humanos en piel sana expuesta a la luz solar”. *XX Congreso Iberoamericano de Dermatología*. Rio de Janeiro. 15-18/11/2014 Poster
- **Bolatti, Elisa M**; Chouhy, Diego; Casal, Pablo E; Stella, Emma J; Gardiol, Daniela; Giri, Adriana A. “Molecular epidemiology of HPV in healthy skin from immunosuppressed and immunocompetent individuals”. *L Reunión anual SAIB 2014*. Rosario, Argentina. 11-14/11/2014. Poster. Resumen publicado en *BioCell* 38 (Supl. 2) 2014 (ISSN 0327 - 9545 (versión impresa) - ISSN 1667 - 5746 (versión on-line)
- Chouhy D., **Bolatti E.M.**, Casal P.E., Stella E.J., Giri A.A. “Estudio de la infección persistente de Papilomavirus Humanos con tropismo cutáneo en individuos sanos de la ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina.” *XI Congreso Argentino de Virología y II Congreso Latinoamericano de Virología*. Buenos Aires 23-26/06/2015. Poster

- Sanchez, Adriana; Fernandez Bussy (h), Ramon; Nipoti, Jesica; Piccirili, Gustavo; **Bolatti, Elisa**; Chouhy, Diego; Casal, Pablo; Stella, Emma; Giri, Adriana, Fernandez Bussy Ramon A. “Molecular epidemiology of HPV in healthy skin from immunosuppressed and immunocompetent individuals.” *XXIII Congreso mundial de Dermatología.* Vancouver, Canadá 8-13/06/2015
- Bostjan J. Kocjan; Lea Hosnjak; Anja Sterbenc; Diego Chouhy; **Elisa Bolatti**; Adriana A. Giri; Mario Poljak. Molecular characterization and tissue tropism of a novel mupapillomavirus HPV204. *30th International Papillomavirus Conference. International Papillomavirus Society.* Lisboa (Portugal), 17-21/09/2015.
- **Bolatti E.M.**, Chouhy D., Casal P.E., Stella E.J., Sanchez A., Fernandez-Bussy R., Giri A.A “Persistence of human papillomavirus infection in sun-exposed skin of healthy individuals from Rosario City, Argentina” *ICGEB DNA Tumor Virus Meeting 2015.* Trieste (Italia), 21-26/07/2015
- Rubén Mamprín D’Andrea, **Bolatti E**, Chouhy D, Cavatorta A, Soso G, Giri A: “Evolución Clínica y Viroológica de Pacientes con Lesiones Preinvasoras de Cervix”. *XXX FASGO.* Rosario 14-16/10/2015. Póster

*Si no puedes volar, corre.
Si no puedes correr, camina.
Si no puedes caminar, gatea.
Pero hagas lo que hagas, siempre sigue hacia
ADELANTE.*

-Martin Luther King-

ÍNDICE

1.	Introducción	1
1.1	Historia del descubrimiento de los papilomavirus y su asociación con el cáncer.....	1
1.2.	Familia Papillomaviridae	1
1.2.1	Nomenclatura de los PV	2
1.2.2	Clasificación filogenética de la familia <i>Papillomaviridae</i>	3
1.3.	Papilomavirus Humano	5
1.3.1	Identificación de nuevos tipos de HPV	6
1.3.2	Organización genómica de los HPV	9
1.3.3	Ciclo de replicación viral y oncogénesis asociada a los HPV	11
1.3.4	HPV Mucosotrópicos	13
1.3.4.1	Patologías asociadas a la infección por HPV mucosotrópicos: Cáncer Cervical	13
1.3.4.1a	Tamizaje y Tratamiento de lesiones precancerosas y cáncer cervical	15
1.3.4.2	Vacunas profilácticas contra HPV mucosotrópicos	18
1.3.4.3	Prevalencia de la infección por HPV mucosotrópicos.	20
1.3.4.4	Persistencia de la infección por HPV mucosotrópicos.....	23
1.3.5.	HPV cutaneotrópicos	24
1.3.5.1	Patologías asociadas a los HPV cutaneotrópicos: Cáncer de piel no melanoma y verrugas	24
1.3.5.2	Epidemiología de HPV cutaneotrópicos	25
1.3.6.	HPV y tropismo.....	27
1.4	Evolución de los PV	28
1.4.1	Recombinación en PV	28
2.	Objetivos	29
2.1	Objetivo General	30
2.2	Objetivos específicos.....	31
3.	Materiales y Métodos.....	31
3.1.	Pacientes y muestras clínicas	32
3.1.2	Características del estudio epidemiológico de la infección por HPV en piel (epitelios cutáneos)	33
3.1.3	Procesamiento de muestras clínicas	33
3.1.3.1	Procesamiento de muestras clínicas cervicales	33
3.1.3.2	Procesamiento de muestras clínicas de piel	34
3.2	Reacción en cadena de la polimerasa.....	34
3.2.1	Diseño de cebadores.....	34
3.2.2	PCR para la amplificación del gen de la β -globina	35
3.2.3	PCR de colonias	36
3.3	Estrategias para el tamizaje de HPV	36
3.3.1	Estrategias para el tamizaje de HPV en cérvix.....	36
3.3.1.1	Sistema L1HPVPCR 16.4.1	36
3.3.1.1.1	Soluciones utilizadas para la detección colorimétrica en microplacas.....	39
3.3.1.2	Sistema de amplificación CUT	40
3.3.2.	Estrategias para el tamizaje de HPV en piel.....	41
3.3.2.1	Sistema de amplificación FAP	41
3.3.2.2	PCR altamente sensible para fragmentos largos: Caracterización de nuevos tipos de HPV	42
3.3.2.2.1	Diseño de cebadores para la “PCR altamente sensible para fragmentos largos”.	44
3.4	Análisis de secuencias y filogenia.....	44
3.4.1	Análisis de secuencias y filogenia de HPV amplificados con los sistemas CUT y FAP.	44

3.4.2	Análisis de secuencias y filogenia de nuevos tipos de HPV caracterizados con el sistema “PCR altamente sensible para fragmentos largos”	45
3.4.3	Análisis de recombinación en tipos de HPV del género Gama PV.	45
3.5	Plásmidos	46
3.6	Condiciones y medios de cultivo.	46
3.6.1	Medios de cultivo para células bacterianas.	46
3.7	Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.	46
3.7.1	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	46
3.7.2	Purificación de productos de PCR y ADN plasmídico	47
3.7.3	Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	48
3.7.4	Estimación de la concentración de ADN.	48
3.7.5	Clonado.....	48
3.7.5.1	Ligación de moléculas de ADN.....	49
3.7.5.2	Transformación de células <i>E. coli</i> por electroporación.....	49
3.7.5.3	Transformación química de células <i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen, EE.UU)	50
3.8	Análisis Estadístico.....	50
4.	Resultados.....	51
I.	Epidemiología de la infección por HPV en cérvix de mujeres con diagnóstico de patología cervical.....	51
4.I	Consideraciones generales.....	51
4.I.1	Análisis de la competencia del sistema L1HPVPCR para detectar 15 tipos de HPV mucosotrópicos.	51
4.I.1.1	Mejora en el desempeño del sistema L1HPVPCR para la identificación de los tipos HPV18 y HPV45	52
4.I.1.2	Sistema L1HPVPCR versión 16.4.1: Optimización de las condiciones de amplificación y detección con los nuevos cebadores específicos para HPV18 y HPV45	52
4.I.2	Análisis de la prevalencia y persistencia de la infección de HPV en cérvix de mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical de la provincia de Santa Fe.....	55
4.I.2.1	Descripción de la población y diseño experimental	55
4. I.2.2	Prevalencia de la infección por HPV y distribución de tipos en mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical.....	56
4. I.2.2.1	Análisis de los resultados obtenidos con el sistema de cebadores CUT y el ensayo L1HPVPCR versión 16.4.1.....	56
4.I.2.2.2	Análisis de los indicadores de la población en estudio en relación a la infección por HPV	58
4.I.2.2.3	Distribución general de genotipos de HPV y de acuerdo a la citología/histología.....	61
4.I.2.3	Análisis de la evolución virológica y clínica en mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical	63
4.I.2.3.1	Análisis de la evolución de la infección por HPV según el tipo de tratamiento: Expectante Vs. Quirúrgico.....	64
4.I.2.3.2	Análisis de la evolución clínica de 68 mujeres con patología cervical	66
4.I.2.3.2.1	Análisis de la evolución clínica (citología) en relación a la evolución de la infección por HPV en las mujeres recibieron Tratamiento Expectante	67
4.I.2.3.2.2	Análisis de la evolución clínica (citología) en relación a la evolución de la infección por HPV en las mujeres recibieron Tratamiento Quirúrgico.	68
II.	Epidemiología de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar de individuos inmunocompetentes.....	70
4.II.	Consideraciones generales.....	70
4.II.1.	Descripción de la población y diseño experimental	70

4.II.2.	Comparación del desempeño de los sistemas de cebadores CUT y FAP para la identificación de HPV en muestras de piel sana expuesta a la radiación solar.	72
4.II.2.1	Análisis filogenético de los tipos/tipos putativos identificados en este trabajo	77
4.II.3.	Características de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar de individuos inmunocompetentes	79
4.II.3.1	Análisis de la prevalencia de la infección por HPV en 3 estaciones climáticas	80
4.II.3.2	Análisis de la persistencia de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar en 3 estaciones climáticas y de la posible asociación con factores demográficos y de comportamiento	81
4.II.3.2.1	Análisis de la posible asociación de factores demográficos y de comportamiento con el estado de la infección por HPV en piel sana expuesta a radiación solar	85
III.	Caracterización de nuevos tipos de HPV y análisis de eventos de recombinación en el género Gama PV	88
4.III.1	Caracterización de nuevos tipos de HPV identificados en muestras de piel sana expuesta a radiación solar.	88
4.III.1.1	Amplificación de mitades genómicas de potenciales tipos nuevos con cebadores genéricos	88
4.III.1.2	Amplificación de las mitades genómicas de los potenciales tipos nuevos identificados con cebadores específicos.	91
4.III.1.3	Caracterización de los nuevos tipos HPV205, HPV209 y HPV210	93
4.III.2.	Análisis “ <i>in silico</i> ” de posibles eventos de recombinación en el género Gama PV	98
4.III.2.1	Búsqueda de posibles eventos de recombinación en el género Gama PV con el programa RDP4.1	98
4.III.2.2	Análisis de incongruencia filogenética.....	101
5.	Discusión	103
6.	Conclusiones	123
7.	Bibliografía	126
Anexo I	141
Anexo II	150

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Alfa PV	Alfapapilomavirus
Ampr	Ampicilina resistente
anti-F	Anticuerpo anti-Fluoresceína
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
Beta PV	Betapapilomavirus
BPP	Bayesian Posterior Probability
BSA	Albúmina sérica bovina
CCB	Carcinoma cutáneo de células basales
CCE	Carcinoma cutáneo de células escamosas
CCE	Carcinoma cutáneo de células escamosas
CIN	Neoplasias cervicales intraepiteliales
CN	Control negativo
CP	Controles positivos
CPNM	Cáncer de piel no melanoma
CR	Control de reactivos
dNTP	Desoxiribonucleótidos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiamintetra-acético
EIA	Enzimoimmunoanálisis
EV	Epidermodisplasia verruciforme
F	Género Femenino
FDA	Administración federal de drogas y alimentos de los EE.UU
g	Constante de gravedad
Gama PV	Gamapapilomavirus
GE	Equivalente en genoma
HPV	Papilomavirus humanos
HPV+	Individuos positivos para ADN de HPV
HPV-	Individuos negativos para ADN de HPV
HPV AR	Tipos de HPV mucosos de alto riesgo oncogénico
HPV BR	Tipos de HPV mucosos de bajo riesgo oncogénico
hs	Horas
H-SIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales de alto grado
IC 95	% Intervalo de confianza del 95%
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de los Virus
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
ITS	Infección de transmisión sexual
Kanr	Kanamicina resistente
kb	Kilo bases

kpb	Kilo pares de bases
kV	Kilovoltios
LB	Luria Bertani
LCR	Región larga de control
L-SIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales de bajo grado
M	Género Masculino
mA	Miliamperios
MCMC	Cadenas de Marco-Monte Carlo
min	Minuto/s
Mu PV	Mupapilomavirus
NILM	Negativo para lesión intraepitelial o malignidad
nts	Nucleótidos
Nu PV	Nupapilomavirus
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Razón de odds
ORF	Marco abierto de lectura
ori	Origen de replicación
Pap	Papanicolaou
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PV	Papilomavirus
QA	Queratosis actínica
QS	Queratosis Seborreica
RFLP	polimorfismo del fragmento de restricción
s	Segundo/s
SFB	Suero Fetal Bovino
SIL	Lesiones Escamosas Intraepiteliales
S.O.C	Medio de cultivo Súper óptimo
TAE	TRIS-acetato-EDTA
TH	Temperatura de Hibridación
TRIS	N-tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidad
UI	Unidades Internacionales
UN	Tipo de HPV desconocido
UV	Radiación ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
VC	Valor de corte
VLPs	Partículas pseudovirales o virus-like particles
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3 indolil- β -D-galactopiranosido
<	Menor a
>	Mayor a

RESÚMEN

Los papilomavirus (PV) son virus epiteliotrópicos con genoma de ADN doble hebra circular, sin envoltura y muy heterogéneos. Al momento se han descrito más de 200 tipos en humanos (HPV): 25% asociados a infecciones de mucosas y 75% a infecciones de piel. Los HPV se distribuyen en 5 géneros en base a la identidad nucleotídica del gen L1. Los HPV mucosotrópicos se agrupan principalmente en el género Alfa PV y son causantes de patologías benignas y malignas de la mucosa anogenital y orofaríngea. En contraste, los HPV cutaneotrópicos se distribuyen en los géneros Alfa, Beta, Gama, Mu y Nu PV y la evidencia científica es inconcluyente sobre su rol en la carcinogénesis cutánea. Dada la gran diversidad genética de estos virus y las distintas interacciones que establecen con el hospedero, es necesario caracterizar la complejidad de la infección por HPV en distintos epitelios para adoptar las medidas de prevención y tratamiento de las enfermedades producidas por estos virus.

El objetivo general de este trabajo de tesis incluyó avanzar en el conocimiento de la familia *Papillomaviridae* mediante la identificación y caracterización de la infección por HPV en epitelios cutáneos y mucosos en nuestra región para contribuir a la taxonomía y a la vigilancia epidemiológica a nivel molecular. Para ello se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1) Se realizó un estudio longitudinal y descriptivo para identificar los tipos de HPV mucosotrópicos que circulan en cérvix en una población de mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical que concurrieron al Hospital Escuela “Eva Perón” de la ciudad de Baigorria, provincia de Santa Fe ($n=115$). Las muestras se analizaron utilizando dos sistemas de amplificación de HPV en forma conjunta, ambos desarrollados en el laboratorio: el L1HPVPCR 16.4.1, que utiliza los cebadores de referencia MY09/11 y ha sido definido competente para la identificación de 15 tipos mucosos según los criterios de la *WHO HPV LabNet*, y el sistema de cebadores CUT, con probada capacidad para amplificar tipos de HPV que infectan epitelios mucosos y cutáneos. La prevalencia de infección en esta población fue del 85% y los tipos más frecuentes fueron HPV16 (25%) y HPV31 (13%). Sucesivamente realizó un estudio de persistencia de la infección por HPV en 68 mujeres de esta población durante un periodo promedio de 24 meses. De las 45 mujeres que recibieron tratamiento expectante (observación de la evolución de la lesión semestralmente), 29% erradicó la infección, 29% se infectó con tipos diferentes al de la muestra de ingreso, 38% tuvo infección viral persistente y 4% fue HPV-negativa durante el estudio. Entre las 23 que recibieron tratamiento quirúrgico, el 48% erradicó la infección, 35% se infectó con tipos diferentes y 17% tuvo infección viral persistente. Los tipos persistentes más frecuentes en ambos grupos fueron HPV16 y HPV31. En cuanto a la evolución clínica, la mayoría de las mujeres evolucionaron favorablemente al final de estudio (100% contratamiento quirúrgico, 62% con

tratamiento expectante). Estos resultados aportan nueva información sobre la prevalencia y persistencia de HPV en mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical del sur de la provincia de Santa Fe y sienta las bases para evaluar a futuro el impacto de la vacunación masiva contra HPV.

2) Teniendo en cuenta que la radiación solar se ha relacionado con la infección por HPV y que Argentina se encuentra en una región de alto riesgo de exposición a UV por el paso del agujero de ozono entre Septiembre y Noviembre, se realizó un estudio longitudinal y descriptivo para analizar la epidemiología de la infección por HPV en piel sana expuesta a radiación solar de 78 individuos inmunocompetentes en 3 estaciones climáticas durante 1 año. Las muestras se analizaron con dos sistemas de amplificación de HPV en forma conjunta: el sistema CUT y el ensayo FAP considerado de referencia para el análisis de HPV en piel. La prevalencia de infección en primavera fue mayor que en verano e invierno (53.9% vs 44.9% y 47.4% respectivamente), coincidiendo con el paso del agujero de ozono. El 29% de los voluntarios tuvieron infecciones persistentes con al menos un tipo de HPV, siendo los miembros del género Beta PV los tipos más persistentes, específicamente el HPV5 (Beta 1). La mayor edad de los voluntarios se asoció significativamente con mayor persistencia de la infección por HPV ($p=0,019$). Estos resultados sugieren que la radiación solar influye en la adquisición de la infección por HPV en piel y que estos virus persisten en los individuos por un periodo de al menos 1 año sin inducir daños en el tejido.

3) A fin de proveer nuevos virus desde la región, se caracterizaron los genomas completos de 3 tipos nuevos identificados en piel sana expuesta a radiación solar utilizando una estrategia altamente sensible para la amplificación de genomas circulares desarrollada en el laboratorio. Los nuevos tipos caracterizados son HPV 205 (Gama 1), HPV210 (Gama 12) HPV209 (Beta 2). Sucesivamente exploramos la recombinación como posible fuerza evolutiva en el género Gama PV utilizando una base de datos actualizada y el programa RDP4.1. Se identificaron 2 eventos putativos de recombinación, ambos ubicados en el ORF E1, que cumplieron con el criterio de inclusión: un evento intra-especie entre miembros de la especie Gama 7 (recombinante: HPV170, parental mayor: HPV109, parental menor: HPV149) y un evento inter-especie que se detectó en todos los tipos agrupados en la especie Gama 8 (parental mayor: Gama 24, parental menor: especie Gama 11). Estos hallazgos se confirmaron por análisis de incongruencia filogenética. Estos aportes contribuyen a completar la taxonomía y proveen nuevas evidencias para comprender mejor la historia evolutiva del género Gama PV.

En conclusión, los resultados obtenidos en conjunto contribuyen a expandir el conocimiento sobre la familia *Papillomaviridae*, información esencial para dilucidar el rol que cumplen las infecciones por estos virus en distintos epitelios.

1. Introducción

1.1 Historia del descubrimiento de los papilomavirus y su asociación con el cáncer.

La historia del descubrimiento de los virus oncogénicos con genoma ADN se remonta más de 100 años atrás cuando el italiano Giuseppe Ciuffo en 1.907 se auto-inoculaba con filtrados de verrugas humanas libres de células y así transmitía la lesión [1].

En 1933, Richard Shope y E. Weston Hurst demostraron la transmisión de verrugas infiltrando conejos salvajes [2] y en 1935 Peyton Rous y Joseph Beard revelaron el potencial carcinogénico de estas verrugas virales, ahora llamado papilomavirus de conejo de cola blanca [3]. Si bien no pudieron replicar y transmitir verrugas del conejo de cola blanca en el conejo doméstico, demostraron que el desarrollo de carcinomas de piel era frecuente luego de un prolongado periodo de tiempo, particularmente a partir de papilomas pigmentados [3].

Una relación entre Papilomavirus (PV) Humanos (HPV) y oncogénesis fue luego propuesta en base a micrografías electrónicas y experimentos realizados sobre una rara enfermedad de la piel llamada epidermodisplasia verruciformis (EV) [4]. Esta patología se manifiesta por la aparición de lesiones papilomatosas en grandes áreas de la piel expuesta a la luz solar, algunas de las cuales pueden convertirse en un tipo de cáncer de piel luego de una o dos décadas de persistencia.

El PV bovino fue descubierto en 1.959 y se demostró que inducía tumores malignos en piel y mucosa [5]. Este descubrimiento fue la base a partir de la cual Harald zur Hausen propuso en 1.974 al HPV como agente etiológico del cáncer cervical [6]. A partir de 1.977 se reportó la existencia de distintos tipos de HPV en trabajos realizados sobre lesiones de pacientes con EV [7,8].

En 1.983/84 se identificaron nuevos tipos de HPV en biopsias de carcinomas genitales y en líneas celulares derivadas de cáncer cervical [9,10]. Estos tipos denominados, HPV16 y HPV18, se agruparon, junto con otros, dentro de los tipos de alto riesgo oncogénico (AR) para distinguirlos de los tipos de bajo riesgo oncogénico (BR).

Sucesivamente se establecieron asociaciones de los mismos tipos de AR con el cáncer de ano, pene y de cabeza y cuello [11]. Estos virus en conjunto representan una de las causas más importantes del desarrollo de cáncer en humanos y han sido incorporados dentro del Grupo 1 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer o IARC (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*), que incluye agentes con suficiente evidencia de carcinogenicidad en humanos [12].

1.2. Familia *Papillomaviridae*

Los PV son un grupo heterogéneo de virus sin envoltura con una cápside icosaédrica de 55 nm de diámetro y un genoma de ADN doble hebra circular de aproximadamente 8 kpb [13].

Los PV fueron originalmente agrupados con los poliomavirus en una sola familia denominada *Papovaviridae*, en base a que ambos grupos de virus poseían cápsides no envueltas y genomas de ADN doble hebra circular [14]. Sin embargo, las diferencias en tamaño, organización genómica y en las secuencias aminoacídicas de sus proteínas, llevaron a que posteriormente fueran reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV, del inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses*) como dos familias independientes: *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae* [14].

Con más de 300 tipos descritos hasta el momento agrupados en al menos 49 géneros, la familia *Papillomaviridae* podría ser la más grande y exitosa familia de virus que infectan a los vertebrados [15,16] (Tabla 1 y Figura 1). Además, se estima que existe un número de tipos de PV similar a los descritos todavía por descubrir [17].

Tabla 1: Número de géneros, especies y tipos agrupados en la familia *Papillomaviridae*

Datos tomados de pave.niaid.nih.gov y www.hpvcenter.se

Género	Especies (n)	Tipos (n)	Huéspedes conocidos
Alfapapillomavirus	15	77	Primates
Betapapillomavirus	7	55	Primates
Gamapapillomavirus	27	81	Humano
Mupapillomavirus	3	3	Humano
Nupapillomavirus	1	1	Humano
Otros	72	123	Otros Mamíferos, Aves, Reptiles, etc.
Total (n)	49	340	

1.2.1. Nomenclatura de los PV

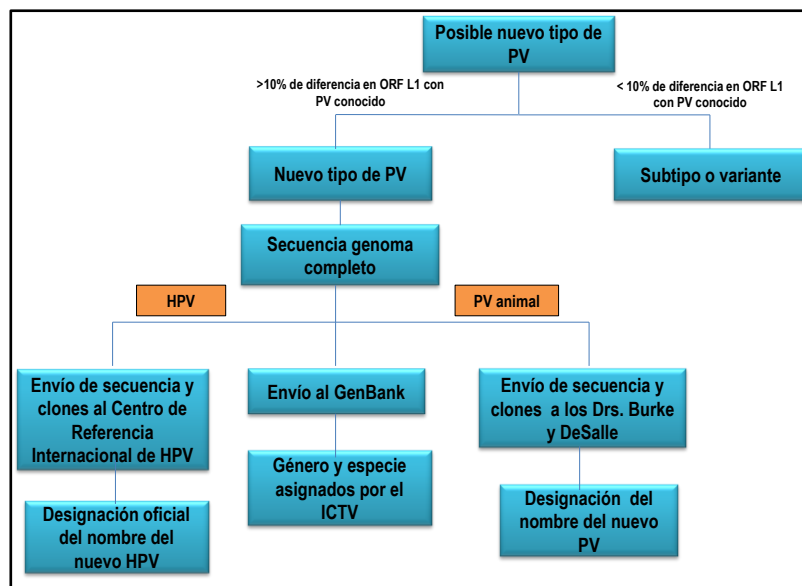
Los papilomavirus se identifican con su abreviatura (PV) y una o dos letras indicando la especie del huésped al cual infectan: HPV para el PV humano, EcPV para el PV de caballo (*Equus caballus*), etc.

El proceso de designación de un nombre para un nuevo tipo de PV se resume en la Figura 1. Cuando se aísla y caracteriza un nuevo tipo es necesario enviar un clon a un Centro de Referencia que luego de confirmar la secuencia y compararla con las secuencias de PV ya identificados se le asigna un nombre oficial [18].

En el caso particular de los HPV, cada tipo nuevo se identifica con un número consecutivo (Ej: HPV-1, HPV-2,..., HPV-124, etc.) según el momento en que fue reportado al Centro de Referencia Internacional para Papiloma Virus Humano (del inglés, *International Human Papillomavirus Reference Center*; German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania hasta 2012, luego trasladado a Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia) (Figura 1). El Centro de Referencia

Internacional para Papiloma Virus Humanos también está a cargo de la organización, envío de paneles y control de los resultados de los laboratorios participantes de la *WHO HPV LabNet* (ver Sección 1.3.4.3).

Figura 1: Representación esquemática de las acciones para que un nuevo tipo de PV sea considerado como tal por la comunidad científica (Adaptado de <http://pave.niaid.nih.gov/>)



Por otro lado, la aceptación de nuevos tipos de genomas de PV animales está basada solamente en el reporte de su secuencia a las bases de datos (GenBank). A pesar de que se han realizado esfuerzos por establecer un Centro de Referencia de Papilomas Animales, aún no han tenido éxito (Figura 1).

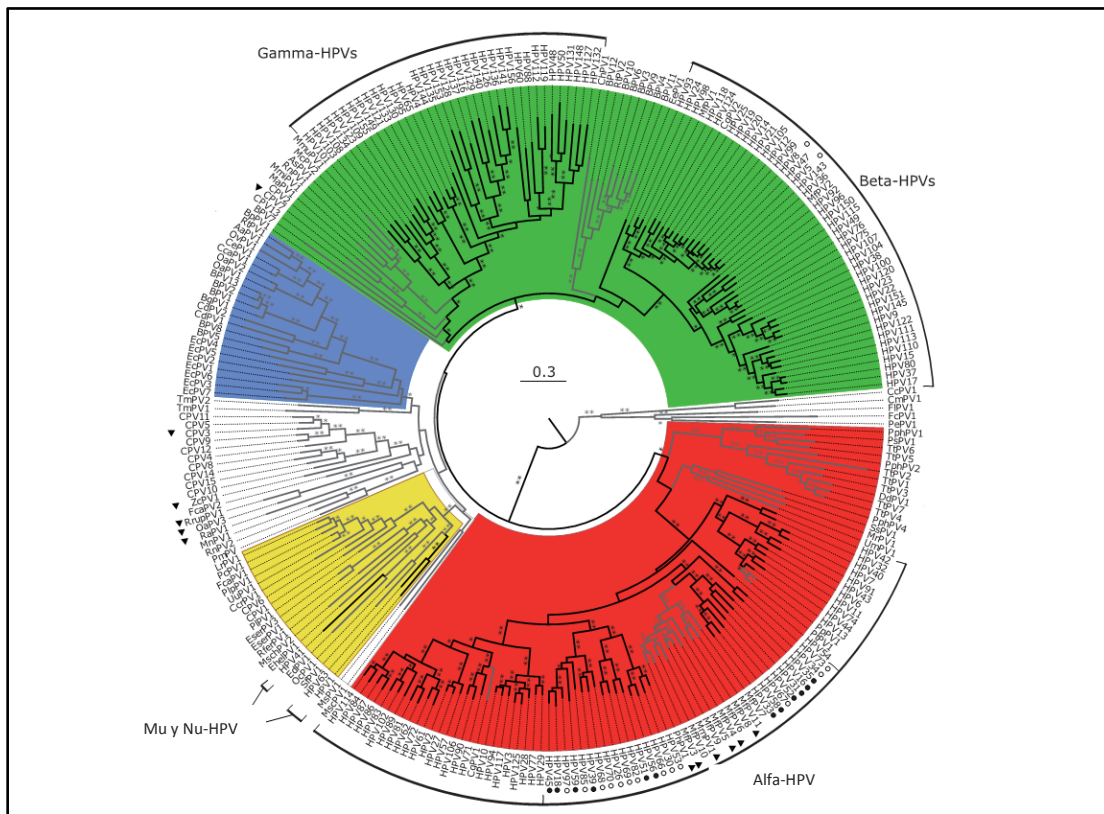
1.2.2. Clasificación filogenética de la familia *Papillomaviridae*.

Durante el *International Papillomavirus Workshop* celebrado en Quebec (Canadá) en 1995, la comunidad científica que estudiaba la taxonomía y biología de los PV acordó utilizar la identidad nucleotídica del gen que codifica para la proteína mayor del cápside L1 (ORF L1), el gen más conservado del genoma de los PV, para clasificar los miembros de la familia. Como resultado de la comparación de las secuencias nucleotídicas de diferentes tipos de PV se definieron las siguientes categorías taxonómicas en la familia *Papillomaviridae*:

- *género*: los diferentes géneros comparten menos del 60% de identidad nucleotídica en el ORF L1;
- *especie*: las especies dentro de un género comparten entre el 60% y el 70% de identidad nucleotídica en el ORF L1;

- *tipo*: los tipos dentro de una especie comparten entre el 71% y el 89% de identidad nucleotídica en el ORF L1;
- *subtipo*: los subtipos de un tipo comparten entre el 90% y el 98% de identidad nucleotídica en el ORF L1;
- *variante*: las variantes de un tipo comparten más del 98% y menos del 100% de identidad nucleotídica en el ORF L1.

Figura 2: Árbol filogenético construido por Maximum likelihood con el concatenado de los genes E1E2L1L2 de 263 PV.



Se indican los “grupos corona” propuestos por Bravo y col. [19] Alfa-Omikron-PV (rojo), Beta-Xi-PV (verde), Lambda-Mu-PV (amarillo), Delta-Zeta-PV (azul) y PV sin soporte filogenético (blanco). Tomado de Bravo y Féliz-Sánchez [20].

Sin embargo, esta clasificación no fue oficial hasta el 2003 en que el ICTV aceptó la clasificación de los PV basado en similitud nucleotídica en el ORF L1 [18]. Si bien la clasificación taxonómica propuesta por de Villiers [18] ha sido de gran utilidad, es necesario tener en cuenta algunas limitaciones que presenta esta organización (Figura 2). Primero, la nomenclatura basada en letras griegas para nombrar entidades taxonómicas será superada a la brevedad debido al gran número de tipos de PV que quedan por ser identificados. Debido a esto en la actual clasificación se agregó el

prefijo “Dyo” seguida de la letra griega [21]. Segundo, la nomenclatura actual está ligada al nombre científico del huésped, lo cual puede llevar a confusiones en varios aspectos. En particular, los nombres asignados a HPV, PV Bovinos (BPV) y Caninos (CPV) podrían implicar que los virus que infectan el mismo huésped estarían relacionados evolutivamente, lo cual no es así (Figura 2). Además, una regla implícita en el sistema de clasificación asume que la primera detección del PV ocurrió en el huésped original. Así, el BPV1, debería llamarse EcPV1 ya que fue identificado originalmente en un caballo. Tercero, el “género” sigue siendo la categoría de mayor nivel jerárquico dentro de la familia *Papillomaviridae* y por definición todos los géneros poseen la misma jerarquía sin ninguna otra estructura más detallada. De esta manera no es posible tener información del grado de relación entre los géneros Alfa PV y Beta PV, los cuales en realidad están poco relacionados: los Alfa PV están más relacionados al TtPV2 (género Upsilon), que causa condilomas en el delfín mular, que a cualquier otro PV que infecta primates. Lo mismo sucede con los Beta PV, que están más relacionados con el EePV1 (género dyoeta) detectados en erizos, que con cualquier otro PV que infecta primates (Figura 2). En este sentido, Bravo y col. [19,20], propusieron un orden de clasificación más alto que “género” para agrupar a los PV, llamado “súper taxón” o “grupos corona” basado en las relaciones evolutivas de los géneros. El súper taxón Alfa-Omikron PV (en rojo en la Figura 2), incluye virus con tropismo mucoso y que infectan a primates, carnívoros, cetáceos y cerdos. El súper taxón Beta Xi PV (en verde en la Figura 2), agrupa PV con tropismo cutáneo y cuyos huéspedes son heterogéneos, incluyendo primates, roedores, carnívoros, rumiantes, erizos y marsupiales. Los PV que infectan perisodáctilos y rumiantes se agrupan en el súper taxón Delta Zeta PV junto a géneros filogenéticamente relacionados a ellos (en azul en la Figura 2). Por último, el súper taxón Lambda Mu PV (en amarillo en la Figura 2), el cual incluye además al género Nu PV, agrupa a virus que infectan primates, roedores, lagomorfos y carnívoros.

La gran diversidad de los PV y el gran número de especies animales que infectan dificulta la elucidación de la historia evolutiva de esta familia. Sin embargo mediante el uso de la taxonomía y la sistemática es posible establecer un enfoque reproducible y experimental en el estudio de los PV [19].

1.3. Papilomavirus Humano

Alrededor de dos tercios de los genomas de PV completamente caracterizados e introducidos en las bases de datos (GenBank) corresponden a HPV [20]. Los más de 200 tipos de HPV caracterizados hasta el momento están distribuidos en 5 géneros [16] y se detallan a continuación (Figura 3 y Tabla 1):

- Alfa papilomavirus (Alfa PV): Este género incluye a todos los HPV con tropismo por epitelios mucosos (HPV mucosotrópicos) y a algunos HPV con tropismo por epitelios cutáneos (HPV cutaneotrópicos).
- Beta papilomavirus (Beta PV): Este género sólo incluye HPV cutaneotrópicos.
- Gama papilomavirus (Gama PV): Este género incluye HPV cutaneotrópicos y una especie (Gama-6) asociada a lesiones de distinto grado en mucosa.
- Mu papilomavirus (Mu PV): Este género incluye sólo 3 tipos de HPV cutaneotrópicos (HPV1, HPV63 y HPV204).
- Nu papilomavirus (Nu PV): Este género incluye un único HPV cutaneotrópico (HPV41)

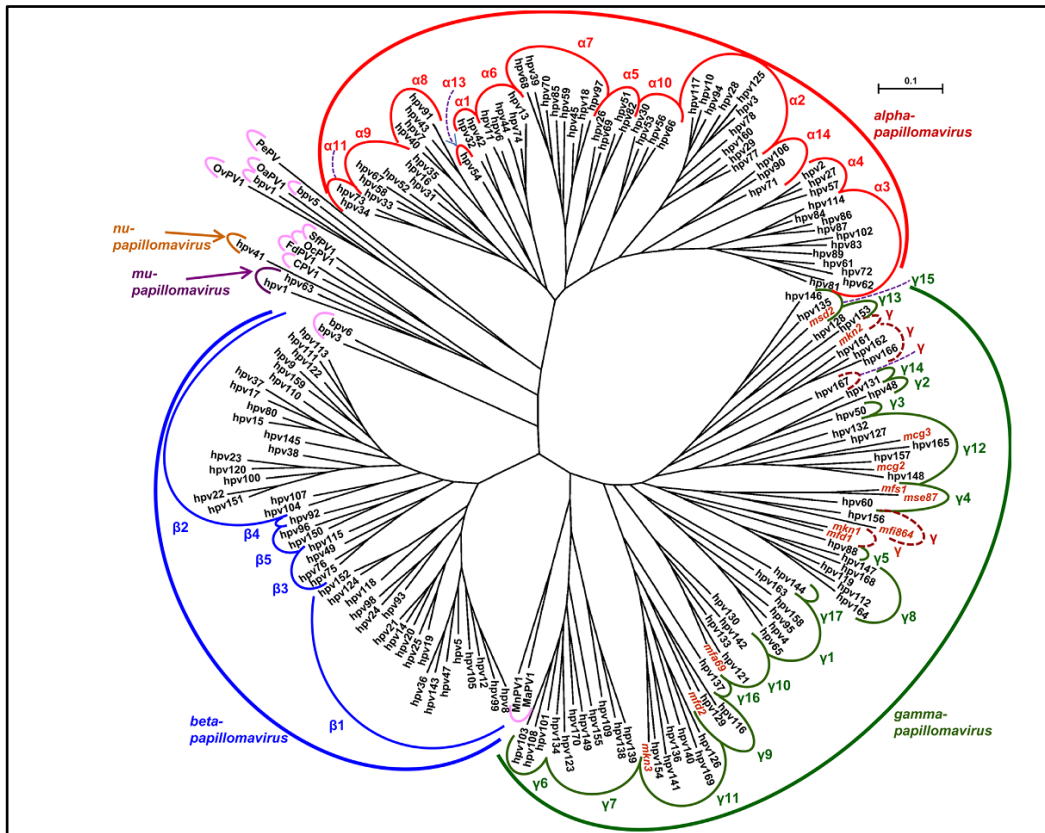
HPV mucosos comprenden más de 40 tipos [22] agrupados en el género Alfa PV. A diferencia de los genotipos de HPV mucosotrópicos, los HPV cutaneotrópicos presentan una mayor heterogeneidad genética y están distribuidos en 5 géneros diferentes (Alfa PV, Beta PV, Gama PV, Mu PV y Nu PV) en la familia *Papillomaviridae* (Figura 3).

1.3.1 Identificación de nuevos tipos de HPV

En los comienzos de las investigaciones relacionadas a HPV, los nuevos tipos eran identificados mediante técnicas de hibridación en condiciones de baja astringencia, utilizando genomas completos o fragmentos de genomas de HPV previamente caracterizados como sondas [10,23,24]. Sucesivamente, a los nuevos genomas identificados con técnicas basadas en amplificación génica se los diferenciaba con el prefijo “Cand” por su palabra en inglés “Candidate” [18].

Con el avènement de nuevas técnicas moleculares el conocimiento sobre la diversidad de los HPV se incrementó. Estas técnicas tuvieron un gran impacto en la epidemiología molecular de HPV y permitieron la identificación de un gran número de posibles tipos nuevos (tipos putativos) de HPV mediante el secuenciamiento de los amplicones [25-29]. El término “tipos putativos de HPV” se refiere a secuencias de amplificación por PCR que no corresponden a ninguno de los tipos de HPV conocidos y que por lo tanto serían nuevos tipos virales. Sin embargo, no se puede afirmar que se trata de un nuevo tipo hasta que no se conozca su genoma completo.

Figura 3: Árbol filogenético construido con secuencias de HPV y PV animales



Árbol filogenético construido con el Método de Máxima Verosimilitud utilizando las secuencias de la región L1 de 170 tipos conocidos de HPV, 13 tipos de HPV caracterizados por metagenómica y 13 PV animales. Tomado de de Villiers [30].

De esta manera, durante los últimos 15 años se han realizado grandes esfuerzos para identificar nuevos genomas de HPV y de PV de otras especies utilizando técnicas de PCR, amplificación por “Rolling Circle” o una combinación de ambas [31-34]. Particularmente en el año 2013, nuestro grupo de trabajo diseñó una técnica de amplificación altamente sensible con cebadores genéricos que permite la amplificación de genomas circulares como el de los PV [35]. Estos avances han permitido que la caracterización de nuevos HPV se incremente de manera exponencial, sobre todo los tipos agrupados en los géneros Beta PV y Gama PV. De esta manera, entre los años 2004 y 2015 se identificaron 107 nuevos tipos de HPV: 8 del género Alfa PV, 26 del género Beta PV, 72 del género Gama PV y 1 del género Mu PV [16,21,36] (Figura 4).

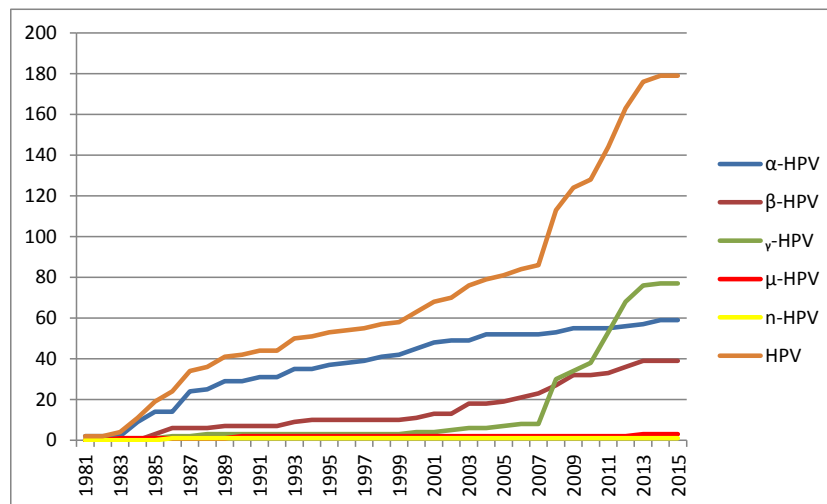
Los HPV también se clasifican de acuerdo al tipo de epitelio al cual infectan, de esta manera, los Considerando que este avance pudo realizarse gracias a la aplicación de técnicas de amplificación y a la solidez de los resultados obtenidos, a partir del año 2010 se eliminó el prefijo “Cand” de los tipos identificados por clonado de productos de PCR [21].

Las tecnologías de secuenciación profunda (metagenómica) han ayudado en la identificación de nuevos tipos que no fueron posibles amplificar mediante cebadores genéricos debido, probablemente, a la alta divergencia que existe entre los PV [34,37]. La aceptación de secuencias virales generadas por este tipo de tecnologías ha sido un tema de amplio debate. El centro de Referencia para Papiloma Virus Humanos designa oficialmente a un nuevo tipo de HPV si el clon es aislado y enviado para que pueda ser confirmado [30]. Por ejemplo, los genomas de los tipos HPV116 (Gama 9) [38] y HPV155 (Gama 7) [39] fueron originalmente identificados por metagenómica, pero posteriormente fueron amplificados a partir de las respectivas muestras biológicas, clonados y enviados al Centro de Referencia. Los genomas de más de 17 tipos nuevos de HPV han sido identificados por metagenómica (<http://pave.niaid.nih.gov/>) [30] (Figura 3), sin embargo no tienen una designación oficial. La mayoría de los tipos y posibles tipos nuevos de HPV identificados por secuenciación profunda pertenecen al género Gama PV cuyo número ha aumentado de forma exponencial, mientras que los tipos del género Beta PV han aumentado de manera constante, y los del género Alfa PV han alcanzado una meseta (Figura 4) [16,20].

En el año 2015 se identificó un nuevo tipo de Mu PV (HPV204) 22 años después de la identificación del último tipo de este género [36]. Este nuevo HPV fue el resultado de un trabajo de colaboración de nuestro grupo de trabajo con investigadores eslovenos. Teniendo en cuenta que los tipos de los géneros Mu y Nu PV son escasos, mayores esfuerzos deberán realizarse para identificar los tipos virales que se agrupan en estos y en los demás géneros de HPV para completar la taxonomía de familia *Papillomaviridae*.

Figura 4: Evolución del número de tipos de HPV agrupados en los 5 géneros a lo largo del tiempo.

Fuente: <http://www.hpvcntr.se/html/refclones.html>



1.3.2 Organización genómica de los HPV

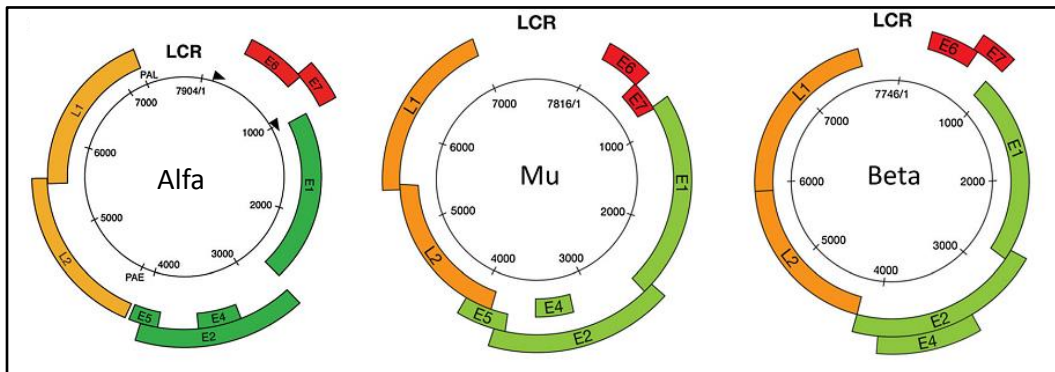
El genoma de los PV se organiza en tres grandes regiones [13]:

- *Región Temprana o E* (E, por su sigla en inglés *Early*): incluye los genes que codifican para las proteínas que intervienen en la replicación del virus y en la transformación celular (E1, E2, E4, E5, E6, E7), los cuales son expresados en los primeros estadios de la infección.
- *Región Tardía o L* (L, por su sigla en inglés *Late*): incluye los genes que codifican para las proteínas de la cápside L1 y L2, los cuales son expresados en la etapa final de la infección.
- *Región larga de control o LCR* (LCR, por su sigla en inglés *Long Control Region*), sin función codificante, de aproximadamente 0,3-1 kpb, posee señales de control de la transcripción y el origen de replicación viral.

Los elementos conservados y compartidos por todos los PV son la región LCR, las proteínas tempranas E1 y E2 y las proteínas tardías L1 y L2, mientras que existe una gran diversidad en la presencia o ausencia de los demás genes (E6, E7, E5 y E4).

En la Figura 5 se esquematiza la organización genómica de tipos representativos de los géneros Alfa PV, Beta PV y Mu PV y en la Tabla 2 se detallan las funciones de las proteínas codificadas y del LCR.

Figura 5: Esquema de la organización genómica de tipos representativos de los géneros Alfa-PV, Beta-PV y Mu-PV



Se muestra la heterogeneidad de los genomas respecto a los genes tempranos y tardíos y la LCR (URR) en distintos géneros. Adaptado de Doorbar y cols., 2015 [40].

La proteína viral E2 puede unirse a sitios del genoma viral y celular, es conservada entre los tipos de HPV en sus dominios N-terminal y C-terminal. Como la mayoría de las proteínas codificadas por los PV, las funciones de la proteína E2 dependen de su interacción con las proteínas del huésped y en modificar sus funciones normales en beneficio del virus [40].

Las proteínas oncogénicas E6 y E7, pueden ser reguladas a nivel transcripcional por E2 y juegan un papel importante en la desregulación del ciclo celular. Sin embargo, una de las características más

curiosas en la heterogeneidad de ORFs entre los HPV es la falta del ORF E6 en ciertos tipos del género Gama PV, tales como HPV101, HPV103 y HPV108 [31,41].

La oncoproteína E5, junto con E6 y E7, tiene una importante función de evasión del sistema inmune y en optimizar la eficiencia de la amplificación del genoma [42,43]. Interesantemente, los genomas de los virus agrupados en los géneros Beta PV y Gama PV no codifican para el ORF E5.

La proteína E4 (que interviene en la salida de las partículas virales del epitelio), al igual que E5, muestra heterogeneidades entre los tipos de PV y se especula que la presencia/ausencia de E4 refleja las diferencias en el tropismo y en las rutas de transmisión de los diferentes PV [42,44].

Tabla 2: Funciones de las proteínas de HPV y de la región no codificante (LCR). ORF: marco abierto de lectura. Adaptado de Bravo 2105 [20]

ORF	Función
LCR	- Sitios de unión a factores de transcripción - Control de expresión de genes - Origen de replicación
E6	- Promueve la inmortalización celular degradando p53 - Modifica la adhesión y diferenciación celular degradando TAp63 y p73
E7	- Promueve la degradación de pRb permitiendo la progresión celular a fase S del ciclo celular - Induce la inestabilidad cromosomal
E1	- ADN helicasa dependiente de ATP - Rol en la replicación del ADN viral
E2	- Rol en la replicación del ADN viral - Represor de proteínas virales E6 y E7 - Regula el ciclo celular y la apoptosis
E4	-Unión y ruptura del citoesqueleto en células arrestadas en G2 -Relacionada con la maduración del virus
E5	- Induce la proliferación celular - Contribuye a evadir la apoptosis
L2	- Proteína menor de la cápside
L1	- Proteína mayor de la cápside

La LCR está ubicada entre el ORF L1 y el ORF E6 (Figura 5). En la LCR se encuentra el inicio de la transcripción de la región temprana, contiene elementos promotores, sitios de unión a factores de transcripción (incluyendo las secuencias palindrómicas reconocidas por E2) y el origen de replicación viral (donde E1 puede unirse) [45]. Algunos genomas de PV animales contienen una LCR extra entre el final de la región temprana y el inicio de la región tardía [46].

1.3.3 Ciclo de replicación viral y oncogénesis asociada a los HPV

El ciclo de infección de los PV está estrechamente coordinado con el programa de diferenciación de las células epiteliales, por ello la síntesis vegetativa de ADN viral y la maduración de los viriones se

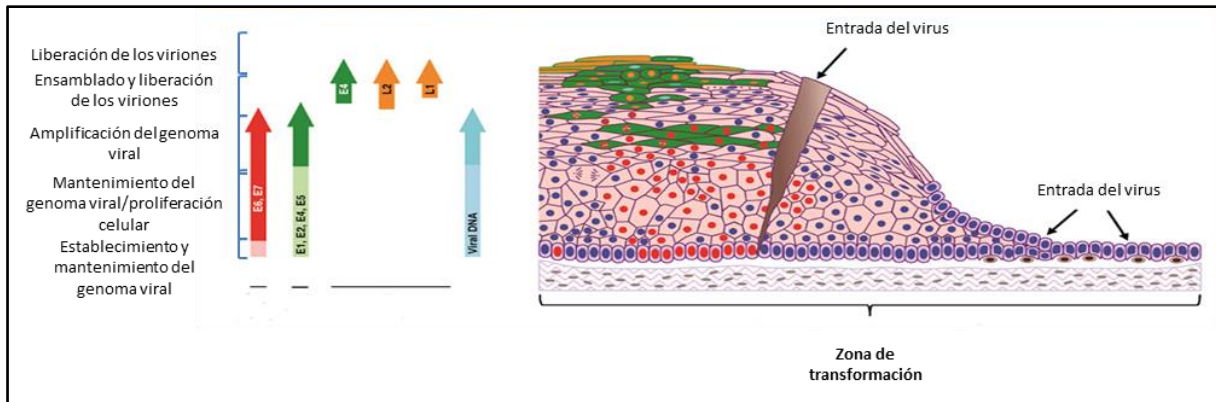
limita a los queratinocitos más diferenciados [47] (Figura 6). La infección por HPV se inicia a través de microlesiones del epitelio que permiten el ingreso del virus al interior de las células basales, las cuales son las menos diferenciadas y constituyen las células blanco de HPV. Por medio de una combinación de factores celulares que interactúan con sitios ubicados en el LCR, se promueve la transcripción de los genes tempranos que permiten el establecimiento y el mantenimiento del genoma viral en el núcleo de la célula como un episoma de bajo número de copias. Estos episomas replican de manera coordinada con los cromosomas de la célula hospedadora [48]. La replicación viral vegetativa, que permite la amplificación génica del virus, la expresión de los genes tardíos y el ensamblado de los viriones, se produce en el núcleo de las células más diferenciadas que se encuentran en las capas más superficiales del epitelio. De esta forma se mantiene de manera estable un reservorio de genomas de HPV en la capa basal del epitelio a través de la generación continua de células hijas infectadas.

Los PV en general dependen de las polimerasas y otras proteínas celulares involucradas en la replicación del ADN para su propia replicación, las cuales están presentes en la fase S del ciclo celular [48]. En el epitelio normal, a medida que las células se diferencian, se interrumpe la proliferación: cuando las células migran de la capa basal y se diferencian, se genera un arresto en el estadio G1/S del ciclo celular. Este proceso se encuentra alterado en las infecciones asociadas a tipos AR como el HPV16, que es el tipo oncogénico más prevalente en carcinomas cervicales de tipo invasor y el HPV más estudiado. En las células infectadas por el HPV16 se induce el pasaje de la fase G1 a S fuera de programa. Este evento permite la síntesis de los componentes necesarios para la replicación del ADN y por ende la replicación del genoma viral. La inducción del pasaje de la fase G1 a S se produce a través de la interferencia que las oncoproteínas E6 y E7 ejercen sobre la función de las proteínas regulatorias p53 y pRb, respectivamente [49]. La función de estas proteínas en tipos BR, como HPV6 o HPV11, no está generalmente asociada a neoplasia [50]. Una de las diferencias más importantes entre la proteína E7 de tipos de AR y BR es su capacidad para unirse a pRB, un oncosupresor esencial en el control de la replicación celular y en la regulación del pasaje de G1 a S [51]. La inducción por parte de E7 de la síntesis de ADN fuera del programa celular activa la respuesta apoptótica mediada por el supresor de tumores p53 lo que constituiría una restricción para la replicación viral. Para superar esto, las proteínas E6 codificadas por HPV16 y HPV18 inactivan los mecanismos dependientes de p53 promoviendo su degradación proteolítica a través del mecanismo dependiente de ubiquitina [52].

Además de unirse a p53 y regular el ciclo celular, la proteína E6 de los tipos AR posee sitios específicos de unión a proteínas con dominios PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) [53-55]. La función de estas proteínas es mantener la integridad de las uniones celulares y la polaridad de las células [56]. Si

bien las uniones E6-PDZ han sido estudiadas bajo el contexto de carcinogénesis, también parecen regular varios aspectos de ciclo viral [40].

Figura 6: Representación esquemática del ciclo de replicación viral de un HPV AR en epitelio mucoso.



Se indican las diferentes etapas del ciclo a lo largo del epitelio diferenciado y las proteínas virales que intervienen en cada una. Adaptado de Doorbar y cols. [50].

La activación de la expresión de los genes tardíos de HPV permite la síntesis de las proteínas estructurales y se produce por la interacción de factores celulares presentes en la célula diferenciada con elementos de la LCR. Un aspecto importante que contribuye a la oncogénesis es la integración del ADN viral al genoma celular, proceso observado en los carcinomas cervicales y en las líneas celulares derivadas infectadas con HPV16 y tipos relacionados [10,57]. La integración del genoma viral usualmente interrumpe los ORF E1 y el ORF E2, quedando generalmente intactos los ORF E6, ORF E7 y la región LCR [57-59]. La eliminación de la expresión de la proteína E2 debido a la integración resulta en la sobre-expresión de los oncogenes E6 y E7, ya que el producto proteico de E2 actúa como un inhibidor de la transcripción de dichos oncogenes [60]. La expresión continua de las oncoproteínas E6 y E7 es requerida para mantener el estado transformado, que resulta de la interacción de estas oncoproteínas con p53 y pRB respectivamente, así como con otras proteínas claves para el control de la proliferación celular. Es necesario enfatizar que los procesos de transformación e inmortalización celular asociados a HPV son acompañados por anomalías en el programa de diferenciación. Por lo tanto, teniendo en cuenta la dependencia entre el ciclo de multiplicación viral y la diferenciación de las células epiteliales, la integración del virus resulta en la pérdida de la replicación viral. La oncogénesis es por ende, un efecto secundario que resulta en detrimento tanto para el virus como para el hospedador [48].

1.3.4 HPV Mucosotrópicos

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer [12] clasifica a los HPV mucosos en dos grandes grupos, AR y BR, según las manifestaciones clínicas que provocan sus infecciones. Los HPV AR (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) son agentes causantes de lesiones que pueden progresar a carcinoma de cuello de útero de carácter invasor. Su presencia en lesiones intraepiteliales aumenta el riesgo de progresión maligna, por lo que son considerados importantes agentes carcinogénicos [61]. El HPV16 está asociado a casi el 60% de los casos de cáncer cervical, el HPV18 al 10-20%, el HPV45 y HPV31 al 4% cada uno y los tipos HPV33, 52 y 58 contribuyen cada uno con otro 2% al cáncer cervical mundial [62,63]

Los HPV BR (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 84 y CP6108) inducen la formación de verrugas genitales benignas y están raramente asociados con malignidad [64].

Por último, los tipos 26, 53 y 66 son considerados de probable alto riesgo oncogénico porque han sido hallados en carcinomas cervicales pero en muy baja prevalencia [64].

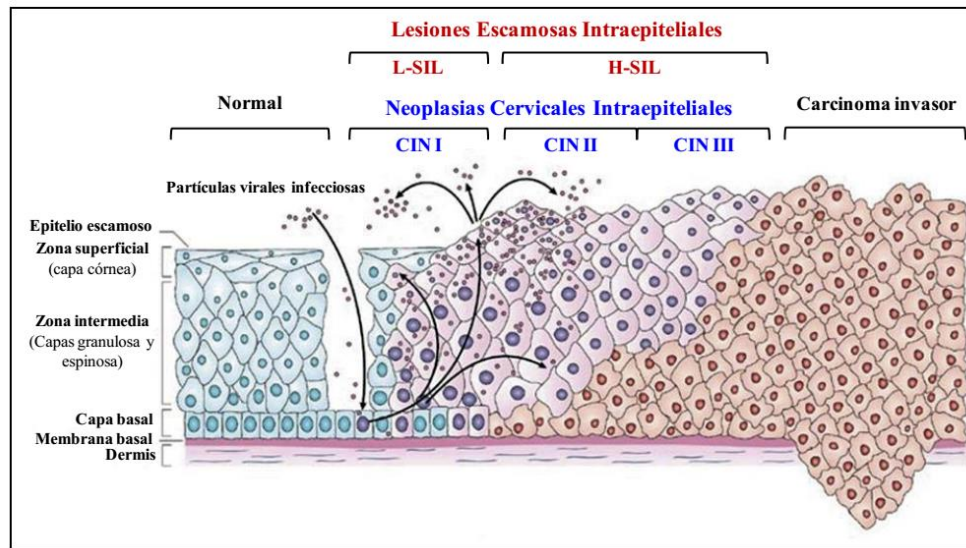
1.3.4.1 Patologías asociadas a la infección por HPV mucosotrópicos: Cáncer Cervical

El desarrollo del cáncer cervical es un proceso gradual, siendo sus primeras manifestaciones la aparición de lesiones intraepiteliales en la mucosa uterina que se denominan displasias, las cuales son 100% curables. La severidad de las Lesiones Escamosas Intraepiteliales (SIL, por su sigla en inglés *Squamous Intraepithelial Lesion*) precursoras del cáncer cervical se clasifican en grados de acuerdo a la extensión del epitelio normal diferenciado que es reemplazado por células no diferenciadas de tipo basal (Figura 7). Las categorías citológicas definidas de acuerdo al sistema Bethesda para reportar resultados de frotis de Papanicolaou incluyen: lesiones de bajo grado (L-SIL, del inglés *Low-grade SIL*), de alto grado (H-SIL, del inglés *High-grade SIL*) y células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) [65].

La correlación histológica de estos cambios se da con las neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN, por su sigla en inglés *Cervical Intraepithelial Neoplasia*), las cuales se clasifican en grados I, II, y III de acuerdo a los cambios cito-histológicos, siendo el CIN III el paso previo al cáncer cervical invasor (Figura 7). En el carcinoma cervical de tipo invasivo, las células anormales traspasan la membrana basal invadiendo el tejido circundante y eventualmente provocando metástasis [66].

El intervalo de tiempo entre el inicio de la infección por HPV y el desarrollo del cáncer cervical puede ser muy largo, incluso puede llevar décadas [13]. Es por ello que el cáncer cervical es muy raro en mujeres menores de 25 años. Su incidencia aumenta progresivamente con la edad, siendo mayor en mujeres de más de 40 años [67].

Figura 7. Alteraciones cervicales asociadas a la infección por HPV AR



Representación esquemática de los precursores del cáncer cervical: L-SIL y H-SIL, y del carcinoma invasor. Las diferentes capas celulares del epitelio se indican a la izquierda del esquema. Las células normales se muestran con color celeste (correspondiente al tejido normal), en L-SIL y H-SIL las células normales son reemplazadas por células no diferenciadas del tipo basal (color violeta). En el carcinoma invasor las células anormales traspasan la membrana basal invadiendo el tejido circundante (color rojo). Se muestra la correlación entre citología e histología. Figura adaptada de Woodman y col. [68].

Las principales etapas clínicas en la carcinogénesis cervical incluyen (Figura 8): infección por HPV, persistencia del virus por un cierto período de tiempo, progresión a lesiones precursoras del cáncer cervical, e invasión. Es necesario considerar la reversibilidad del proceso, con la existencia de infecciones que revierten, incluyendo pérdida espontánea de la infección por HPV y regresión del estado de pre-cáncer [69].

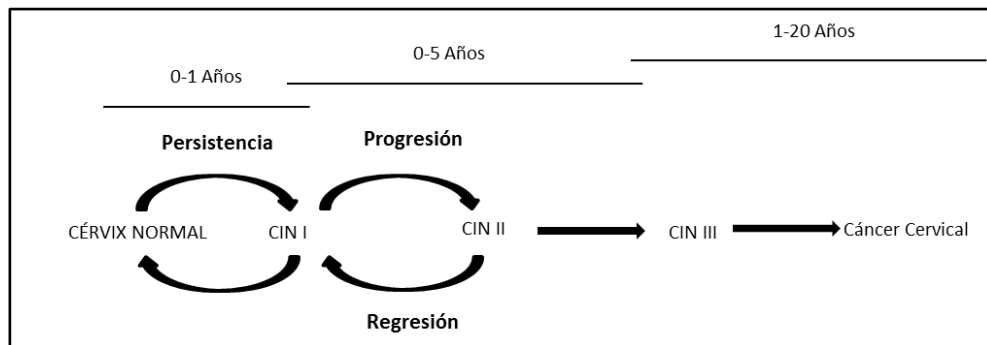
Actualmente está firmemente establecido que la infección persistente con HPV AR es el evento clave en el desarrollo del cáncer cervical en humanos y de sus lesiones precursoras [22,70]. Por lo tanto, a mayor duración de la persistencia de la infección por HPV, menores serán las posibilidades de la paciente de resolver su infección espontáneamente y mayor será el riesgo de progresión a lesiones más severas y a cáncer cervical [22]. Sin embargo, la mayoría de las mujeres con infección de HPV será capaz de eliminar la infección viral en un periodo de 12-24 meses [71] y la mayoría de ellas no desarrollarán lesiones clínicas aparentes [72,73].

Los estudios epidemiológicos han mostrado que sólo una pequeña fracción de mujeres infectadas con HPV AR eventualmente desarrollará H-SIL y cáncer cervical [74] y se asume que existen otros factores del huésped que influyen en la resolución de la infección o en la progresión a cáncer. Entre ellos, se han identificado polimorfismos genéticos en los genes HLA, DRB1 y DQB1 asociados con la persistencia y prevalencia de la infección [75], el tipo de conducta sexual (el número de

compañeros sexuales, la edad de la primera relación sexual, el uso de preservativos, la higiene genital) y la circuncisión masculina como factores que influirían en el riesgo de adquisición y de transmisión de HPV [74,76]. Además se han descripto co-factores como la paridad, el uso de anticonceptivos hormonales, el consumo de tabaco, las infecciones de transmisión sexual (HSV-2, Chlamydia trachomatis y HIV-1), las condiciones socioeconómicas, etc., que aumentarían el riesgo de progresión a cáncer cervical [74,76,77]. Por lo tanto, si bien la infección persistente con HPV AR es la causa necesaria para el desarrollo de cáncer cervical, la combinación de HPV con los factores y co-factores mencionados serían los responsables de modular la transición desde una infección viral a cáncer.

El cáncer cervical es mundialmente una de las neoplasias más comunes que afecta a la mujer, con una estimación de 529.000 casos nuevos y de 275.000 muertes por año [78]. En Argentina, el cáncer cervical es el tercer tipo de cáncer más frecuente en la población general y el segundo entre mujeres de 15 a 44 años [79]. Los estudios epidemiológicos indican que los HPV están también asociados a los cánceres de vagina, vulva, ano, pene y orofaringe, pero en menor medida que a la asociación encontrada con el cáncer cervical [80].

Figura 8: Historia natural de la infección por HPV AR en cérvix. Adaptado de Sudenga y cols 2013 [73]



1.3.4.1a Tamizaje y Tratamiento de lesiones precancerosas y cáncer cervical

Como expresamos al principio de esta sección, la progresión a cáncer cervical es un proceso lento, que se mide en años. En el período pre-invasor es posible actuar para modificar el proceso y no solo mejorar la sobrevida de las pacientes si no también impedir directamente el desarrollo de cáncer aplicando las intervenciones necesarias de manera oportuna [81].

La prevención del cáncer cervical se basa en la realización periódica del Papanicolaou (Pap) en mujeres que sean sexualmente activas. Los programas de tamizaje con el extendido de Pap como medida de prevención que se llevan a cabo en las naciones industrializadas, han sido y son responsables de una disminución en la incidencia del cáncer cervical del 70%. En los países sin

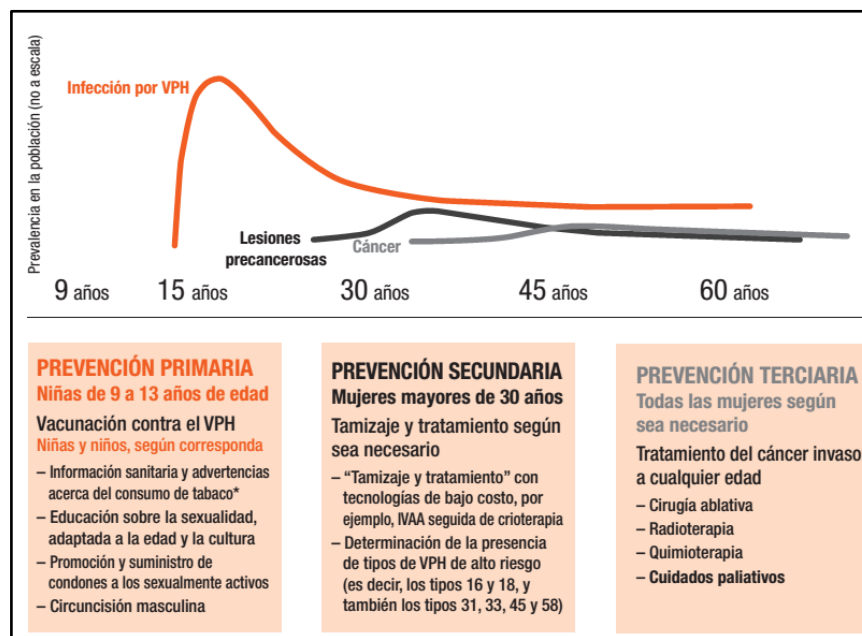
programas nacionales de prevención del cáncer cervical, su incidencia continúa aumentando con la edad [62]. Esta problemática determina que aproximadamente el 80% de los casos de cáncer cervical tengan lugar en países en vías de desarrollo [67].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la prevención temprana de las lesiones cervicales para reducir la carga del cáncer de cérvix y propone acciones a llevar a cabo en tres etapas (Figura 9): (i) prevención primaria: reducción de las infecciones por HPV, (ii) prevención secundaria: tamizaje y tratamiento de las lesiones precancerosas del cuello uterino, y (iii) prevención terciaria: tratamiento oportuno del cáncer invasor y cuidados paliativos [82].

La historia natural de la infección por HPV predice que solo una pequeña proporción progresará a lesiones de alto grado y/o cáncer. [71,83]. Esta condición sumada a las pruebas de tamizaje y las opciones de tratamiento satisfacen los criterios para aplicar un programa de tamizaje de lesiones pre-cancerosas [82]. La recomendación de la IARC es no tamizar a las mujeres menores de 25 años, ya que la frecuencia de cáncer cervical en mujeres jóvenes es baja, mientras que los costos pueden ser elevados tanto para la salud de las mujeres como para el sistema de salud pública [12].

Los métodos de tamizaje de lesiones precancerosas son: citológicos (Pap), visuales (inspección visual con ácido acético, IVAA) y moleculares (detección de HPV). En el caso que la paciente fuese positiva para alguno de los métodos de tamizaje se aplican pruebas diagnósticas para detección de lesiones cervicales: colposcopia, biopsia y legrado endocervical.

Figura 9: Enfoque integral de la OMS para la prevención y el control del cáncer cérvico-uterino.



IVAA: Inspección visual con ácido acético. Tomado de WHO, 2015 [82]

En Argentina la citología exfoliativa del cérvix con posterior tinción de Pap es el método de tamizaje primario más utilizado. En base a la evidencia científica, nuestro país definió como prioritario el abordaje integral de la prevención del cáncer cérvico-uterino, con el objetivo de disminuir la mortalidad por esta patología, que incluye la incorporación de la vacuna contra HPV para niñas de 11 años y el fortalecimiento de la estrategia de prevención secundaria a través del tamizaje basado en la citología, y la introducción del Ensayo de HPV como tamizaje primario. Durante el año 2011 el Instituto Nacional del Cáncer (INC) conjuntamente con el Programa Nacional de Prevención del Cáncer Cérvico-Uterino (PNPCC) acordaron la implementación del ensayo de HPV como tamizaje primario. El 12 de Septiembre de 2011 por medio de la resolución 1472/11 el Ministerio de Salud de la Nación aprobó el Proyecto Demostración para la incorporación de la Prueba de HPV como Tamizaje Primario. En el año 2012 Jujuy fue la primera provincia en incorporar el ensayo de detección de HPV en mujeres de 30 a 64 años de edad. Durante ese año se tamizaron más de 22.800 mujeres mayores de 30 años (<http://www.msal.gov.ar/cancer-cervico-uterino/>). Durante el año 2014 se inauguraron los laboratorios de HPV en las provincias de Catamarca y Tucumán, y durante el año 2015 se inauguraron los laboratorios en Neuquén, Misiones y Buenos Aires (La Matanza, Ituzaingó y Florencio Varela). La meta final es establecer el ensayo de HPV a nivel nacional como método de tamizaje primario del cáncer cérvico-uterino. De esta iniciativa se desprende que la aplicación de métodos moleculares destinados a la detección de HPV ya es un hecho en Argentina.

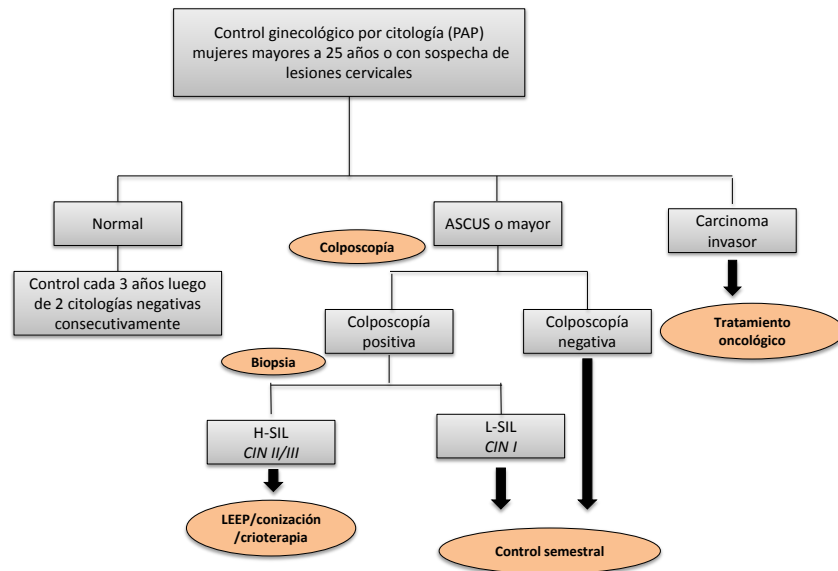
La colposcopia como método diagnóstico, cuando el método de tamizaje fuese positivo, permite, por un lado la toma de biopsias dirigidas para obtener material histológico representativo, y, por el otro, el seguimiento de las lesiones [84]. La visualización colposcópica consiste en la observación del cérvix mediante una lupa binocular y en el uso de distintas tinciones para poner en evidencia áreas anómalas. El diagnóstico definitivo del tipo de lesión cervical se realiza mediante estudios anátomo-patológicos de una biopsia [82]. Ésta última se obtiene seccionando una muestra en sacabocado de cérvix que incluya todas las capas epiteliales y el estroma subyacente para poder diagnosticar la eventual invasión más allá de la membrana basal epitelial.

La opción “*see and treat*” (del inglés, ver y tratar) no es aconsejada como norma ya que implicaría el sobre-tratamiento de la mayoría de las mujeres, además hay que tener en cuenta que los tratamientos disponibles son invasivos [conización, procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa (LEEP), crioterapia y ablación por láser] y pueden traer eventuales consecuencias [85]. De esta manera solamente se recomienda aplicar alguno de estos tratamientos a las mujeres que fuesen diagnosticadas con CIN II o lesiones mayores luego de haber realizado el examen anátomo-patológico de la biopsia [82].

En la Figura 10 se resumen las acciones llevadas a cabo en Argentina para el tamizaje, diagnóstico y tratamiento de lesiones precancerosas en mujeres mayores de 25 años según recomendaciones de la IARC (IARC, 2007) y de la OMS [12,82]. Debido a que no existe un Programa Nacional efectivo y global en todo el país, cada provincia, hospital, centro de salud y médico en particular adecua y modifica este algoritmo según los objetivos que se persigan.

Si bien la experiencia de los países desarrollados indica que es posible prevenir hasta en un 80% la incidencia y mortalidad por cáncer de cuello de útero a través de programas organizados de prevención secundaria [86,87] hoy en día, con el desarrollo de las vacunas contra HPV, es indispensable un enfoque global de la prevención del cáncer cervical.

Figura 10: Protocolo de tamizaje basado en la citología y tratamiento de lesiones pre-cancerosas en mujeres mayores de 25 años establecido en Argentina



LEEP: procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa. ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado. L-SIL, H-SIL: Lesiones Escamosas Intraepiteliales de bajo (L) y alto grado (H). CIN: neoplasias cervicales intraepiteliales

1.3.4.2. Vacunas profilácticas contra HPV mucosotrópicos.

Las vacunas profilácticas tienen un papel primordial en la prevención activa de las enfermedades virales en humanos y en animales. El desarrollo de vacunas preventivas contra HPV ha sido un desafío por las características intrínsecas de este virus. HPV replica solo en humanos y por su estrecha relación con el programa de diferenciación de los queratinocitos, sólo es posible producir viriones infectivos usando cultivos organotípicos [47]. Aún con la obtención de los viriones, éstos contendrían los oncogenes virales, lo cual haría imposible su uso como vacuna profiláctica. Por ello

el desarrollo de las vacunas contra HPV se ha basado principalmente en las proteínas estructurales L1 y L2, las cuales son inmunogénicas y no poseen capacidad oncogénica.

Mediante la tecnología de ADN recombinante se ha logrado la expresión de las proteínas L1 y L2 en diferentes sistemas celulares [88]. La expresión de proteínas virales en sistemas eucariotas (levaduras y células de insecto) resultó ser la mejor estrategia. Estos sistemas permiten la expresión de la proteína L1, la cual se auto-ensambla y pliega por sí sola, generando partículas con una estructura morfológica semejante al virus, por lo que han sido denominadas partículas pseudovirales (VLP, por su sigla en inglés *virus-like particle*). L1 es la única proteína requerida para la producción de estas partículas, de modo que las VLPs no poseen potencial oncogénico y son una excelente opción para ser utilizadas como vacuna. En junio de 2006, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por su sigla en inglés *Food and Drug Administration*) de los EE.UU. aprobó Gardasil, una vacuna recombinante específica para los tipos HPV6, HPV11, HPV16 y HPV18 desarrollada por la empresa Merck & Co. Gardasil ha sido preparada en un sistema de expresión en levaduras y las VLPs de cada tipo de HPV son combinadas para generar la vacuna tetravalente. Una segunda vacuna, Cervarix, que contiene VLPs de L1 de HPV16 y HPV18 fue desarrollada por la compañía farmacéutica GlaxoSmithKline y fue aprobada por la FDA en octubre de 2009. Cervarix ha sido producida en células de insectos infectadas con baculovirus recombinantes. Ambas vacunas se administran intra-muscularmente, siendo el esquema de vacunación de tres dosis, y las formulaciones emplean como adyuvantes sulfato e hidróxido de aluminio (Gardasil) y lípidos modificados e hidróxido de aluminio (Cervarix).

En la actualidad, no existe una metodología que permita determinar si una mujer ya ha estado expuesta al virus, dado que los ensayos serológicos disponibles generalmente no son lo suficientemente sensibles para detectar los anticuerpos generados en la infección natural y, además, no todas las personas infectadas por HPV desarrollan anticuerpos [89]. Es por esto, que la vacunación se recomienda en adolescentes y mujeres que aún no se han iniciado sexualmente. Cabe destacar que estas vacunas no tienen actividad terapéutica, y se ha demostrado que la vacunación de mujeres jóvenes con infección pre-existente con alguno de los tipos incluidos en las formulaciones disponibles no tiene efecto sobre la resolución de dicha infección [90]. Por otro lado, en un estudio realizado en mujeres vacunadas con VLPs de HPV16 y HPV18, se observó protección cruzada contra infecciones incidentes de HPV45 (94%) y HPV31 (54%), tipos virales no incluidos en la vacuna pero filogenéticamente relacionados con HPV18 y HPV16, respectivamente [91]. Sin embargo, en ese mismo estudio la protección contra tipos menos relacionados filogenéticamente con HPV16 y HPV18, tales como HPV33, HPV52 y HPV58, no fue significativa.

El siguiente paso en la prevención del desarrollo de cáncer cervical fue el desarrollo de una vacuna nonavalente que proteja contra 5 tipos de HPV AR adicionales (HPV31, HPV33, HPV45, HPV52, HPV58), que causan aproximadamente el 20% de los casos de cáncer de cuello uterino, a los incluidos en la vacuna cuadrivalente (HPV6, HPV11, HPV16, HPV18) [62,63]. En diciembre de 2014 la FDA aprobó el uso en mujeres entre 9 a 26 años y en hombres de entre 9 a 15 años de la vacuna nonavalente, Gardasil 9 (Merck & Co) que tiene el potencial de prevenir aproximadamente el 90% de los casos de cáncer de cérvix, de vulva, vaginal y anal. Gardasil 9 es una vacuna recombinante, ha sido desarrollada de la misma forma que su predecesora y demostró efectividad de 97% en la prevención de cáncer de cérvix, vulva y vagina en un estudio clínico aleatorizado realizado a nivel internacional sobre 14.000 mujeres de entre 16 a 26 años y negativas para los tipos de HPV que cubre la vacuna [92].

En el año 2011 en Argentina se introdujo la vacuna bivalente (Cervarix) en el calendario de vacunación en niñas de 11 años, siendo reemplazada en 2014 por la vacuna cuadrivalente (Gardasil). No obstante, una de las incógnitas que surge en la era post-vacuna a nivel global es la posibilidad de que otros HPV AR ocupen el nicho ecológico de los tipos vacunales. En efecto, el consenso internacional recomienda la realización de estudios en poblaciones no vacunadas y vacunadas para observar la historia natural de las infecciones por HPV a fin de poder evaluar la factibilidad del “reemplazo de tipos” [93].

1.3.4.3. Prevalencia de la infección por HPV mucosotrópicos.

La infección por el HPV es globalmente la más frecuente entre las infecciones de transmisión sexual (ITS) y se estima que entre el 70-80% de las mujeres se infectan con HPV al menos una vez en su vida [94]. Los datos de prevalencia y distribución de tipos de HPV son el punto de partida para estimar el potencial impacto de la vacunación en la reducción de la infección por HPV y sus patologías asociadas, y para evaluar la relación costo-beneficio de su aplicación masiva.

La prevalencia provee una medida del porcentaje de individuos que presentan una dada infección, ya sea ésta nueva, persistente o recurrente, en un dado momento. La elección de la población a ser seleccionada dependerá de los datos que se quieran recabar. Por ejemplo, si se desean conocer los tipos de HPV circulantes en una región para evaluar la potencial eficacia de una vacuna contra esa infección, la población a elegir debería estar constituida por mujeres expuestas al virus (sexualmente activas) que no presenten manifestaciones clínicas de su presencia (ausencia de lesiones). Esta población nos daría una idea aproximada de los tipos de HPV que circulan más allá de si esas infecciones serán resueltas o no por los individuos infectados. En contraste, la selección de mujeres a riesgo de cáncer cervical por presentar Pap alterados o lesiones previas estaría

reflejando más la dificultad de esas mujeres en resolver la infección por un dado HPV. Estudios realizados en este tipo de poblaciones dan idea de qué tipos se encuentran asociados a las lesiones en una determinada región y podrían sentar las bases para evaluar en un futuro el posible reemplazo de tipos lo que permitiría tener inferencias en el desarrollo de las vacunas contra HPV.

En la Tabla 3 se muestran las prevalencias generales y tipo-específicas a nivel global, en cada continente y particularmente en Argentina, tanto en la población general como en mujeres con lesiones H-SIL [95-97]. Los datos reflejan la heterogeneidad en cuanto a los tipos de HPV que más prevalecen en las diferentes regiones geográficas.

Tabla 3: Prevalencia global y tipo-específica de HPV en cérvix estimadas para diferentes regiones del mundo

	Mujeres con citología normal		Mujeres con citología H-SIL	
	Prevalencia (%)	Tipos HPV más prevalentes (%)	Prevalencia (%)	Tipos HPV más prevalentes (%)
Global	11,4	HPV16 (2,2) HPV31 (1,1) HPV18 (1,1)	89,7	HPV16 (44,1) HPV31 (9,4) HPV58 (7,7)
África	21,3	HPV16 (2,4) HPV58 (1,7) HPV52 (1,7)	76	HPV16 (25,5) HPV35 (13,1) HPV18 (10,2)
Asia	10,9	HPV16 (2,3) HPV58 (1,3) HPV18 (1,1)	76	HPV16 (34,8) HPV52 (17,7) HPV58 (15,5)
Europa	9,7	HPV16 (2,8) HPV31 (1,5) HPV51 (1,3)	84	HPV16 (47,8) HPV31 (11,4) HPV33 (8,6)
América	14,5	HPV16 (3,3) HPV62 (1,9) HPV53 (1,4)	89,5	HPV16 (49,1) HPV31 (10,9) HPV52 (8,8)
Sudamérica	13,2	HPV16 (4,7) HPV31 (1,8) HPV87 (1,7)	85	HPV16 (52,1) HPV31 (8,6) HPV18 (7,9)
Argentina	30,5	HPV16 (6,4) HPV66 (5,6) HPV31 (3,5)	82,5	HPV16 (51,7) HPV58 (20) HPV18 (11,4)

Adaptado de IARC 2010 [95-97]

Con respecto a lo que sucede en nuestro país, los estudios llevados a cabo para determinar la prevalencia de la infección por HPV en la población general son escasos [98]. En lo que respecta a la provincia de Santa Fe, nuestro laboratorio ha realizado hasta el momento el único estudio orientado a conocer los tipos de HPV que circulan en cérvix de mujeres sexualmente activas sin manifestaciones clínicas [99]. Este estudio permitió determinar que 41,2% de la población estaba infectada con HPV, siendo el tipo más prevalente el HPV16 (9%), seguido del HPV31 (7,2%) y del HPV66 (7%) [99].

Los estudios destinados a conocer los tipos de HPV más frecuentes en lesiones cervicales en Argentina se realizaron en mujeres de las provincias de Chaco, Córdoba y Corrientes [100-102]. Tal

como sucedido en los estudios realizados en otros países, a medida que aumenta el grado de severidad de la lesión también aumenta la prevalencia de infección por HPV. Con prevalencias entre el 40-60% en mujeres con citología ASC-US y de 80-90% en mujeres con citología H-SIL o cáncer invasor, estos estudios también determinaron que el tipo más prevalente asociado a estas lesiones es el HPV16. Sin embargo hay una diferencia en la prevalencia de los demás tipos AR. En Córdoba los tipos HPV52 y HPV18 resultaron ser los más frecuentes en lesiones H-SIL luego del HPV16 (30%) con prevalencias del 16,7% y 13,3%, respectivamente [102]. Los tipos de HPV más prevalentes asociados a lesiones en mujeres de Chaco, además del HPV16 (36,23%), fueron los tipos HPV31 (15,9%) y HPV53 (8,7%) [101]. Por otro lado, en Corrientes los tipos HPV58 y HPV53 fueron los que mostraron mayores prevalencias (8,2% y 5,5%, respectivamente), luego del HPV16 (14,1%) [100].

Para asegurar que la información de la prevalencia reportada a nivel global o regional sea correcta es necesario que las metodologías de identificación de HPV utilizadas en los estudios de prevalencia estén validadas en cuanto a sensibilidad y especificidad analítica. Esto brinda la posibilidad de comparar la prevalencia en distintas regiones o de obtener una estimación de la prevalencia global de infección por HPV. Esta información es un componente esencial en la evaluación de las vacunas contra HPV y en la implementación y monitoreo de los programas de vacunación masiva. En este sentido, la OMS a través del programa “*WHO Global HPV LabNet*” intenta apoyar estas acciones realizando controles de calidad de los métodos de detección de HPV en laboratorios participantes de todo el mundo [103]. En el año el *HPV LabNet* dirigió el primer estudio de competencia que estuvo abierto a la participación de laboratorios de todo el mundo basado en paneles de plásmidos de ADN conteniendo los genomas de 14 tipos AR y 2 tipos BR [104]. En el 2010 el estudio de competencia se repitió demostrando que es posible realizar estudios globales continuos utilizando plásmidos de ADN con unidades de concentración calibradas según estándares internacionales, a fin de proporcionar una visión general del estado de las metodologías utilizadas para la detección y tipificación de HPV.

Teniendo en cuenta que tanto las prevalencias globales como tipo-específicas del país son heterogéneas y que además no todos los laboratorios disponen de un método de detección competente, resulta necesario conocer que tipos de HPV se asocian a lesiones cervicales en mujeres de nuestra región utilizando un sistema de tipificación considerado apto por la OMS para identificar los tipos de HPV AR y BR circulantes en esta población y fin de proveer información epidemiológica precisa.

1.3.4.4. Persistencia de la infección por HPV mucosotrópicos.

Más del 80% de las infecciones por HPV (AR o BR) en mujeres con o sin anomalías citológicas son transitorias, es decir que son controladas por el sistema inmune y son eliminadas en aproximadamente 1-2 años [64]. Por otro lado, existe un grupo minoritario (< 20%), aunque numéricamente importante dada la alta circulación viral, de infecciones por tipos AR que persisten y no son eliminadas. Éstas son las infecciones que concentran el foco de la atención, ya que tienen una mayor probabilidad de avanzar a CIN II/III. Las infecciones persistentes por HPV AR son un pre-requisito para el desarrollo de cáncer y es por ello que se las ha llamado “fenotipo intermedio” [73]. Se estima que el tiempo necesario para progresar a la malignidad, en caso de permanecer sin tratamiento, es de varios años (Figura 8). Por esta razón, los programas de tamizaje están dirigidos a mujeres > de 25-30 años, con el fin de identificar aquéllas portadoras de lesiones precursoras [64,105,106].

El término “persistencia viral” es generalmente definido como la detección del mismo tipo de HPV en 2 o más intervalos de tiempo [72,83]. Sin embargo otras definiciones incluyen la detección de mismo tipo en un mínimo de 3 intervalos de tiempo [107,108], la proporción del número de veces que se identificó el mismo tipo de HPV [109], la duración de la infección por el mismo tipo durante todo el tiempo de seguimiento [110] y el tiempo en que se logró eliminar la infección [111]. Otra mirada acerca de la persistencia puede medirse en términos de eliminación de la infección (*clearance* o regresión), que se define como la imposibilidad de detectar el mismo tipo de HPV en dos o más muestras consecutivas [73].

Los estudios realizados sobre persistencia de HPV en cérvix sugieren que las infecciones múltiples de diferentes tipos de HPV [112], el hábito de fumar [113] y múltiples compañeros sexuales [114] son los principales factores asociados con las infecciones persistentes. Además, algunos de los factores epidemiológicos y biológicos asociados con el desarrollo de cáncer cervical podrían extrapolarse a la infección persistente por el virus [73].

En un estudio de meta-análisis sobre persistencia de infección por HPV se determinó que los tipos más persistentes son el HPV16, HPV31, HPV33 y HPV52 [115]. Particularmente en una cohorte de mujeres coreanas se determinó que el tipo HPV58 fue el más persistente y fue considerado como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de lesiones cervicales [72]. Por otro lado, en mujeres de Japón los dos tipos más persistentes fueron HPV16 y HPV31 [116] y en un estudio longitudinal realizado en Colombia se observó que las infecciones asociadas a los tipos HPV18 y HPV31 tenían menos chances de ser eliminadas [117]. En Argentina no existen estudios destinados a conocer la evolución de las infecciones por HPV en ningún tipo de población (mujeres con citología normal o con patología cervical). Considerando que, los valores de persistencia globales

son heterogéneos, que existen pocos estudios sobre persistencia de la infección por HPV asociada a lesiones cervicales y que además no hay conocimiento sobre qué tipos y factores se asocian a infecciones persistentes en mujeres de Argentina, resulta relevante conocer el curso de la infección en mujeres con diagnóstico de patología cervical y no vacunadas a fin de aportar datos desde nuestra región que permitan tomar medidas preventivas en el tratamiento de dichas patologías.

1.3.5. HPV cutaneotrópicos

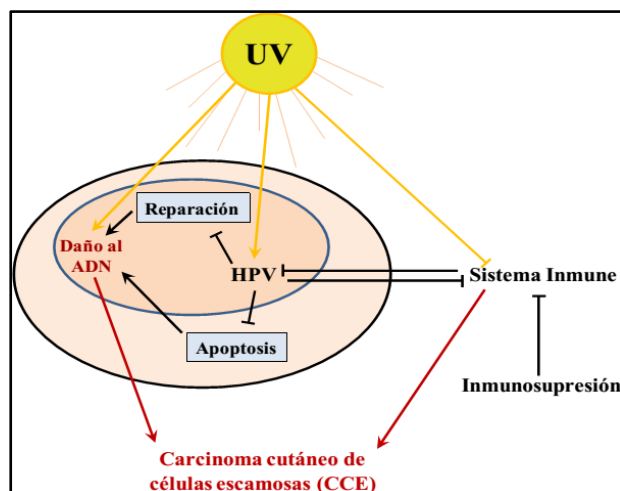
De los más de 200 tipos de HPV identificados hasta el momento, al menos el 75% tiene tropismo por epitelios cutáneos [16]. Los HPV están presentes en la piel como flora normal donde establecen una infección latente en las células basales del epitelio cutáneo o en el folículo piloso [118]. Sin embargo, luego de una disminución de la respuesta inmune local o sistémica, estas infecciones pueden transformarse en lesiones clínicamente aparentes [119].

1.3.5.1 Patologías asociadas a los HPV cutaneotrópicos: Cáncer de piel no melanoma y verrugas

Si bien aún no existe una asociación directa de los HPV con el cáncer de piel no melanoma (CPNM), se han identificado diversos tipos de HPV en individuos con CPNM, con psoriasis luego de fotoquimioterapia prolongada y con queratosis solar o seborreica [118]. El carcinoma cutáneo de células escamosas (CCE) junto con el carcinoma cutáneo de células basales (CCB) constituyen los principales tipos histológicos del CPNM, siendo la queratosis actínica (QA) la primera manifestación del CPNM. Además se ha observado una incidencia significativamente mayor de CPNM en individuos inmunosuprimidos por trasplante de órganos sólidos, lo cual pone en evidencia la correlación entre el CPNM y el estado inmunológico [120].

El rol concreto de los HPV en la carcinogénesis cutánea sigue siendo un tema de debate. Si bien la radiación solar es considerada el principal factor de riesgo para el desarrollo del CPNM [121], se postula que los HPV podrían actuar como co-factores, junto con la radiación UV, en el desarrollo de esta patología [122] (Figura 11). En efecto, se han reportado actividades anti-apoptóticas y un retraso en los mecanismos de reparación del ADN en células infectadas por ciertos tipos de HPV en respuesta a las mutaciones inducidas por UV [123,124]. Este escenario podría contribuir a la persistencia de la infección por HPV en los queratinocitos con daños en su ADN y subsecuentemente el desarrollo de CPNM [125].

Figura 11: Modelo de carcinogénesis cutánea inducida por UV y HPV



Con respecto a las verrugas cutáneas, los tipos HPV2, HPV3, HPV10, HPV27 y HPV57 pertenecientes al género Alfa PV han sido los más frecuentemente encontrados (60-90%) [126-129], seguidos por virus del Gama PV y Mu PV en menor medida [126,127,130]. En contraste, los Beta PV y Nu PV han sido detectados en verrugas cutáneas en casos aislados [126].

1.3.5.2. Epidemiología de HPV cutaneotrópicos.

A diferencia de los HPV mucosotrópicos, hasta hace 10-15 años atrás la epidemiología de las infecciones por HPV cutaneotrópicos no era del todo comprendida, en parte por las dificultades técnicas en la detección del ADN de HPV en piel que afectan la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y genotipificación. Sin embargo, en los últimos años se ha avanzado en las técnicas de amplificación y secuenciación por lo que hoy existe un mayor conocimiento acerca de estos virus.

Los estudios filogenéticos realizados sobre la región L1 de los HPV cutaneotrópicos revelan una amplia diversidad entre los tipos virales descriptos [16]. A diferencia de los HPV mucosotrópicos que pertenecen al mismo género (Alfa PV), los HPV cutaneotrópicos presentan mayor heterogeneidad genética, y están distribuidos en 5 géneros diferentes (Alfa PV, Beta PV, Gama PV, Mu PV y Nu PV).

Durante los últimos 20 años se han utilizado distintas metodologías basadas en PCR con cebadores genéricos para la identificación de secuencias de HPV en lesiones malignas y pre-malignas de la piel, como así también en piel sin lesiones aparentes. Los métodos de detección molecular hasta el momento descriptos se basan en la amplificación de una región de L1 con cebadores diseñados con múltiples degeneraciones para asegurar la amplificación por PCR simple [28,131] o anidada

[132,133]. Esta última estrategia ha producido los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y número de tipos identificados. Además, las técnicas de secuenciamiento profundo (metagenómica) han aportado nueva información sobre la diversidad de los HPV cutaneotrópicos, identificándose nuevos virus filogenéticamente distantes a los previamente conocidos [30,37]. Si bien hasta el momento las nuevas metodologías han permitido identificar numerosos tipos virales, no se ha logrado determinar una asociación de un tipo particular de HPV cutaneotrópico con el CPNM en la población general. No obstante, varios estudios reportaron la presencia del HPV5 y otros tipos del género Beta PV en individuos con EV. Además se ha detectado frecuentemente ADN de Beta PV en lesiones de CCE y de QA de pacientes no-EV [134,135]. Sin embargo, varios estudios han encontrado una alta prevalencia de Beta-PV en biopsias e hisopados de piel sana tanto de individuos inmunocompetentes como inmunosuprimidos [136,137]. En base a estas consideraciones, en el año 2010 nuestro grupo de trabajo realizó un estudio orientado a conocer los HPV circulantes en epitelios cutáneos, su incidencia y posible asociación con distintas neoplasias de la piel en individuos inmunocompetentes de nuestra región. La mayor prevalencia de infección por HPV se identificó en zonas de piel sana expuesta a luz solar, sin embargo también se identificaron virus en muestras de piel con lesiones y en el área perilesionar, demostrando la naturaleza ubicua de estos virus [138]. Estos hallazgos sugerirían que los HPV cutaneotrópicos son altamente prevalentes (entre el 50-90%) en la piel sana de individuos inmunocompetentes, donde establecen infecciones asintomáticas. En base a esto, varios autores han propuesto que la infección por HPV en la piel se adquiriría al inicio de la infancia [139,140], persistiendo de manera comensálica [139-141].

La infección por HPV cutaneotrópicos ha sido estudiada no solamente en relación a su asociación con lesiones sino también teniendo en cuenta otros factores asociados al desarrollo de CPNM. La exposición a luz solar es una de las variables que más se ha relacionado con esta patología [121]. En base a esto, diversos trabajos han logrado identificar mayor frecuencia de tipos de HPV en zonas de piel sana expuestas al sol respecto a las no expuestas [138,139] y diferencias en las frecuencias de infección según los hábitos de exposición al sol [142].

Otra de las posibles variables relacionadas con la infección por HPV y que ha sido ampliamente estudiada es el estado inmunológico de los individuos. En este sentido el número y prevalencia de tipos de HPV detectados en individuos inmunocompetentes e inmunosuprimidos parece ser diferente [29,143].

Respecto a la persistencia de la infección por HPV cutaneotrópicos, se ha podido determinar que muchos tipos normalmente persisten tanto en piel sana [139,144,145] como en lesiones, ya sea en individuos inmunocompetentes como inmunosuprimidos [25,146], siendo los tipos del género Beta PV los que se han asociado más frecuentemente a este tipo de infecciones. Sin embargo, la gran

diversidad de estos virus y las limitaciones técnicas debidas a la especificidad de los cebadores utilizados podrían ser una dificultad a la hora de conocer qué tipos virales persisten y como se relacionan con sus huéspedes.

Cabe destacar que todos los estudios de persistencia de HPV cutaneotrópicos realizados en muestras de piel obtenidas de lesiones o de piel sana han sido llevados a cabo en diferentes países del mundo. En la Argentina tanto la prevalencia como los tipos específicos de HPV circulantes en epitelios de individuos con lesiones cutáneas se han descrito por primera vez en un trabajo realizado en nuestro laboratorio [138]. Teniendo en cuenta que la exposición a la radiación UV es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de CPNM, y que Argentina, por su posición geográfica, es una zona de alto riesgo de radiación UV por la disminución del ozono estratosférico, conocer las características de la infección por HPV en piel sana expuesta al sol de individuos inmunocompetentes permitiría estimar qué tipos circulan y persisten en epitelios cutáneos cuando el principal factor ambiental es la exposición a la radiación UV.

1.3.6. HPV y tropismo

Durante muchos años se consideró que el tropismo de HPV estaba dado por el sitio anatómico en el cual los primeros tipos fueron identificados, y que estaba estrechamente relacionado con las distintas categorías filogenéticas. Así se asumió que virtualmente todos los genotipos que infectan mucosas estaban incluidos en ciertas especies del género Alfa PV (HPV AR: especies 5, 6, 7, 9 y 11; HPV BR: especies 1, 3, 8, 10, 13 y 14) [105]. Sin embargo, los resultados obtenidos como consecuencia de la aplicación de técnicas de detección molecular altamente sensibles indican que la epidemiología de las infecciones de HPV en los distintos epitelios parece ser más compleja. Estudios realizados en muestras de lavados bucales de personas sanas han identificado tipos pertenecientes a los géneros Alfa PV (25%), Beta PV (74%) y Gama PV (12%) [147]. Recientemente se identificaron 4 nuevos tipos del género Beta PV (HPV98, HPV100, HPV104 y HPV113) a partir de tejidos cutáneos que fueron también detectados en la mucosa orofaríngea en muy baja prevalencia [32]. La presencia de tipos cutáneos (géneros Beta PV y Gama PV) asociados al CPNM en orofaringe plantea nuevos interrogantes en la biología de HPV y en su relación epidemiológica con las neoplasias oral y cutánea. Por otro lado se han identificado 3 tipos nuevos del género Gama PV (HPV101, HPV103 y HPV108) en lesiones intraepiteliales de mucosa genital con la particularidad de que no codifican para la oncoproteína E6 [41,148]. Además, se observó que la proteína E7 del HPV108 induce displasia en cultivos en *raft*, aunque con menor severidad a la observada por las proteínas E6/E7 del HPV16 [41]. Nuevos estudios sobre la prevalencia de tipos

de HPV recientemente identificados proponen un tropismo dual de los tipos HPV179, HPV184, HPV199 (Gama PV) [130,149] y del nuevo miembro del género Mu PV, HPV204 [36].

Estos hallazgos indican que la epidemiología de las infecciones causadas por los HPV en distintos epitelios es compleja y que es necesario obtener una mirada completa de la familia *Papillomaviridae* para poder dilucidar las distintas interacciones que estos virus establecen con el hospedero.

1.4 Evolución de los PV

El origen de los PV se encontraría vinculado a los cambios en el epitelio de los primeros reptiles, su huésped ancestral, que surgieron alrededor de 350 millones de años atrás [150,151]. Desde entonces, se hipotetiza que los PV han co-evolucionado con sus respectivos huéspedes, con baja transmisión entre especies, y actualmente infectan epitelios de aves, reptiles, marsupiales y mamíferos [40]. Esta adaptación los ha llevado a tener tasas de mutación bajas, por lo que se ha sugerido que la deriva génica sería la principal fuerza evolutiva que generó su diversificación [15]. Sin embargo, debido a que los PV infectan sus huéspedes por un largo periodo, se postula que las relaciones filogenéticas de los PV tal como las conocemos en la actualidad fueron producto de múltiples fuerzas evolutivas [151]. Esta afirmación está basada en las incongruencias topológicas observadas en los árboles filogenéticos de los HPV, los cuales se agrupan en 5 géneros diferentes dispersos por todo el árbol filogenético. Además, una estricta co-evolución situaría los PV de primates no humanos en una posición basal respecto a los HPV, y no entremezclados con los HPV como se observa [15]. Estos eventos podrían ser explicados por la influencia de otras fuerzas evolutivas como infecciones cruzadas entre especies, recombinación y duplicación de los genomas virales [19,152,153]

1.4.1 Recombinación en PV

El conocimiento general sobre la dinámica evolutiva acerca de los PV plantea que la recombinación tiene un papel menor en la filogenia de estos virus. Sin embargo, la evidencia molecular sugiere que la recombinación es importante para la replicación genómica [154,155], y además, la filogenia y la genómica comparativa determinaron con precisión numerosos eventos de recombinación a lo largo de la historia evolutiva de los PV [151,156]. En ese sentido, algunos autores proponen que los potenciales eventos de recombinación en los PV podrían haber promovido la colonización de nuevos nichos y la emergencia de fenotipos oncogénicos [20]. En efecto, diversos estudios han reportado evidencias de recombinación entre miembros del género Alfa PV, demostrando la posible existencia de eventos de recombinación con soporte estadístico en los genes de expresión tardía y

temprana del genoma de estos virus [152,157]. Como consecuencia de estos fenómenos, es frecuente observar incongruencias filogenéticas al comparar los árboles construidos con los genes de expresión temprana con aquéllos derivados de genes de expresión tardía [156-158]. Interesantemente, las reconstrucciones filogenéticas basadas en los genes de expresión temprana dan como resultado agrupaciones de virus que están asociados a las mismas manifestaciones clínicas. Sin embargo, este patrón desaparece cuando la filogenia se basa en los genes codificantes de la cápside (genes de expresión tardía) [42,156]. Una de las hipótesis que mejor explicaría estas observaciones sería la integración del ORF E5 en el genoma ancestral de los Alfa PV [20]. Esta proteína tiene los mismos patrones evolutivos que el de los genes E6 y E7, pero diferentes a los de los genes tardíos (L1 y L2). Por otro lado, de acuerdo a sus características bioquímicas se han identificado 4 grupos de proteínas E5 que coinciden con las características epidemiológicas de los Alfa PV y con el tipo de lesión que generan en el tejido [42].

Otras evidencias han sido aportadas por Shah y colaboradores quienes propusieron que múltiples eventos de recombinación podrían haber ocurrido en los genes E1 y/o L1 de los PV de primates agrupados en los géneros Alfa PV, Beta PV y Gama PV [159]. Por otro lado se ha demostrado la posible existencia de eventos de recombinación entre miembros de grupos lejanos dentro la familia *Papillomaviridae* y que incluyen PV que infectan a cetáceos [153]. Además, la identificación del BPCV1, un virus que causa carcinomas en marsupiales y que es el resultado de la recombinación entre PV y un miembro de la familia *Polyomaviridae*, ha aportado más evidencias del rol de la recombinación a lo largo de la historia de los PV [160].

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la recombinación ha jugado un papel importante durante la evolución de los PV, sobre todo en los miembros del género Alfa PV, habiéndose documentado además eventos de recombinación *in vivo* en variantes del HPV16 [161].

Sin embargo, en la actualidad no existen estudios que analicen la recombinación en un género sumamente numeroso y divergente como el Gama PV, en donde en los últimos años se han identificado un gran número de nuevos virus. En este sentido, consideramos que son necesarios mayores y continuos esfuerzos para obtener una visión más profunda de la historia evolutiva de los PV, especialmente de los virus agrupados en el género Gama PV.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

El cáncer es la principal causa de muerte en los países desarrollados, aunque más de la mitad de los decesos anuales ocurren en países en vías de desarrollo. Los virus oncogénicos causan cáncer por inducción de cambios que afectan la expresión o función de proteínas reguladoras que intervienen en el control de la proliferación celular. Se estima que aproximadamente el 20% de todos los casos de cáncer en humanos están asociados a la infección por virus oncogénicos, ya sea como agentes causales o como cofactores, entre los que se encuentran los HPV. Actualmente se han descrito más de 200 tipos distintos de HPV, el 25% de los cuales está asociado a infecciones de mucosas y el 75% fue identificado en epitelios cutáneos. Además, se han identificado más de 150 potenciales tipos nuevos, en su mayoría en piel, de los cuales se conocen sólo fragmentos genómicos parciales y se ignoran las implicancias clínicas de sus infecciones.

En relación a los HPV que infectan mucosas, está firmemente establecido que la infección persistente con tipos AR es el evento clave en el desarrollo del cáncer anogenital, en particular el de cuello uterino y de sus lesiones precursoras [70]. La introducción masiva de la vacuna contra HPV16 y HPV18, responsables en forma conjunta del >70% de los casos de carcinoma cervical, constituye un avance inédito en la prevención de esta patología en nuestro país. No obstante, una de las incógnitas que surge en la era post-vacuna a nivel global es la posibilidad que otros HPV oncogénicos ocupen el nicho ecológico de los tipos vacunales.

Como resultado de la asociación hallada entre HPV y el cáncer anogenital, existe gran interés en determinar el posible rol del virus en el desarrollo de cáncer en otros epitelios, entre ellos el CPNM. La incidencia del CPNM ha incrementado notablemente en los últimos años, alcanzando un 30% del total de las neoplasias en el mundo [162,163]. El CCE constituye el 20% de los casos de CPNM y uno de los principales factores de riesgo para su desarrollo es la exposición inadecuada a los rayos solares y se postula un rol temprano del HPV como cofactor de la radiación UV.

En base a lo expuesto, el objetivo general de este trabajo de tesis fue avanzar en el conocimiento de la familia *Papillomaviridae* mediante la identificación y caracterización de la infección por HPV en epitelios cutáneos y mucosos en nuestra región para contribuir a la taxonomía y a la vigilancia epidemiológica a nivel molecular ante las diferentes presiones selectivas que afectan a cada grupo de HPV.

2.2 Objetivos específicos

- I. Epidemiología de la infección por HPV en cérvix de mujeres con diagnóstico de patología cervical
 - I.1. Análisis de la competencia del sistema L1HPVPCR para detectar 15 tipos de HPV mucosotrópicos
 - I.2. Análisis de la prevalencia y persistencia de tipos de HPV en cérvix de mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical

- II. Epidemiología de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar de individuos inmunocompetentes
 - II.1. Análisis de la prevalencia de la infección por HPV en 3 estaciones climáticas durante un año
 - II.2. Análisis de la persistencia de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar en 3 estaciones climáticas y de la posible asociación con factores demográficos y de comportamiento.

- III. Caracterización de nuevos tipos de HPV y análisis de eventos de recombinación en el género Gama PV
 - III.1. Caracterización genómica y análisis filogenético de 3 nuevos tipos identificados en piel: HPV205, HPV210 y HPV209.
 - III.2. Análisis *in silico* de posibles eventos de recombinación en el género Gama PV mediante herramientas bioinformáticas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Pacientes y muestras clínicas

Las actividades y procedimientos involucrados en el estudio global realizado en este trabajo de tesis en epitelios mucosos y cutáneos fueron oportunamente evaluados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Expte. N° 6060/134). A continuación se detallan las características específicas llevadas a cabo para abordar los objetivos planteados.

3.1.1. Características del estudio epidemiológico de la infección por HPV en cérvix (epitelios mucosos)

Se realizó un estudio longitudinal de tipo descriptivo entre los años 2005 y 2009 con el objetivo de determinar la prevalencia y persistencia de la infección por HPV en mujeres no vacunadas contra HPV con diagnóstico de patología cervical que concurren al Servicio de Ginecología del Hospital-Escuela “Eva Perón” (HEEP) de la ciudad de Granadero Baigorria (provincia de Santa Fe). Los criterios de exclusión fueron: mujeres con desórdenes psiquiátricos, y/o que no estuvieron en condiciones de dar su consentimiento informado, mujeres histerectomizadas, y mujeres que habían recibido alguna de las vacunas contra HPV disponibles en Argentina.

Los procedimientos del presente estudio fueron oportunamente evaluados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Expte. 6060/077) y por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital-Escuela “Eva Perón” (Expte. 5661/26). Todas las pacientes involucradas en el estudio firmaron su consentimiento informado (Ver Anexo I).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, 115 mujeres fueron incluidas en el protocolo. Todas ellas recibieron un examen ginecológico completo que incluía análisis citológico, análisis del ADN de HPV y, en caso de ser necesario, colposcopia y análisis histológico. El análisis citológico (prueba de Papanicolaou) se informó de acuerdo al sistema Bethesda 2001 [164], el cual consta de las siguientes categorías: NEGATIVO, ASC-US (lesión en células escamosas de significado indeterminado), L-SIL y H-SIL.

Además, las pacientes respondieron un cuestionario (Anexo I) en el cual se les solicitó información demográfica, epidemiológica, de conducta sexual e información de algunos co-factores relacionados con el desarrollo del cáncer cervical (antecedentes de ITS, estado de infección por el HIV-1 y hábito de fumar tabaco).

Es importante enfatizar que todas las prácticas que se llevaron a cabo en el curso de este estudio fueron efectuadas según las normas del Servicio de Ginecología del HEEP y que el análisis del ADN de HPV no afectó de ninguna manera el diagnóstico, las decisiones terapéuticas y/o el seguimiento de las pacientes. En ese sentido, los ginecólogos/as involucrados/as no fueron

informados/as durante el estudio de los resultados obtenidos en los ensayos moleculares para evitar influenciar su criterio y la toma de decisiones.

3.1.2. Características del estudio epidemiológico de la infección por HPV en piel (epitelios cutáneos)

Se realizó un estudio longitudinal de tipo descriptivo entre los años 2013 y 2014 con el objetivo de determinar la prevalencia y persistencia de la infección por HPV en zonas de piel sana expuesta a la radiación solar en individuos inmunocompetentes que asistieron a los laboratorios u oficinas administrativas cercanos a nuestro laboratorio por vínculo laboral. El estudio tuvo 1 año de duración y se recolectaron 3 muestras/voluntario en 3 estaciones climáticas diferentes: primavera (octubre 2013), verano (marzo 2014) e invierno (agosto 2014).

El protocolo de enrolamiento y los procedimientos fueron evaluados y aprobados oportunamente por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR (Expediente 6060/134, Resolución 418/2013). Todas las personas incluidas en este estudio firmaron su consentimiento informado y respondieron a una encuesta con el fin de conocer sus hábitos de exposición solar (horas de exposición solar/semana y uso de protector solar) y características demográficas (Ver anexo I).

Se recolectaron muestras de cada voluntario con hisopos pre-humedecidos en solución de NaCl 0,9% de áreas de piel sana de sitios expuestos al sol (frente) que fueron frotados hacia delante y hacia atrás 10 veces sobre un área de piel de aproximadamente 5x5 cm² y luego colocados en un tubo conteniendo 1 ml de la solución salina (NaCl 0,9%).

3.1.3. Procesamiento de muestras clínicas

3.1.3.1 Procesamiento de muestras clínicas cervicales

Se recolectaron las células de la mucosa cervical retenidas en el cepillo cervical (Cervicep, Argentina) raspando el mismo sobre las paredes del tubo de 1,5 ml (conteniendo 1 ml de PBS) donde la muestra fue recolectada. Con el objetivo de concentrar las células y eliminar el material no deseado, las mismas fueron centrifugadas a 10.000 rpm (Eppendorf MiniSpin, Alemania) por 3 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en PBS. Se repitió el procedimiento de recolección de células, centrifugación y resuspensión hasta observar el cepillo libre de material celular. Finalmente, la suspensión celular resultante de la unión de los pellet obtenidos del cepillo fue centrifugada a 10.000 rpm por 3 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se lisó con tampón de lisis (1% Tween 20, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,3) y 100 µg de proteinasa K (Sigma) en un volumen de 100-500 µl dependiendo del pellet celular. Las mezclas

se incubaron a 56°C durante 12-16 hs con posterior inactivación de la Proteinasa K a 95°C por 10 min y conservadas a -20°C hasta su uso.

3.1.3.2. Procesamiento de muestras clínicas de piel

Cada hisopo fue agitado vigorosamente para desprender las células y luego descartado. Se obtuvo un pellet celular centrifugando a 10.000 rpm por 5 minutos y el pellet fue luego resuspendido en 100-200 µl de tampón de lisis conteniendo 100 µg de proteinasa K (Sigma) e incubado por 12-16 horas a 55°C con agitación en baño seco. Luego de inactivar la proteinasa K a 95°C, los lisados fueron guardados a -20°C para su posterior análisis.

3.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Para todas las reacciones de amplificación se utilizaron termocicladores Mastercycler® modelos 5331 y 5332 (Eppendorf, Alemania) y T100 (Bio-Rad, EE.UU).

3.2.1. Diseño de cebadores

Los cebadores y sondas diseñados para este trabajo de tesis fueron analizados mediante alineamientos múltiples con las secuencias de referencia, utilizando diferentes herramientas bioinformáticas como el programa Primer Select (DNA Start) y las plataformas webs Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) y NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>). Estos programas fueron utilizados para analizar las combinaciones de cebadores y también excluir la formación de homo y heterodúplex, como así también de estructuras “hairpins”. Por otro lado se descartó “*in silico*” la formación de productos inespecíficos utilizando la herramienta MFEprimer-2.0 (<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/index.cgi/>), la cual permite verificar la unión de los cebadores a regiones de ADN humano. En la Tabla 4 se detallan las secuencias y nombres de todos los cebadores utilizados en este trabajo.

Tabla 4: Cebadores utilizados en este trabajo

Cebador	Secuencia	Blanco	Ensayo	Característica
FAP64-Rv*	CCWATATCWVHCATITCICCATC	HPV L1	FAP/Amplificación genoma completo	Genérico
FAP59-Fw*	TAACWGTIGGICAYCCWTATT	HPV L1	FAP	Genérico
FAP6085-Fw**	CCWGATCCHAATMRRTTTGC	HPV L1	FAP/Amplificación genoma completo	Genérico
FAP6319-Rv**	ACATTTGIAITTTGTTDGGRTCAA	HPV L1	FAP	Genérico
CUT1BRv~	TCIACCATRTCICCRCTCYT	HPV L1	CUT	Genérico

Cebador	Secuencia	Blanco	Ensayo	Característica
CUT1Fw~	TRCCiGAYCCiAATAARTTTG	HPV L1	CUT	Genérico
CUT1AFw~	TRCCIGAYCCIAACAGRTTTG	HPV L1	CUT	Genérico
CUT1BFw~	TRCCIGAYCCIAATAGRTTTG	HPV L1	CUT	Genérico
CUT1CFw~	TRCCIGAYCCIAATAGRTTTG	HPV L1	CUT	Genérico
E1 γ 2-Fw&	KGGHCCWCCAGATACWGG	γ -HPV E1	Amplificación genoma completo	Genérico
E1 β 2-Rv&	TCTTGYAGWRCAYTGAAACG	β -HPV E1	Amplificación genoma completo	Genérico
27A-Fw+	GGAGGGCCTTTGGGTATT	HPV173 85% L1	Amplificación genoma completo	Específico
27A-Rv+	ACGCGTTTCTTAGGTTTTGAT	HPV173 85% E1	Amplificación genoma completo	Específico
43A-Fw+	AAAAGTGTCTGCAAACCAATGTCTG	FA91 L1	Amplificación genoma completo	Específico
43A-Rv+	CAGGCTCTCCCGTGTCTCCA	FA91 E1	Amplificación genoma completo	Específico
V77-1_Fw+	CAGCCCCTATCAGAAACTAAACTT	HPV107 88% E1	Amplificación genoma completo	Específico
V77-1_Rv+	CTACGCAGGCCATACTAATCT	HPV107 88% L1	Amplificación genoma completo	Específico
V48-1_FwA+	CCGGTGATGGGGCAGAAC	HPV132 82% E1	Amplificación genoma completo	Específico
V48-1_RvA+	CAAAACGGGCGGTCAGTGT	HPV132 82% L1	Amplificación genoma completo	Específico
MY 11^	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	HPV L1	L1HPVPCR	Genérico
MY 09^	b-CGTCCMAARGGAWACTGATC	HPV L1	L1HPVPCR	Genérico
MYGC09#	b-CGACCCARWGGAAAYTGATC	HPV L1	L1HPVPCR	Genérico
MY 18Fw+	###	HPV18 ###	L1HPVPCR	Específico
MY 45Fw+	###	HPV18 ###	L1HPVPCR	Específico
MY 1845Rv+	###	HPV18, HPV45 ###	L1HPVPCR	Específico
PC04##	CAACTTCATCCACGTTCCACC	gen β - globina	β -globina	Específico
GH20##	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	gen β - globina	β -globina	Específico

* cebador diseñado previamente por Forslund y cols. [28]

** cebador diseñado previamente por Forslund y cols. [133]

+ cebadores diseñados en este trabajo

~ cebador diseñado previamente por Chouhy y cols. [138]

& cebador diseñado previamente por Chouhy y cols. [35]

^ cebador diseñado previamente por Manos y cols. [165]

cebador diseñado previamente por Chouhy y cols. [99]

cebador diseñado previamente por Bauer y cols., Saiki y cols. [166,167]

protegido por secreto industrial

b-: Biotina; w: a/t; y: c/t; m: a/c; r: a/g; v: a/c/g; h: a/c/t; d: a/g/t.

3.2.2. PCR para la amplificación del gen de la β -globina

Todas las muestras provenientes de epitelios cutáneos y mucosos fueron analizadas mediante la amplificación de β -globina con los cebadores PC04/GH20 [166,167] para verificar la integridad de cada una de ellas. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 30 μ l conteniendo 200

μM de cada dNTP; 0,4 μM de cada uno de los cebadores GH20 y PC04; 1 U de Taq ADN polimerasa; solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM; 0,08% Nonidet P40); 2,5 mM de MgCl₂. Se alicuotaron 27 μl de la mezcla de PCR por microtubo y se agregaron 3 μl de muestra conteniendo el ADN molde. El perfil térmico utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial (2 min a 95°C), seguida por 45 ciclos de amplificación (20 s a 94°C, 20 s a 55°C y 20 s a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C).

3.2.3. PCR de colonias.

Para verificar la presencia del plásmido recombinante con el inserto de interés en las bacterias transformadas se recogió con un palillo la colonia bacteriana a analizar y se resuspendió en 30 μl de H₂O destilada estéril. La lisis celular se realizó incubando 10 min en baño seco a 98°C. La técnica de PCR de colonias se utilizó para analizar los plásmidos clonados con productos de PCR de 200-500 pb provenientes de las técnicas de tamizaje CUT y FAP y de los plásmidos clonados con los productos de aproximadamente 4.000 pb provenientes de la amplificación de fragmentos largos. Las condiciones de reacción en 30 μl fueron las mismas tanto para la amplificación de fragmentos cortos (200-500 pb) como largos (4.000 pb): 133 μM de cada dNTP; 0,266 μM de los cebadores M13Fw y M13Rv; 0,75 U de Taq ADN polimerasa; solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM; 0,08% Nonidet P40); 2,5 mM de MgCl₂. Se alicuotaron 25 μl de la mezcla de PCR en microtubos y se agregaron 5 μl de lisado bacteriano como molde para cada reacción de PCR. El perfil térmico utilizado dependió de si se amplificaban fragmentos cortos o largos.

Perfil térmico para fragmentos cortos: desnaturalización inicial (2 min a 95°C), seguida por 35 ciclos de amplificación (1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C).

Perfil térmico para fragmentos largos: desnaturalización inicial (2 min a 95°C), seguida por 40 ciclos de amplificación (40 s a 94°C, 40 s a 55°C y 2 min a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C).

3.3. Estrategias para el tamizaje de HPV

3.3.1. Estrategias para el tamizaje de HPV en cérvix.

La identificación de HPV en las muestras de cérvix se llevó a cabo con 2 estrategias de amplificación molecular desarrolladas en nuestro laboratorio: el ensayo L1HPVPCR 16.4.1 [99,168] y el sistema de amplificación CUT [138].

3.3.1.1. Sistema L1HPVPCR 16.4.1

El sistema L1HPVPCR es un ensayo basado en los cebadores genéricos MY11/09 considerados de referencia para el análisis de HPV mucosos [165], hibridación con sondas y detección colorimétrica

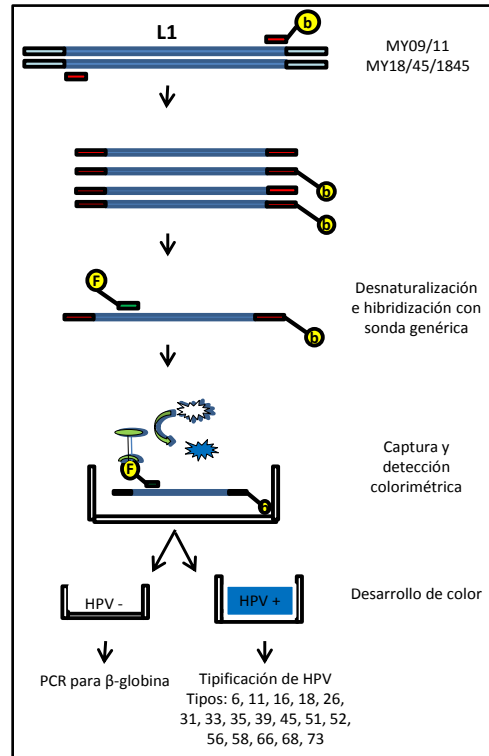
en formato ELISA [168] para la amplificación de HPV y tipificación de 15 tipos mucosotrópicos (BR: tipos 6, 11; AR: tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66, 68b) [99]

Las condiciones de reacción en un volumen final de 50 μ l fueron las siguientes: 300 μ M de cada dNTP; 0,55 μ M del cebador MY09, 0,7 μ M del cebador MY11, 0,15 μ M del cebadores MYGC09 y concentraciones variables de los cebadores MY1845Rv, MY18Fw y MY45Fw (concentraciones reales protegidas por secreto industrial); 2,5 U de Taq ADN polimerasa; solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM; 0,08% Nonidet P40); 3,5 mM de MgCl₂. Todos los cebadores anti-sentido (MY09, MYGC09, MY1845Rv) fueron modificados con la inclusión de una molécula de Biotina en el extremo 5'.

El perfil térmico utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial (2 min a 95°C), seguida por 40 ciclos de amplificación (40 s a 94°C, 40 s a 52°C y 40 s a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C).

Para la hibridación y detección colorimétrica, se tomaron 2,5 μ l del producto de amplificación biotinilado y se adicionaron a 60 μ l de solución de hibridación conteniendo una cantidad adecuada de sonda (genérica o específicas) conjugada a fluoresceína (Figura 12). La mezcla se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizar el ADN y luego a la respectiva temperatura de hibridación (TH) durante 10 minutos para hibridar la sonda. Se transfirieron 45 μ l del producto de hibridación a los pocillos de las microplacas revestidas con estreptavidina. Así, el híbrido producto biotinilado-sonda fluoresceinada se captura en la microplaca a través de la unión biotina-estreptavidina. Luego de incubar la microplaca 1 hora a 37°C, los productos no unidos fueron removidos mediante 8 lavados con solución de lavado. Posteriormente, se procedió a la detección de los productos de hibridación capturados en la microplaca con un anticuerpo anti-Fluoresceína (Anti-Fluorescein-POD, Fab fragments, Roche, Argentina). Se agregaron 100 μ l de una dilución apropiada del anticuerpo anti-Fluoresceína preparada con la solución diluyente del conjugado a cada uno de los pocillos de la microplaca. La microplaca se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Finalmente se lavó para remover el conjugado no unido. El revelado se realizó mediante reacción cromogénica (Wiener Laboratories, Argentina) en la que se adicionaron a cada pocillo una gota de H₂O₂ y una gota de tetrametilbencidina (TMB). La reacción se frenó a los 30 min mediante el agregado de una gota de solución de H₂SO₄ 1M y el color se midió a 450 nm en un lector de microplacas (Stat-Fax 2100, Awareness Technology Inc, EE.UU.) usando un filtro de referencia de 630 nm.

Figura 12: Representación esquemática del Sistema de L1HPVPCR 16.4.1



b: Biotina; F: fluoresceína

Una muestra se consideró HPV-positiva cuando su valor de absorbancia luego de la detección colorimétrica con la sonda genérica fue mayor que el valor de corte, determinado como 2,5 veces los valores de absorbancia de los controles negativos (1ng/μl DNA placenta), como definido previamente [168]. Una muestra se consideró positiva para un dado tipo de HPV cuando su valor de absorbancia luego de la detección colorimétrica con su sonda específica fue mayor que el valor de corte, determinado como 4 veces los valores de absorbancia de los controles negativos, como definido previamente [168].

Las TH de las sondas utilizadas para la detección y tipificación de 16 HPV se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5: Sondas utilizadas en este trabajo

Nombre	Secuencia	Blanco	Función	TH
MYB-12 ††	F-CATCCGTAACATCTTCCA	HPV6	Sonda específica	40°C
MYB-13 ††	F-TCTGTGTCTAAATCTGCTACA	HPV11	Sonda específica	40°C
MYB95 ††	F-GTCATTATGTGCTGCCATATC	HPV16	Sonda específica	40°C
MYB133 ††	F-GTAACATCCCAGGCAATTG	HPV16	Sonda específica	40°C
WDB74 ††	F-GGATGCTGCACCGGCTGA	HPV18	Sonda específica	40°C
MYB130 ††	F-GGGCAATATGATGCTACCAA	HPV18	Sonda específica	40°C
WDB128 ††	F-TTGCAAACAGTGATACTACATT	HPV31	Sonda específica	55°C
AG111 †	F-CAAAAGCCCAAGGAAGATC	HPV31	Sonda específica	55°C
MYB16 ††	F-CACACAAGTAAGTAGTGACAG	HPV33	Sonda específica	55°C
MYB64 ††	F-AAAAACAGTACCTCCAAAGGA	HPV33	Sonda específica	55°C
MYB115 ††	F-CTGCTGTGTCTTCTAGTGACAG	HPV35	Sonda específica	55°C
MYB117 ††	F-GCACCAAAACCTAAAGATGAT	HPV35	Sonda específica	55°C
MYB89 ††	F-TAGAGTCTCCATACCTTCTAC	HPV39	Sonda específica	40°C
EB39 **	F-CCTACAGTCTGCAGCCATTA	HPV39	Sonda específica	40°C
MYB69 ††	F-ACTACTACACCTCCAGAAAAGC	HPV45	Sonda específica	40°C
MYB129_RC ††	F-CTCTACACAAAATCCTGTGC	HPV45	Sonda específica	40°C
BC_51*	F-CACTGCCACTGCTGCGGTTTC	HPV51	Sonda específica	40°C
MYB81 ††	F-CACTTCTACTGCTATAAAGTTGT	HPV52	Sonda específica	40°C
MYB197 ††	F-GCACAGCTATAACATGTCAACG	HPV56	Sonda específica	40°C
CHG56 *	F-GCTAACCTACTGGAGGACTGG	HPV56	Sonda específica	40°C
CHG58 †	F-GCACTGAAGTAAGTAAGGAAGGTA	HPV58	Sonda específica	40°C
MYB179 ††	F- GACATTATGCACTGAAGTAAGTAAG	HPV58	Sonda específica	40°C
MY162 †††	F-CCTAATGWATACACCTACCA	HPV59	Sonda específica	40°C
MYB83 ††	F-ATTAATGCAGCTAAAAGCACATT	HPV66	Sonda específica	40°C
MYB194 ††	F-CTACTACTGAATCAGCTGTACC	HPV68	Sonda específica	40°C
MYB191 ††	F- CATACCGCTATCTGCAATCAG	HPV68	Sonda específica	40°C
GPX	F- CTGTKGTWGATACYACWCGCAGTAC	HPV	Sonda genérica	40°C

F: Fluoresceína; w:a/t; y:c/t; m:a/c; r:a/g; v:a/c/g; h:a/c/t; d:a/g/t.

* Sonda diseñada en el trabajo de tesis del Dr. Diego Chouhy.

** Sonda diseñada en este trabajo

† Sonda diseñada previamente Chouhy y cols. [168].

†† Sondas diseñados previamente por otros Manos y cols. [165].

††† Sondas diseñados previamente por otros Hildesheim y cols. [169]

3.3.1.1 Soluciones utilizadas para la detección colorimétrica en microplacas.

Solución de hibridación (5X SSC):

NaCl 0,75 M

Citrato de sodio 0,075 M

Diluyente de anticuerpo:

Tris-HCl pH 7,6 100 mM

NaCl 150 mM

Solución de lavado (20X):

2X SSC

Polivinilpirrolidona 2%

Tween 20 0,2%

3.3.1.2. Sistema de amplificación CUT

La amplificación de HPV con sistema CUT [138] se llevó a cabo mediante la técnica de “Hanging-droplet” PCR o PCR de la “gota colgante” [170], y es una variación de la PCR anidada que no requiere la apertura del tubo entre la primera y segunda ronda de amplificación (Figura 13). La técnica de “PCR de la gota colgante” consiste en la preparación de dos mezclas de reacción (MIX I y MIX II). La MIX I se agrega en el fondo del tubo de PCR junto con la muestra y una gota de aceite mineral, mientras que la MIX II se agrega a la tapa del tubo. Ambas mezclas de reacción contienen todos los reactivos necesarios para la amplificación de forma que una vez cerrado el tubo no se vuelve a abrir en la segunda ronda de amplificación. La primera ronda de amplificación se realiza sin calentar la tapa del termociclador para evitar la evaporización de la MIX II, mientras el aceite mineral evita la evaporación de la MIX I. Luego de la primera ronda de amplificación, el tubo de PCR se centrifuga 1 minuto a 12.000 rpm para poner en contacto la MIX II con la primera reacción y el conjunto es sometido a la segunda ronda de amplificación.

La primera mezcla de reacción (20 µl de MIX I) se agregó en el tubo y se cubrió con una gota de aceite mineral. Luego de la adición de 5 µl de muestra, la mezcla alcanzó un volumen final de 25 µl conteniendo 200 µM de cada dNTP; 0,06 µM CUT1Fw; 0,0133 µM CUT1AFw; 0,0133 µM CUT1BFw; 0,0133 µM CUT1CFw; 0,1 µM CUT1BRv (ver Tabla 3); 1 U Taq ADN polimerasa; buffer 1,5X (Tris-HCl 112,5 mM pH 8,8; 30 mM (NH₄)₂SO₄; 0,015% Tween20); y MgCl₂ 3,5 mM. Antes de cerrar el tubo se agregó una gota de 25 µl de MIX II [400 µM de cada dNTP; 0,42 µM CUT1Fw; 0,06 µM CUT1AFw; 0,06 µM CUT1BFw; 0,06 µM CUT1CFw; 0,6 µM CUT1BRv; 2,5 U Taq ADN polimerasa; buffer 1,5X (Tris-HCl 112,5 mM pH 8,8; 30 mM (NH₄)₂SO₄; 0,015% Tween20); MgCl₂ 3,5 mM] en la tapa del tubo. Se utilizó un programa de ciclado sin calentar la tapa del termociclador utilizando el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial (2 min a 94°C), seguida por 20 ciclos de amplificación (30 s a 94°C, 2 s a 60°C, seguido de una rampa de 0,2°C/s hasta 55°C, 10 s a 55°C y 40 s a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C). Luego de la primera ronda de amplificación, la “gota colgante” se incorporó a la mezcla de reacción (volumen final: 50 µl) mediante 1 min de centrifugación a 12.000 rpm. Luego se realizó el segundo perfil térmico:

desnaturalización inicial (2 min a 94°C), seguida por 40 ciclos de amplificación (30 s a 94°C, 2 s a 60°C, seguido de una rampa de 0,2°C/s hasta 52°C, 10 s a 52°C y 40 s a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C).

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 2% y tinción con solución de bromuro de etidio. Aquellos productos que resultaron en bandas del tamaño esperado (390 pb aproximadamente) fueron secuenciados por un servicio especializado (Macrogen, EE.UU.).

3.3.2. Estrategias para el tamizaje de HPV en piel.

La detección e identificación de HPV en muestras de piel se llevó a cabo con 2 estrategias de amplificación molecular: y el sistema de amplificación CUT (ver sección 3.3.1.2.) [138] y el sistema de amplificación FAP [133], considerado de referencia para la amplificación de HPV cutaneotrópicos.

3.3.2.1. Sistema de amplificación FAP

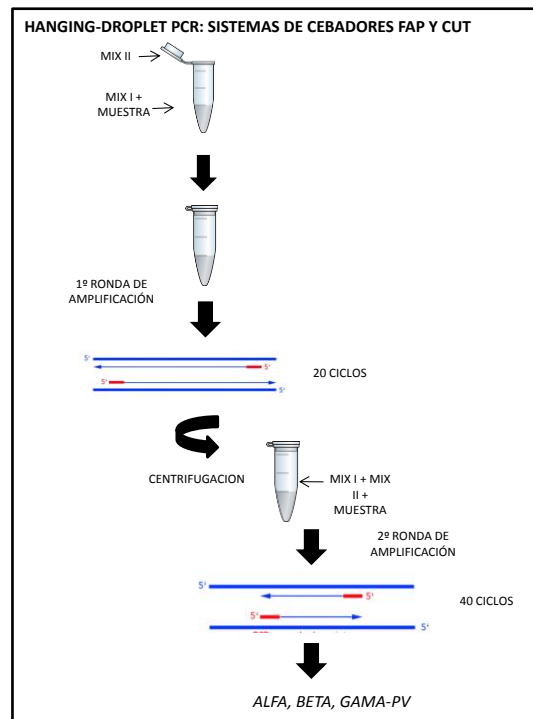
Se utilizó el sistema de amplificación desarrollado por Forslund [133] con los cebadores externos FAP59/FAP64 y los cebadores internos FAP6085F/FAP6319R (ver Tabla 4), y la técnica de la “gota colgante” como estrategia de amplificación [170], ya descrita para el sistema CUT (Figura 13, Sección 3.3.1.2). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: la primera amplificación se realizó utilizando la siguiente mezcla de reacción: 200 µM dNTP; 0,1 µM FAP59; 0,1 µM FAP64; 0,625 U Taq ADN polimerasa; buffer 1X (Tris-HCl 112,5 mM pH 8,8; 30 mM (NH₄)₂SO₄; 0,015% Tween20); MgCl₂ 3,5 mM; BSA 0,2%), con un perfil térmico de desnaturalización inicial (2 min a 94°C), seguida por 20 ciclos de amplificación (30 s a 94°C, 2 s a 60°C, seguido de una rampa de -0,2°C/s hasta 50°C, 10 s a 50°C y 40 s a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C). En la segunda reacción de amplificación se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 200 µM dNTP; 1 µM FAP6085; 1 µM FAP6319; 1,25 U Taq ADN polimerasa; buffer 1X [Tris-HCl 112,5 mM pH 8,8; 30 mM (NH₄)₂SO₄; 0,015% Tween20]; MgCl₂ 3,5 mM; BSA 0,2%, con un perfil térmico de desnaturalización inicial (2 min a 94°C), seguida por 40 ciclos de amplificación (30 s a 94°C, 2 s a 60°C, seguido de una rampa de -0,2°C/s hasta 50°C, 10 s a 50°C y 40 s a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C).

Al igual que para el sistema CUT, se analizaron los productos amplificados con geles de agarosa al 2% y debido a que los cebadores FAP están diseñados para una amplificación por PCR anidada convencional, los tamaños de las bandas de amplificación específica de HPV fueron: 235 pb (fragmento *nested*), 340 pb (fragmento *hemi-nested*) y 480 pb (fragmento externo). Los productos

que resultaron en alguna de estas bandas se secuenciaron en un servicio especializado (Macrogen, EE.UU.).

Tanto para el sistema CUT como para el FAP, aquellos amplicones que presentaron cromatogramas con secuencias solapadas fueron “marcados” como posibles infecciones múltiples. En estos casos los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T-Easy (Promega, Argentina). Los clones con el inserto correspondiente fueron identificados mediante PCR de colonia utilizando los cebadores M13Fw/Rv (Sección 3.2.3.). Los productos de PCR y/o plásmidos fueron purificados y secuenciados a través de un servicio especializado (Macrogen, EE.UU.).

Figura 13: Representación esquemática de los sistemas de amplificación CUT y FAP basados en la estrategia de PCR de la “gota colgante”

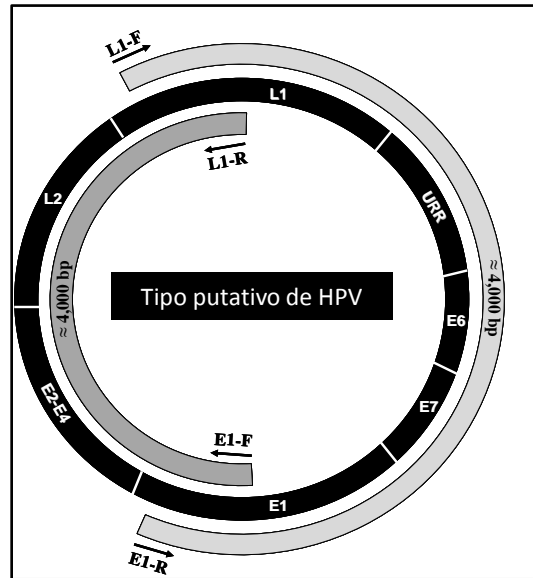


3.3.2.2. PCR altamente sensible para fragmentos largos: Caracterización de nuevos tipos de HPV

Para la identificación y caracterización de los genoma completos de los nuevos tipos putativos de HPV identificados se utilizó una técnica ultrasensible denominada “PCR altamente sensible para fragmentos largos” [35] que fue desarrollada en nuestro laboratorio y es aplicable a genomas circulares como el de los PV. Esta técnica permite la amplificación de fragmentos largos de ADN con mayor eficiencia que las técnicas convencionales para tal fin. La misma fue optimizada en

formato de PCR de “gota colgante” para aumentar su sensibilidad (Figura 13). Por medio de esta técnica se buscó amplificar dos fragmentos solapantes de alrededor de 4 kpb correspondientes a las mitades genómicas de los tipos putativos de HPV que se desean caracterizar mediante el uso de cebadores genéricos o específicos que hibridan en las regiones L1 y E1 (Figura 14).

Figura 14: Estrategia de “PCR altamente sensible para fragmentos largos”



Para la identificación del genoma completo de los nuevos tipos putativos de HPV. Se utilizó la enzima *Expand Long Range dNTPack* (Roche, Argentina) que permite la amplificación de fragmentos largos (hasta 20 kpb) con alta eficiencia.

Las condiciones de la PCR de “gota colgante” para lograr la amplificación de fragmentos de alrededor de 4 kpb fueron las siguientes: MIX I: 500 μ M de cada dNTP, 0.5 μ M de cada cebador sentido y anti-sentido según corresponda (Tabla 4), 1X solución tapón con $MgCl_2$ y 2 U de *Expand Long Range*; MIX II: 600 μ M de cada dNTP, 1.2 μ M de cada cebador sentido y anti-sentido según corresponda (Tabla 2), 1X solución tapón con $MgCl_2$, 0.25 mM de $MgCl_2$ y 4 U *Expand Long Range*. Cada una de las reacciones tenía un volumen final de 25 μ l utilizando 1 μ l de muestra.

El perfil térmico empleado para la amplificación de las mitades genómicas fue el siguiente: 2 min a 92°C seguido de 15 s a 92°C, 40 s de hibridación a 50°, 52° o 55°C y 5 min de elongación a 68°C (1 min cada 1.000 pb). Los tiempos de elongación se aumentaron en cada ciclo entre 10-20 s hasta completar los 25 ciclos en la primera reacción y los 45 ciclos en la segunda.

Los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T-Easy (Promega) o TOPO XL (Invitrogen). Los clones con el inserto correspondiente fueron identificados mediante amplificación

por PCR utilizando los cebadores M13Fw/Rv (Sección 3.2.3.). Los productos de PCR y/o plásmidos fueron purificados y secuenciados a través de un servicio especializado (Macrogen, EE.UU.).

3.3.2.2.1. Diseño de cebadores para la “PCR altamente sensible para fragmentos largos”.

Los cebadores utilizados en este trabajo para la caracterización de las mitades genómicas de los tipos putativos de HPV de interés se listan en la Tabla 3.

Utilizando el programa Mega 5 se realizó el apilamiento de las secuencias nucleotídicas de los tipos de referencia pertenecientes a los géneros Beta PV y Gama-PV disponibles en el banco de datos provisto por el “*National Center for Biotechnology Information*” (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sucesivamente, se diseñaron distintos cebadores genéricos para hibridar en las regiones L1 y E1, seleccionando aquéllos que presentaban el menor número de bases desapareadas con respecto a el/los tipo/s de referencia que estaban más filogenéticamente relacionados con el/los tipo/s putativos cuyo/s genoma/s se quería caracterizar completamente. Brevemente, los cebadores genéricos seleccionados mediante este análisis para los tipos putativos presentados en este trabajo fueron: E1 γ 2-Fw para la región E1 de Gama PV, FAP64-Rv y FAP6085-Fw, para la región L1 de Gama PV, E1 β 2-Rv para la región E1 de Beta PV y FAP6085-Fw para la región L1 de Beta PV (Tabla 4). Por otro lado, el diseño y la selección de los cebadores específicos se realizaron con el programa Primer Select.

3.4 Análisis de secuencias y filogenia.

3.4.1. Análisis de secuencias y filogenia de HPV amplificados con los sistemas CUT y FAP.

Las secuencias derivadas de la amplificación con los sistemas CUT y FAP fueron comparadas con las secuencias de HPV disponibles en la base de datos de GenBank utilizando la herramienta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). El análisis de las relaciones filogenéticas de las secuencias identificadas fue realizado teniendo en cuenta la clasificación taxonómica propuesta por de Villiers [18]. En base a esto, las variantes deben presentar variaciones nucleotídicas en el gen L1 menores al 100% pero mayores al 98% con el tipo más relacionado, los subtipos deben presentar una identidad nucleotídica menor al 98% y mayor al 90% con el tipo más relacionado, y un nuevo tipo de HPV es aquel que presenta identidad nucleotídica en el gen L1 menor al 90% con los tipos previamente identificados. Además, las especies dentro de un mismo género comparten entre el 60% y el 70%.

Respecto a los HPV mucosotrópicos, se consideraron HPV BR o AR de acuerdo a su relación filogenética [18,105]. En base a esto, los tipos 16, 18, 26, 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58,

59, 66, 68 fueron considerados tipos AR mientras que los tipos 6, 11, 13, 43, 61, 62, 74, 78, 81, 83, 86, 87, 89 y 91 fueron considerados tipos BR.

3.4.2. Análisis de secuencias y filogenia de nuevos tipos de HPV caracterizados con el sistema “PCR altamente sensible para fragmentos largos”

Los plásmidos conteniendo fragmentos de alrededor de 4 kbp generados con la herramienta “PCR altamente sensible para fragmentos largos” y que pertenecían a una mitad genómica de un nuevo tipo de HPV (ver sección 3.3.2.2) se secuenciaron en un servicio especializado (University of Maine) utilizando la estrategia de “primer walking”. El ensamblado y análisis de las secuencias generadas fue realizado con el programa Mega 6 [171]. Los marcos de lectura abierta de los tipos nuevos de HPV fueron determinados utilizando la función de búsqueda de ORF del programa SnapGene 1.1.3 (GSL Biotech LLC).

Los análisis filogenéticos se realizaron alineando las secuencias del gen L1 de los tipos nuevos de HPV con las secuencias de HPV disponibles en <http://www.hpvcenter.se/> y <http://pave.niaid.nih.gov/> utilizando el algoritmo ClustalW del programa Mega 6 [171]. Utilizando el programa JModelTest v2 [172] se determinó que el mejor modelo evolutivo de sustitución nucleotídica para los alineamientos era el GTR+I+G. Dicho alineamiento fue utilizado para inferir las relaciones filogenéticas de los virus mediante metodología Bayesiana utilizando el paquete Beast 1.7.5 [173]. Para ello, se realizaron corridas de cadenas Marco-Monte Carlo (MCMC) durante 10^7 generaciones, muestreando cada 1000 generaciones y descartando un 10% de las mismas. La convergencia estadística de las MCMC fue evaluada calculando el número efectivo de muestras utilizando el programa TRACER v1.4 (disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). El árbol más probable entre todos los posibles árboles generados por Beast fue estimado utilizando el programa TreeAnnotator disponible en el paquete Beast.

3.4.3. Análisis de recombinación en tipos de HPV del género Gama PV.

La base de datos utilizada para explorar las relaciones filogenéticas de un nuevo tipo de Gama PV caracterizado en este trabajo, el HPV205, incluyó 71 tipos de referencia del género Gama-PV previamente caracterizados. Entre ellos, 62 tipos estaban oficialmente reconocidos por el Centro de Referencia Internacional de Papilomavirus Humano y sus secuencias se encontraban disponibles en <http://www.hpvcenter.se/>. Por otro lado, los 9 virus restantes correspondían a tipos identificados por metagenómica cuyas secuencias se encontraban disponibles en <http://pave.niaid.nih.gov/>.

Debido al alineamiento ambiguo de las regiones no codificantes y por las grandes distancias evolutivas de las regiones E6-E7 [174], solamente se utilizaron los genes E1, E2, L2 y L1 de todos

los virus incluidos en la base de datos, de acuerdo a lo reportado previamente por otros [19,151,175]. Se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias para cada uno de los genes utilizando el programa CLUSTAL W [176] de acuerdo a sus secuencias de aminoácidos (BLOSUM protein weight matrix) para preservar la homología de los codones.

Los potenciales eventos de recombinación, las secuencias parentales y la localización de los puntos de quiebre fueron realizados en cada uno de los genes por separado y en combinaciones de los mismos a medida que se incrementaba su número, es decir: *i*) E1, *ii*) E2, *iii*) L2, *iv*) L1, *v*) E1-E2, *vi*) E1-E2-L1, *vii*) E1-E2-L2 y *viii*) E1-E2-L2-L1. Los análisis de recombinación se realizaron utilizando el programa RDP 4.1 [177], y los algoritmos incluidos en el: GENECONV [178], BootScan [179] MaxChi [180], CHIMAERA [181], SIScan [182], y 3Seq [183]. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los demás parámetros no fueron modificados y se utilizaron los valores preestablecidos por el programa.

Un evento de recombinación fue considerado como tal cuando fue estadísticamente significativo para al menos 4 programas incluidos en el RDP 4.1 (criterio de inclusión). Para confirmar la presencia de los eventos de recombinación detectados por el programa RDP 4.1, se realizaron análisis de incongruencia de árboles filogenéticos obtenidos con metodología Bayesiana, como descripto previamente (ver Sección 3.4.2).

3.5. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 6.

3.6. Condiciones y medios de cultivo.

3.6.1. Medios de cultivo para células bacterianas.

El medio utilizado para el cultivo y mantenimiento de las cepas bacterianas fue Luria Bertani (LB) [184], cuya composición es: Peptona de caseína 10 g/l; Extracto de levadura 5 g/l; NaCl 5 g/l. Cuando fue necesario se utilizó ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en medio LB a 37°C con agitación, en presencia de ampicilina. En medios sólidos (con el agregado de agar 1,8%) se cultivaron en estufa a 37°C.

3.7. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.

3.7.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La técnica se llevó a cabo según las indicaciones de Sambrook [184]. Se emplearon concentraciones de agarosa variables, entre 1-2%, según el tamaño de las moléculas de ADN que se deseaba separar. Los geles se prepararon en solución tampón TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0). Las

corridas electroforéticas se realizaron en el mismo tampón a una intensidad de corriente de 80-90 mA.

Previo a la siembra, las muestras se mezclaron en una proporción 4:1 con una solución que contenía 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilencianol, 30% de glicerol y agua estéril. Como marcador de peso molecular se empleó la escalera ADN 100 pb o 1 Kb (Productos Bio-Lógicos, Universidad de Quilmes, Argentina). Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles fueron teñidos con solución de Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml) y observados en transiluminador de luz UV (300 nm). Los geles fueron digitalizados utilizando una cámara digital Kodak, modelo EKB 9040.

Tabla 6: Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Genotipo	Referencia u origen
p-GEM-T-Easy Vector	Ori (ColE1) Amp ^r	Promega (EE.UU)
p-TOPO XL	Ori (ColE1) Kana ^r	Invitrogen (EE.UU)
pHPV6	pBr322 conteniendo el genoma entero de HPV6	donado por Dr.Venuti
pHPV10	pUC19 conteniendo el genoma entero de HPV10	donado por Dr.Venuti
pHPV11	pBr322 conteniendo el genoma entero de HPV11	donado por Dr.Venuti
pW12	pBR322 conteniendo el genoma entero de HPV16.	colección laboratorio
pHPV18	pBR322 conteniendo el genoma completo de HPV18	donado por Dr.Venuti
pHPV20	pBR322 conteniendo el genoma entero de HPV20	donado por Dra. de Villiers
pHPV26	p-GEM T-easy conteniendo un fragmento de 450 pb del gen L1 amplificado con los cebadores MY09/11 correspondiente a HPV26	colección laboratorio
pHPV31	p-GEM T-easy conteniendo un fragmento de 450 pb del gen L1 amplificado con los cebadores MY09/11 correspondiente a HPV31.	colección laboratorio
pHPV33	pBr conteniendo el genoma entero de HPV33	donado por Dr.Venuti
pHPV35	pBr322 conteniendo un fragmento de 3750pb de HPV35	donado por Dr.Venuti
pHPV39	p-GEM T-easy conteniendo un fragmento de 450 pb del gen L1 amplificado con los cebadores MY09/11 correspondiente a HPV39	colección laboratorio
pHPV45	pGEM4 conteniendo el genoma entero de HPV45	donado por Dra. de Villiers
pHPV51	pUC13 conteniendo el genoma entero de HPV51	donado por Dra. de Villiers
pHPV52	pUC19 conteniendo el genoma entero de HPV51	donado por Dr. Lancaster
pHPV56	pT713 conteniendo un fragmento de 5100 pb de HPV56	donado por Dr.Venuti
pHPV58	p-GEM T-easy conteniendo un fragmento de 450 pb del gen L1 amplificado con los cebadores MY09/11 correspondiente a HPV58	colección laboratorio
pHPV59	p-GEM T-easy conteniendo un fragmento de 450 pb del gen L1 amplificado con los cebadores MY09/11 correspondiente a HPV59	colección laboratorio
pHPV68	p-GEM T-easy conteniendo un fragmento de 450 pb del gen L1 amplificado con los cebadores MY09/11 correspondiente a HPV68	colección laboratorio

3.7.2. Purificación de productos de PCR y ADN plasmídico.

La purificación de productos de PCR se realizó con los equipos comerciales NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Alemania) y High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Alemania). Para la preparación de ADN plasmídico se utilizaron los siguientes equipos comerciales: NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Alemania) y High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Alemania). En cada caso se siguieron las instrucciones del proveedor. El ADN plasmídico se resuspendió en H₂O destilada estéril y se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.7.3. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Para aislar fragmentos de ADN para su posterior clonado, los productos de PCR o las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa en las condiciones señaladas anteriormente. La zona del gel conteniendo el fragmento de ADN de interés se extrajo por corte con bisturí estéril y el ADN se purificó según el procedimiento planteado en el equipo comercial NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Alemania) y Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EE.UU).

3.7.4. Estimación de la concentración de ADN.

La cuantificación del ADN obtenido a partir de las preparaciones de ADN plasmídico se realizó por medidas espectrofotométricas a 260 nm y se calculó la concentración según el valor leído, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia (Abs.) a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de ADN doble hebra. Para esto se utilizó una dilución adecuada del plásmido.

3.7.5. Clonado.

Se clonaron todos los productos de PCR provenientes de la amplificación con los cebadores CUT o FAP que indicaban tipos múltiples de HPV por presentar cromatogramas con picos solapados en el secuenciamiento directo del amplicón. Además, se clonaron todos los productos de PCR de fragmentos largos (4.000 pb aproximadamente) amplificados con la enzima *Expand Long Range dNTPack* (Roche, Buenos Aires, Argentina).

Cada uno de los productos de PCR fue ligado en el vector pGEM-T-Easy (Promega, EE.UU.). Con el producto de ligación correspondiente se transformaron bacterias *E.coli* DH5α y se seleccionaron colonias blancas en medio LB-Ampicilina conteniendo IPTG y X-Gal.

Por otro lado, una de las mitades genómicas de 2 de los tipos de HPV caracterizados en este trabajo (HPV EP02 y HPV EP03) fueron clonadas utilizando el kit TOPO XL PCR Cloning Kit y se

transformaron bacterias *E.coli* One Shot TOP10 Chemically Competent (Invitrogen, EE.UU.). Las bacterias transformadas químicamente según indicaciones del proveedor se seleccionaron en medio LB-Kanamicina. El clonado de estos dos virus fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular y diagnóstico de Hepatitis y HIV/AIDS (HIV) del Instituto de Biología e Inmunología de la Universidad de Liubliana (Eslovenia).

3.7.5.1. Ligación de moléculas de ADN.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en tampón 2X para la ADN ligasa, 1 U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 y el vector pGEM®-T-Easy (Promega, EE.UU.). Se utilizó una relación molar de ADN inserto:vector de 10:1, en un volumen final de 10 µl. La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 14-16 hs.

Las reacciones de ligación en las que se utilizó el vector TOPO XL (Invitrogen, EE.UU.), se realizaron en un volumen final de 6 µl usando 4 µl del producto de PCR purificado (inserto), 1 µl del vector y luego de incubar durante 30 min a temperatura ambiente, se agregó 1 µl de solución 6X de inhibición de la reacción.

3.7.5.2. Transformación de células *E. coli* por electroporación.

-Inducción del estado de competencia.

Las células a transformar (bacterias *E.coli* DH5α) fueron crecidas en medio LB con agitación permanente a 37°C hasta fase estacionaria. Se inocularon 500 ml de medio LB fresco con 5 ml del cultivo saturado y se creció a la misma temperatura hasta $DO_{630} = 0,5-1$. Dicho cultivo se enfrió en hielo durante 20 min y se centrifugó a 4°C durante 10 min a 6.500 rpm en la centrífuga Avanti J-25 (Beckman Coulter, EE.UU.). El sedimento celular obtenido se lavó 3 veces con 1 volumen de H₂O destilada estéril fría y 1 vez con 10 ml de glicerol 10% (v/v). Finalmente, el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de glicerol 10% (v/v) y se realizaron alícuotas en tubos estériles que fueron guardados a -70°C hasta el momento de su uso.

- Transformación de células competentes con ADN plasmídico.

Trabajando a 0°C, alícuotas de 40 µl de células competentes, obtenidas como se detalló anteriormente, se colocaron en un celda de electroporación, se agregaron 1-5 µl del plásmido y se electroporaron utilizando un voltaje de 2.3 kV (BioRAD *E. coli* pulser, EE.UU.). Luego se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó 1 h a 37°C con agitación constante. Por último, las células se centrifugaron 5 min a 6.000 rpm y se sembraron 100 µl con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con ampicilina o kanamicina, según

corresponda, en concentración adecuada para seleccionar las bacterias transformadas. Las células se incubaron a 37°C durante una noche.

3.7.5.3. Transformación química de células *E. coli* TOP10 (Invitrogen, EE.UU).

Se agregaron 2 µl de la reacción de ligación con el vector TOPO XL (Invitrogen, EE.UU) en un tubo de células *E. coli* TOP10, y se mezcló vigorosamente. Luego de 30 min en hielo se realizó un shock térmico a 42°C por 30 seg e inmediatamente se transfirieron los tubos a hielo por 2 min. Luego se agregó 250 µl de medio S.O.C (Invitrogen, EE.UU) sin antibiótico y se incubó 1 h a 37°C con agitación constante. Se sembraron 50–150 µl con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con kanamicina en concentración adecuada para seleccionar las bacterias transformadas. Las células se incubaron a 37°C durante una noche.

3.8. Análisis Estadístico

En el análisis de muestras cervicales para investigar la distribución de HPV mucosotrópicos, se analizó la asociación entre la presencia de infección por HPV y características demográficas-culturales: edad y número de partos aplicando el test de Scores, tabaquismo y contacto con mucosa aplicando el test basado en la variable Chi-cuadrado, por último método anticonceptivo más usado, infecciones de transmisión sexual, infección por HIV-1 y enfermedad cervical (determinada por el resultado del Pap) aplicando el test de Fisher. La conducta sexual fue analizada mediante la variable edad de inicio de relaciones sexuales que fue analizada aplicando el test basado en la variable Chi-Cuadrado.

En el estudio de muestras cutáneas, las prevalencias obtenidas en cada estación climática fueron comparadas a través de la estadística Q de Cochran. El análisis del grado de asociación según el estado de infección por HPV cutáneos se realizó comparando variables demográficas (edad y género) y de comportamiento (horas de exposición a UV/semana y uso de protector solar). La edad se analizó aplicando los test de Mann Whitney y Kruskal-Wallis mientras que el género aplicando el test basado en la variable Chi-cuadrado. La variable horas de exposición al sol/semana se analizó aplicando los test de Mann Whitney y Kruskal-Wallis mientras que el uso de protector solar aplicando el test de Correlaciones exacto y el test de Scores.

La asociación del resultado general con las variables fue estudiada además mediante una regresión logística multivariada y una regresión logística multivariada con respuesta politémica ordinal (modelo de odds proporcionales).

En todos los análisis, un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4. Resultados

Capítulo I

**Epidemiología de la infección
por HPV en cérvix de mujeres
con diagnóstico de patología
cervical**

4.I. Consideraciones generales.

Conocer y caracterizar los HPV presentes en las infecciones persistentes de cérvix previamente a la vacunación masiva es una información relevante para poder evaluar a futuro el eventual reemplazo de tipos post-vacunación. Para ello es necesario disponer de herramientas moleculares que aseguren el diagnóstico de la infección y el tipo involucrado de manera certera y precisa.

A continuación se describen las pruebas realizadas para mejorar la competencia del ensayo L1HPVPCR en el análisis y la tipificación de HPV mucosotrópicos (sección 4.I.1), y su aplicación, junto al sistema de cebadores CUT, para conocer la epidemiología de la infección por HPV en cérvix en un grupo de mujeres no vacunadas con diagnóstico y/o antecedentes de patología cervical del sur de la provincia de Santa Fe (sección 4.I.2).

4.I.1. Análisis de la competencia del sistema L1HPVPCR para detectar 15 tipos de HPV mucosotrópicos.

El sistema L1HPVPCR versión 16.4 (Figura 12, Sección 3.3.1.1) en muestras clínicas ha permitido identificar un amplio rango de genotipos de HPV en mucosa cervical en estudios de prevalencia de mujeres sin lesiones cervicales que asistieron a diferentes hospitales públicos de la provincia de Santa Fe y C.A.B.A. por control ginecológico de rutina [99].

Para controlar la calidad de los resultados arrojados por el sistema L1HPVPCR, nuestro laboratorio viene participando como laboratorio externo en los estudios de competencia organizados por la *HPV Labnet (Proficiency Studies of HPV DNA Typing; años 2008, 2010, 2011, 2013, 2014)* de la OMS. Uno de los objetivos de este programa es determinar la competencia y la sensibilidad de los métodos de genotipificación de HPV utilizados en distintos laboratorios del mundo para avanzar en la vigilancia de los programas de vacunación para HPV a través de la estandarización de los laboratorios y del control de calidad de los métodos de detección de HPV (<http://www.who.int/biologicals/vaccines/hpv/en/index.html>). Para alcanzar ese objetivo, los laboratorios participantes en los estudios de competencia reciben un panel de 43 muestras incógnitas que contienen plásmidos purificados de 16 tipos mucosotrópicos de HPV (2 tipos BR: HPV6, HPV11; 14 tipos AR: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV59, HPV56, HPV58, HPV66, HPV68a y HPV68b) diluidos en 1 ng/ μ l de ADN de placenta humana y 3 muestras como controles de extracción de ADN. La *HPV Labnet* estableció que un método es competente o apto para la genotipificación de HPV si es capaz de detectar 50 Unidades Internacionales (UI) de los tipos HPV16 y HPV18 en infecciones simples y múltiples, y 500 equivalentes de genoma (GE) de los demás 14 tipos.

Luego de analizar los resultados obtenidos para todos los genotipos de HPV incluidos en el panel del estudio correspondiente al año 2011 (*2011 Proficiency Study of HPV DNA Typing*), observamos que la especificidad y sensibilidad del sistema L1HPVPCR versión 16.4 para amplificar y detectar los tipos HPV18 y HPV45 en bajo número de copias eran sub-óptimas. Si bien los cebadores utilizados en el ensayo L1HPVPCR contienen bases degeneradas que amplificarían los dos tipos de forma eficiente, los resultados obtenidos demostraron lo contrario. Teniendo en cuenta que HPV18 y HPV45 son tipos AR altamente prevalentes en carcinomas cervicales, al igual que el HPV16, nos propusimos mejorar el desempeño del sistema L1HPVPCR versión 16.4 para la identificación de ambos tipos.

4.I.1.1 Mejora en el desempeño del sistema L1HPVPCR para la identificación de los tipos HPV18 y HPV45.

En primer lugar nos diseñamos cebadores específicos para los tipos HPV18 y HPV45 con el objetivo de combinarlos con los cebadores MY11/09: 3 cebadores para los tipos HPV18 y HPV45: 2 cebadores sentido específicos para HPV18 (MY18Fw) o HPV45 (MY45Fw), y un cebador anti-sentido genérico para ambos tipos (MY1845Rv) (Tabla 4).

Los nuevos cebadores diseñados se sumaron a los existentes en el ensayo L1HPVPCR versión 16.4, modificación que, en esta tesis, dio lugar al ensayo denominado L1HPVPCR versión 16.4.1 para facilitar el análisis. A continuación se describen la optimización de las nuevas condiciones de amplificación.

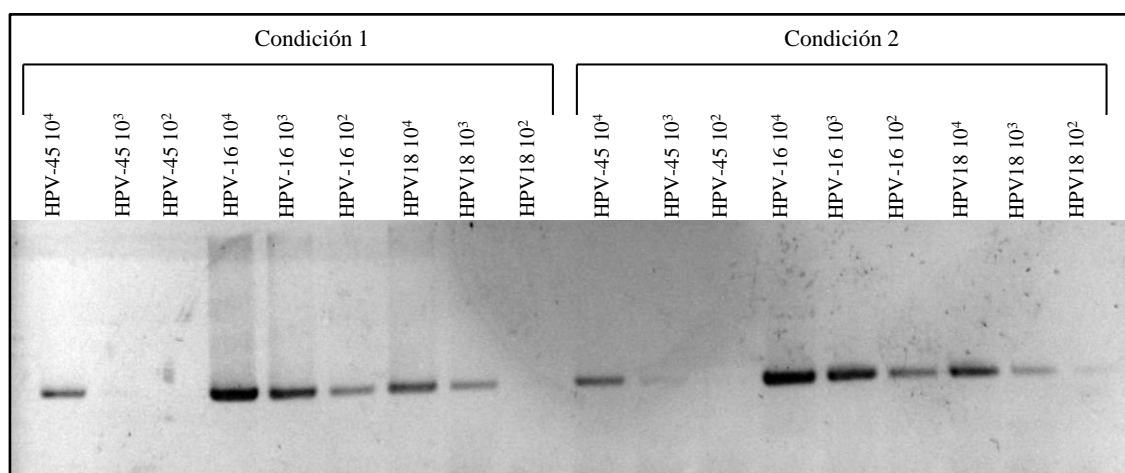
4.I.1.2. Sistema L1HPVPCR versión 16.4.1: Optimización de las condiciones de amplificación y detección con los nuevos cebadores específicos para HPV18 y HPV45.

Con el objetivo de lograr una adecuada optimización de la reacción de amplificación se tomaron como referencia las condiciones previamente utilizadas en el ensayo L1HPVPCR con los cebadores genéricos MY11/MY09/GC09, como descrito previamente [168]. Sucesivamente, se fueron realizando variaciones graduales en las concentraciones de todos los cebadores en forma paulatina.

Como controles positivos se utilizaron diluciones seriadas de plásmidos conteniendo el genoma completo de los tipos HPV16, HPV18 y HPV45 (10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 copias/reacción) disponibles en el laboratorio (Tabla 5). La selección de condiciones se realizó en base a la intensidad de las bandas obtenidas luego de electroforesis en geles de agarosa. Sin embargo, en todas las pruebas se tuvo en cuenta que las mejoras en las amplificaciones de HPV18 y HPV45 no fueran en detrimento de la amplificación de HPV16, el tipo más frecuentemente encontrado en carcinomas cervicales.

Luego de numerosos experimentos ensayando distintas concentraciones para la mezcla de cebadores se lograron 2 condiciones que permitían la amplificación de los 3 tipos analizados. En la Figura 15 se resumen los resultados obtenidos con 2 mezclas de cebadores que arrojaron las bandas más intensas y la mayor sensibilidad en la amplificación de cada tipo en estudio. Como puede observarse, la mezcla de cebadores de la condición 2 permitió obtener productos amplificados visibles en gel de agarosa a partir de 1.000 copias/reacción para el HPV45 y de 100 copias/reacción para los tipos HPV16 y HPV18 por lo que fue la condición seleccionada (Figura 15, condición 2).

Figura 15: L1HPVPCR versión 16.4.1: Optimización de la concentración de la mezcla de cebadores



Una vez establecida la composición de la mezcla de cebadores para asegurar la amplificación de HPV18 y HPV45, era necesario verificar si la incorporación de los nuevos cebadores mejoraba el desempeño del ensayo para los requerimientos de competencia establecidos por el *HPV Labnet*. En base a esto, se procedió a evaluar la sensibilidad del ensayo L1HPVPCR 16.4.1 para detectar los tipos en estudio en bajo número de copias en comparación al ensayo original (L1HPVPCR 16.4). Para ello se amplificaron en forma independiente distintas cantidades de los plásmidos conteniendo los genomas de HPV16, HPV18 y HPV45 derivados del panel *HPV Labnet* (año 2011) en las condiciones de cada versión del ensayo L1HPVPCR y los productos amplificados correspondientes se detectaron mediante revelado colorimétrico en formato EIA con sondas específicas, como descrito [99]. Los valores de corte se calcularon como 4 veces el promedio de los valores de absorbancia obtenidos en los CN con la sonda específica correspondiente, como definido previamente [168]. Por lo tanto, una muestra se consideró positiva para un dado tipo de HPV si su valor de absorbancia era mayor que este valor de corte. En la Tabla 7 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras y los controles correspondientes.

Tabla 7: Análisis de la sensibilidad del sistema L1HPVPCR: versión 16.4 Vs. 16.4.1

Muestras Analizadas *	Sonda Específica	L1HPVPCR (Absorbancias)**	
		16.4	16.4.1
CR	HPV16	0,054	0,057
CN		0,06	0,123
valor de corte		0,24	0,492
HPV16 (50 UI)		0,622	1,002
HPV16 (500 UI)		0,501	0,770
CR	HPV18	0,071	0,082
CN		0,092	0,088
valor de corte		0,368	0,352
HPV18 (50 UI)		0,101	0,126
HPV18 (500 UI)		0,099	0,420
CR	HPV45	0,078	0,102
CN		0,101	0,056
valor de corte		0,404	0,224
HPV45 (50 GE)		0,094	0,169
HPV45 (500 GE)		0,107	0,736

* Las concentraciones indicadas se refieren a UI/reacción o GE/reacción.

** Los resultados positivos de acuerdo al valor de corte se muestran en negrita.

Los resultados obtenidos en las dos versiones del ensayo L1HPVPCR para detección de HPV16 (Tabla 7) indican que la incorporación de los cebadores específicos para HPV18 y HPV45 en la versión 16.4.1 no afectó la sensibilidad en su detección, ya que 50 y 500 UI/reacción de HPV16 fueron positivas en ambas condiciones. En contraste, la detección de HPV18 y HPV45 solo fue posible en la versión 16.4.1, confirmando que las modificaciones realizadas mejoraron el desempeño del ensayo L1HPVPCR para identificar estos genotipos. No obstante, el límite de detección obtenido para HPV18 y HPV45 fue de 500 UI o GE/reacción. El hecho de que el sistema no fue capaz de detectar 50 UI/reacción del HPV18 podría deberse a la caída del título del plásmido en el tiempo, ya que como dijimos, las muestras provenían del panel de 2011. Teniendo en cuenta esto, decidimos evaluar el desempeño del L1HPVPCR versión 16.4.1 en los sucesivos estudios de competencia realizados por la *HPV Labnet*.

Como mencionado al inicio de la Sección, un método es considerado competente en tipificación para HPV si es capaz de detectar 50 IU/5 µl de los tipos HPV16 y HPV18 y 500 GE/5 µl de los otros tipos incluidos en los paneles, tanto en muestras que mimetizan infecciones únicas o múltiples. Además la especificidad de los tipos reportados debe ser mayor a 97% (no más de un falso positivo). Los resultados de los análisis de los paneles correspondientes a los estudios de los años 2013 y 2014 realizados en nuestro laboratorio demostraron que el sistema L1HPVPCR 16.4.1 es competente para la detección de los tipos HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66, y 68b. En el Anexo II se adjuntan los resultados obtenidos y la certificación oficial de la competencia del sistema L1HPVPCR16.4.1 por la *WHO HPV LabNet*.

4.I.2. Análisis de la prevalencia y persistencia de la infección de HPV en cérvix de mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical de la provincia de Santa Fe.

Habiendo determinado la competencia del L1HPVPCR versión 16.4.1 para la tipificación específica y sensible de 15 tipos mucosotrópicos nos propusimos conocer la epidemiología de HPV en cérvix en un grupo de mujeres no vacunadas contra HPV y con diagnóstico de patología cervical de nuestra región. Como antes mencionado, esta información es fundamental para determinar a futuro el eventual reemplazo de tipos como consecuencia de la aplicación masiva de las vacunas preventivas contra la infección por HPV. Teniendo en cuenta esto, y a fin de conocer exhaustivamente la epidemiología de HPV, el diagnóstico de la infección y la tipificación viral se realizó en forma combinada con los resultados arrojados por el ensayo L1HPVPCR versión 16.4.1 y por el sistema CUT (ver Sección 3.3.1.2), herramienta con demostrada capacidad de amplificar HPV musosotrópicos [138]. A continuación se detallan las actividades llevadas adelante para determinar la prevalencia y persistencia de HPV en este grupo de mujeres.

4.I.2.1 Descripción de la población y diseño experimental

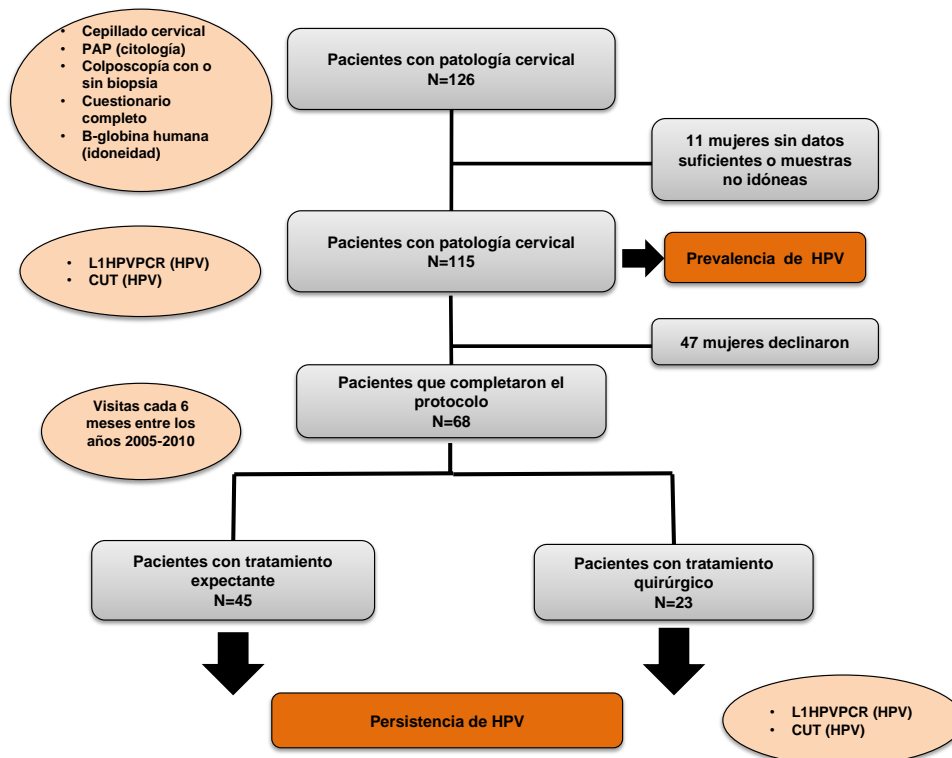
El protocolo de reclutamiento de las mujeres y los procedimientos efectuados están detallados en las Secciones 3.1.1 y 3.1.3. Todas las mujeres que participaron en el estudio dieron su consentimiento escrito e informado (Anexo I) y completaron un cuestionario sobre información demográfica, conducta sexual y co-factores relacionados con la infección por HPV (Anexo I). En cada una de las visitas las mujeres recibieron un exámen ginecológico completo, que incluía toma de muestra para el análisis citológico (Pap) y para el análisis de la presencia de ADN de HPV, colposcopia y toma de biopsia (en caso de ser necesarias).

El protocolo de reclutamiento y de seguimiento se detalla en la Figura 16. Brevemente, se reclutaron 126 mujeres no vacunadas contra HPV (edad media: 28 años, rango etario: 14-53 años) que concurrieron al HEEP entre los años 2005-2010 por presentar Pap alterados o lesiones cervicales previas. Once mujeres fueron excluidas del estudio debido a que la muestra de ingreso al protocolo fue inadecuada para el análisis de HPV (negativa para la amplificación de β -globina) o porque la información provista en el cuestionario era incompleta. Por lo tanto, el grupo para el estudio de **prevalencia** estuvo constituido por 115 mujeres en total (Figura 16).

Luego de la primera visita, 68 mujeres (edad media: 29 años, rango etario: 14-50 años) aceptaron participar en un estudio de longitudinal durante un período promedio de 24 meses (rango: 6-52 meses) a fin de analizar la **persistencia** de la infección por HPV. De acuerdo con el protocolo de atención de los pacientes del Servicio de Ginecología del HEEP, tanto las mujeres con Pap alterados como las mujeres HIV positivas son citadas cada 6 meses hasta que el ginecólogo decida extender

este tiempo. Sin embargo, las visitas ginecológicas no fueron regulares en el lapso de tiempo estipulado para el estudio. De esta manera, el 34% (23/68) de las pacientes realizaron 2 visitas, el 26% (18/68) concurren 3 veces al control de rutina, el 21% (14/68) realizaron 4 visitas, el 8% (7/68) concurren 5 veces, mientras que solo el 6% (4/68) y el 3% (2/68) de las mujeres realizaron 6 y 7 visitas respectivamente. Por lo tanto, se recolectaron y analizaron en total 229 muestras secuenciales de cepillado cervical de 68 mujeres: 23 mujeres (edad media: 31 años; rango etario: 19-50 años) recibieron tratamiento quirúrgico (remoción de la lesión) y 45 mujeres (edad media: 27 años; rango etario: 14-49 años) recibieron tratamiento expectante (observación de la evolución de la lesión) (Figura 16).

Figura 16: Diseño experimental para el análisis de prevalencia y persistencia de HPV en mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical



4. I.2.2. Prevalencia de la infección por HPV y distribución de tipos en mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical

4. I.2.2.1. Análisis de los resultados obtenidos con el sistema de cebadores CUT y el ensayo L1HPVPCR versión 16.4.1

Con el objetivo de conocer la epidemiología de HPV en este grupo de mujeres, la presencia de HPV y los tipos involucrados en la infección se determinó en las 115 mujeres con los sistemas

L1HPVPCR versión 16.4.1 y CUT (ver Figura 16). Los resultados de dicho análisis (Tabla 8) muestran que un 85% (98/115) de las mujeres estaban infectadas con HPV.

El 43% (50/115) de las pacientes resultó positiva con ambos sistemas mientras que el 15% (17/115) fue HPV-negativa. Por lo tanto, la concordancia general entre ambas estrategias de tamizaje fue de 58% (67/115) (Tabla 8).

El 25% (29/115) fue HPV-positiva sólo con el sistema L1HPVPCR mientras que el 16% (19/115) sólo con el sistema CUT. El sistema de amplificación L1HPVPCR logró identificar la presencia de HPV con mayor frecuencia que el sistema CUT (69% vs 60%).

Tabla 8: Presencia de HPV en cérvix de 115 mujeres con diagnóstico de patología cervical determinada con los sistemas L1HPVPCR 16.4.1 y CUT.

	L1HPVPCR+	L1HPVPCR-	Total
CUT+	50	19	69
CUT-	29	17	46
Total	79	36	115

La capacidad de cada estrategia de tamizaje para detectar tipos de HPV de diferentes especies se resume en la Tabla 9. En total ambos ensayos detectaron 175 secuencias virales correspondientes a 33 tipos de HPV. Entre ellos, la gran mayoría de los tipos encontrados pertenecían al género Alfa PV, con 17 tipos AR (especies 5, 6, 7 y 9) y 15 tipos BR (especies 2, 3, 8 y 10). Además, se detectó un tipo putativo del género Gama PV.

Los tipos más prevalentes en esta población identificados con ambos sistemas fueron HPV16 (43/175; 25%) y HPV31 (22/175; 13%). Con el sistema CUT se identificó una mayor variedad de especies ya que la estrategia de tipificación se basa en el secuenciamiento de los productos amplificados. En efecto fue posible identificar tipos mucosos de especies no incluidas en el ensayo L1HPVPCR y un tipo potencial de HPV: el GC12_03 de la especie Gama 10. Estos resultados demuestran que el uso de 2 métodos de tamizaje con diferentes especificidades es la mejor estrategia para conocer la epidemiología de HPV en cérvix.

Tabla 9: Tipos de HPV identificados con los sistemas L1HPVPCR y CUT en cérvix de mujeres con diagnóstico de patología cervical

	Tipos*	Especies HPV	L1HPVPCR 16.4.1	CUT	Ambos**	Total
Alto Riesgo	HPV26	Alfa 5	2	1	1	2
	HPV51		2	3	0	5
	HPV30	Alfa 6	0	3	0	3
	HPV53		0	2	0	2
	HPV56		7	1	1	7
	HPV66		0	4	0	4
	HPV18	Alfa 7	8	1	1	8
	HPV39		1	0	0	1
	HPV45		3	1	0	4
	HPV59		0	4	0	4
	HPV68		1	0	0	1
	HPV16	Alfa 9	37	22	16	43
	HPV31		22	3	3	22
	HPV33		12	3	2	13
	HPV35		4	1	1	4
	HPV52		3	4	1	6
HPV58	5		3	1	7	
Bajo riesgo	HPV10	Alfa 2	0	1	0	1
	HPV78		0	1	0	1
	HPV61	Alfa 3	0	1	0	1
	HPV62		0	0	0	0
	HPV81		0	1	0	1
	HPV83		0	1	0	1
	HPV86		0	1	0	1
	HPV87		0	3	0	3
	HPV89		0	3	0	3
	HPV43	Alfa 8	0	6	0	6
	HPV91		0	1	0	1
	HPV6	Alfa 10	7	7	4	10
	HPV11		5	1	1	5
	HPV13		0	2	0	2
	HPV74		0	2	0	2
Otro	GC12_03	Gama 10	0	1	0	1
Total	33	10	119	88	29	175

* Tipos de HPV detectados por el ensayo L1HPVPCR se muestran en negrita.

** El mismo tipo de HPV fue encontrado en la misma muestra por ambos ensayos.

4.I.2.2.2. Análisis de los indicadores de la población en estudio en relación a la infección por HPV.

Sucesivamente se exploró la prevalencia de HPV en esta población utilizando las dos estrategias de detección de HPV (L1HPVPCR16.4.1 y CUT) de manera conjunta. Por lo tanto todos los resultados mostrados a continuación, tanto de prevalencia general de HPV como de tipos específicos, corresponden a los encontrados con ambos sistemas. En la Tabla 10 se resumen los indicadores

demográficos, de conducta sexual, clínicos y los co-factores relacionados con el desarrollo de cáncer cervical, respecto a la infección de HPV.

Como se mencionó anteriormente (Tabla 8), la mayoría de las mujeres incluídas en la población en estudio (85%) estaban infectadas con HPV. La mayor frecuencia de infección por HPV se encontró en las mujeres de 14-19 años (91,7%) y de 20-24 años (92,3%), y la menor fue en la categoría de 40-53 años (72,2%). De hecho, la frecuencia de infección disminuyó a medida que las categorías etarias iban aumentando, siendo estas diferencias, estadísticamente significativas ($p = 0,034$).

En relación a los indicadores de conducta sexual (Tabla 10), la edad de inicio de relaciones sexuales no estuvo asociada a la infección por HPV ($p=0,869$), encontrándose una prevalencia de infección por HPV similar en ambas categorías etarias.

Curiosamente, la mayor prevalencia de HPV se encontró en las mujeres que manifestaron usar métodos de barrera (preservativo) como el método anticonceptivo más usado (91,3%). Estas frecuencias no resultaron ser estadísticamente significativas respecto las demás categorías de métodos anticonceptivos analizados ($p=0,716$). Más aún, las mujeres que declararon tener sexo con contacto de mucosas más allá del método anticonceptivo utilizado tuvieron menor frecuencia de infección que aquellas que declararon usar preservativo (83,7% vs 91,3%), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,358$).

En relación a los co-factores analizados, se observó una proporción similar de infección por HPV tanto en mujeres que reportaron antecedentes de ITS como en las que no la hicieron (83,3% y 85,6%, $p=0,729$). Esta misma tendencia se observó cuando se compararon las frecuencias de infección por HPV en las mujeres que estaban o no infectadas con HIV-1 (85,7% y 86,1%, $p=0,966$). Otro de los co-factores analizados fue el hábito de fumar, determinándose que las mujeres fumadoras tuvieron una mayor frecuencia de infección por HPV que las que declararon no fumar (87% vs 83,6%), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,605$).

El número de partos fue otra de las variables incluídas en el estudio. Interesantemente, las mujeres que no tuvieron ningún parto fueron las que presentaron mayor frecuencia de infección (92,7%) mientras que las que tuvieron de 3 a 4 partos fueron las de menor prevalencia (76,2%). Estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas ($p=0,096$).

Tabla 10: Prevalencia de HPV según características demográficas, de conducta sexual y co-factores.

	Tamaño muestra	Prevalencia % [IC 95%]	p
Total (14-53 años)	115	85 [77,5-90,7]	
Edad, años			
14-19	24	91,7 [73,0-98,0]	0,034
20-24	26	92,3 [75,1-100]	
25-29	24	87,5 [68,2-96,5]	
30-39	23	78,3 [57,7-90,8]	
40-53	18	72,2 [48,8-87,9]	
Edad Inicio de rel. Sexuales, años			
<16	63	85,7 [75,0-92,5]	0,869
≥16	52	84,6 [72,2-92,3]	
N° de Partos			
NINGUNO	41	92,7 [79,9-98,2]	0,096
1 a 2	43	83,7 [69,7-92,2]	
3 a 4	21	76,2 [54,5-89,8]	
≥5	10	80,0 [47,9-95,4]	
MAC más usado			
NINGUNO	10	90,0 [57,4-100]	0,716
BARRERA	23	91,3 [72,0-99,0]	
HORMONAL	67	83,6 [72,3-90,1]	
OTROS	15	80,0 [54,1-93,8]	
Sexo con Contacto de mucosas			
NO ¹	23	91,3 [72,0-98,7]	0,358
SI	92	83,7 [74,8-90,0]	
Tabaco			
NO	61	83,6 [72,3-91,0]	0,605
SI	54	87,0 [75,3-93,9]	
Infección por HIV-1			
NO	101	86,1 [77,9-91,7]	0,966
SI	14	85,7 [58,8-97,4]	
Antecedentes de ITS			
NO	97	85,6 [77,1-91,3]	0,729
SI	18	83,3 [60,0-95,0]	
Citología			
NEGATIVO	11	63,6 [35,2-85,0]	0,047
ASCUS	19	73,7 [50,9-88,6]	
L-SIL	53	90,6 [79,3-96,3]	
H-SIL	32	90,6 [75,0-97,5]	

MAC: Método Anticonceptivo; OTROS MAC: Coito Interruptus, Dispositivo intrauterino; ITS: infecciones de transmisión sexual

¹ Se incluyeron sólo mujeres que utilizaron preservativos como método anticonceptivo.

Respecto a las variables clínicas, la única que se exploró fue la citología. En general, la prevalencia de HPV aumentó con el incremento de la severidad de la lesión. La mayor frecuencia de infección por HPV se observó en las mujeres con diagnóstico H-SIL y L-SIL, donde prácticamente todas las mujeres estaban infectadas (90,6% en ambas categorías citológicas), y la menor frecuencia de infección se observó en mujeres con citología normal (63,6%). Los análisis estadísticos determinaron que estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,047$).

4.I.2.2.3. Distribución general de genotipos de HPV y de acuerdo a la citología/histología.

La distribución de genotipos de HPV de acuerdo a la citología y a la histología de este grupo de mujeres se muestra en la Tabla 11. En general, los tipos AR predominaron en todas las categorías cito-histológicas, y teniendo en cuenta de que esta población de mujeres tenía o tuvo diagnóstico de patología cervical, este resultado fue el esperado. Por otro lado, los tipos BR se encontraron en todas las categorías cito-histológicas, siendo más frecuentes en las mujeres con citología L-SIL.

Las mujeres con citología negativa (Pap negativo) presentaron mayormente tipos AR. Esto podría explicarse debido a que estas pacientes tuvieron antecedentes de patología cervical. Sin embargo, otros estudios también reportaron altas tasas de infección con tipos AR en mujeres con citología normal con o sin antecedentes de patología cervical [99,185].

En cuanto a las mujeres con citología ASC-US, se identificaron mayormente tipos AR, en su mayoría de los más carcinogénicos. Es necesario considerar que la categoría citológica ASC-US incluye anomalías en las células escamosas de significado indeterminado que pueden deberse a una amplia variedad de causas. En esta población, el GC12_03 fue identificado en esta categoría citológica; sin embargo las implicancias clínicas de la infección con este tipo potencial del género Gama-PV deben ser definidas. Los demás tipos fueron similares a los detectados en mujeres con citología normal.

En cuanto a los tipos de HPV identificados en cada una de las categorías cito-histológicas pudimos determinar que el HPV16 fue el más prevalente en todas ellas. De hecho, y siguiendo la línea de los resultados hasta aquí expuestos, este tipo se identificó en el 50% de las mujeres con citología H-SIL y en el 27,3% de las mujeres con citología normal. El segundo tipo más prevalente fue el HPV31 en las categorías ASC-US (21,2%), L-SIL (22,6%) y H-SIL (15,6%), mientras que el HPV33 fue el tipo más frecuente en la categoría Negativo (27,3%).

En relación a los tipos BR, la frecuencia fue más baja en esta población en estudio (28,7%) respecto a los AR (77,4%), siendo el HPV6 el tipo más prevalente (7,8%) y en particular, en las mujeres con citología ASC-US (10,5%), L-SIL (9,4%) y H-SIL (6,3%). El segundo en frecuencia fue el HPV43 (5,2%), en particular en las mujeres con citología L-SIL (7,5%). En las mujeres con citología negativa la prevalencia de infección con tipos BR fue baja (18,2%), siendo HPV61 y HPV89 los únicos dos tipos identificados en esta categoría citológica.

Tabla 11: Distribución de genotipos de HPV en 115 mujeres con patología cervical respecto a la citología/histología

	Todas, n (%)	Negativo, n (%)	ASC-US, n (%)	L-SIL, n (%)	H-SIL, n (%)
N° Mujeres	115 (100)	11 (9,6)	19 (16,5)	53 (46,1)	32 (27,8)
HPV+	98 (85,2)	7 (63,6)	14 (73,7)	48 (90,6)	29 (90,6)
HPV+ AR	89 (77,4)	7 (63,6)	13 (68,4)	42 (79,2)	27 (84,4)
HPV+ BR	33 (28,7)	2 (18,2)	5 (26,3)	18 (34,0)	8 (25,0)
Tipos Vacunales*	55 (47,8)	3 (27,3)	8 (42,1)	27 (50,9)	17 (53,1)
Tipos más carcinogénicos**	70 (60,9)	7 (63,6)	11 (57,9)	31 (58,5)	21 (65,6)
Infecciones múltiples	45 (39,1)	3 (27,3)	8 (42,1)	23 (43,4)	11 (34,4)
Tipos AR					
HPV16	43 (37,4)	3 (27,3)	6 (31,6)	18 (34,0)	16 (50,0)
HPV18	8 (7)	0 (0,0)	1 (5,3)	5 (9,4)	2 (6,3)
HPV26	2 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (3,1)
HPV30	3 (2,6)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	2 (6,3)
HPV31	22 (19,1)	1 (9,1)	4 (21,2)	12 (22,6)	5 (15,6)
HPV33	13 (11,3)	3 (27,3)	2 (10,5)	6 (11,3)	2 (6,3)
HPV35	4 (3,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,8)	2 (6,3)
HPV39	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	0 (0,0)
HPV45	4 (3,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,7)	1 (3,1)
HPV51	5 (4,3)	0 (0,0)	1 (5,3)	3 (5,7)	1 (3,1)
HPV52	6 (5,2)	1 (9,1)	3 (15,8)	0 (0,0)	2 (6,3)
HPV53	2 (1,7)	0 (0,0)	1 (5,3)	1 (1,9)	0 (0,0)
HPV56	7 (6,1)	0 (0,0)	1 (5,3)	3 (5,7)	3 (9,4)
HPV58	6 (5,2)	0 (0,0)	1 (5,3)	3 (5,7)	2 (6,3)
HPV59	4 (3,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,7)	1 (3,1)
HPV66	4 (3,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (7,5)	0 (0,0)
HPV68	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	0 (0,0)
Tipos BR					
HPV6	9 (7,8)	0 (0,0)	2 (10,5)	5 (9,4)	2 (6,3)
HPV11	5 (4,3)	0 (0,0)	1 (5,3)	3 (5,7)	1 (3,1)
HPV43	6 (5,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (7,5)	2 (6,3)
HPV61	1 (0,9)	1 (9,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
HPV62	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	0 (0,0)
HPV74	2 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (3,1)
HPV78	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
HPV81	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	0 (0,0)
HPV83	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	0 (0,0)
HPV86	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	0 (0,0)
HPV87	3 (2,6)	0 (0,0)	1 (5,3)	1 (1,9)	1 (3,1)
HPV89	3 (2,6)	1 (9,1)	1 (5,3)	1 (1,9)	0 (0,0)
HPV91	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,1)
Gama PV	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)

* Tipos incluidos en la vacuna tetravalente: HPV6, HPV11, HPV16, HPV18.

** Tipos más carcinogénicos: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45. Son los 5 tipos más frecuentemente encontrados en biopsias de cáncer cervical a nivel mundial [63].

Las infecciones múltiples se identificaron más frecuentemente en las categorías ASC-US (42,1%) y L-SIL (43,4%) y con menor frecuencia en mujeres con citología normal (27,3%) o H-SIL (34,4%).

En general pudimos determinar que la población en estudio presentó una mayor infección con tipos de AR oncogénico (77,4%), sobre todo con los 5 tipos de HPV de mayor riesgo oncogénico

(HPV16, 18, 31, 33 y 45). Esto pone de manifiesto la necesidad y la importancia de investigar la prevalencia pre-vacunal tipo-específica en mujeres con diagnóstico de patología cervical para evaluar qué vacunas serían más efectivas en cada región para la prevención de estas patologías. En ese sentido, los resultados de esta sección sientan las bases para la vigilancia epidemiológica de HPV post-vacunación en mujeres del sur de la provincia de Santa Fe a fin de determinar un eventual “reemplazo de tipos” en el futuro.

4.I.2.3. Análisis de la evolución virológica y clínica en mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical.

La aplicación masiva de la vacuna busca que disminuyan o idealmente se eliminen en el futuro las cepas más prevalentes en carcinomas de cuello de útero incluidas en la formulación vacunal (HPV16 y HPV18), y algunos tipos relacionados filogenéticamente (HPV31, HPV33, HPV45 y HPV51) [186]. Si bien actualmente no hay indicios suficientes sobre el reemplazo de tipos, el consenso internacional recomienda la realización de estudios en poblaciones no vacunadas y vacunadas para observar la historia natural de las infecciones por HPV a fin de poder evaluar la factibilidad de estos fenómenos [93]. En base a esto se realizó un estudio longitudinal de tipo descriptivo en las mujeres con diagnóstico de patología cervical que dieron su consentimiento para ser estudiadas durante el seguimiento, como mencionado en la sección 4.I.2.1 y de acuerdo al esquema experimental esquematizado en la Figura 16.

De acuerdo al protocolo de asistencia aplicado por el servicio de Ginecología del HEEP, a las pacientes se les administran dos esquemas de tratamiento en base al diagnóstico cito-histológico de la muestra de ingreso al protocolo:

i) A las mujeres con lesiones de bajo grado (L-SIL/CIN I) se les administra el denominado “tratamiento expectante” que consiste en el seguimiento cada 6 meses durante un periodo de 2 años. Durante el seguimiento se evalúa la evolución de las lesiones mediante colposcopia, citología y eventualmente histología. Si luego de 2 años con seguimiento semestral se observa regresión citológica (Pap negativo), o se obtienen al menos 3 citologías negativas en un período mayor, se las considera de alta en cuanto a patología cervical.

ii) A las mujeres con lesiones de alto grado (H-SIL/CIN II-III) se les administra un “tratamiento quirúrgico”, que consiste en la remoción de la lesión mediante conización cervical y re-evaluación histológica. Luego se aplica el mismo esquema de seguimiento que a las pacientes con lesiones de bajo grado.

Tal como detallado previamente (Sección 4.I.2.1), 68 de las 115 mujeres reclutadas aceptaron participar en el estudio longitudinal. De acuerdo al protocolo de asistencia antes mencionado

(Figura 16), 23 recibieron tratamiento quirúrgico y 45 tratamiento expectante durante un período promedio de 24 meses. En cada visita las pacientes recibieron un examen ginecológico completo con toma de muestra de cepillado cervical para el examen citológico (Pap). Esa misma muestra fue posteriormente procesada (Sección 3.1.3.1) para ser analizada con los sistemas L1HPVPCR 16.4.1 y CUT a fin de determinar la presencia y tipos de HPV en muestras secuenciales de este grupo de mujeres durante el período de seguimiento. En todos los casos, el diagnóstico y tipificación viral se realizó en forma combinada con los resultados arrojados por ambos sistemas, como descripto previamente (Sección 4.I.2).

4.I.2.3.1 Análisis de la evolución de la infección por HPV según el tipo de tratamiento: Expectante Vs. Quirúrgico.

La evolución de la infección por HPV fue clasificada en cuatro categorías de acuerdo a un criterio previamente reportado [72]:

- **Persistencia:** si el tipo de HPV detectado al ingreso era identificado más de dos veces en diferentes muestras secuenciales durante el estudio;
- **Regresión:** si al final del seguimiento la muestra resultaba negativa para HPV;
- **Reinfección,** si se identificaban tipos de HPV diferentes en las muestras a lo largo del tratamiento respecto al tipo detectado en la muestra de ingreso al estudio;
- **Negativo,** si las muestras resultaban HPV-negativas a lo largo del periodo de estudio.

En la Tabla 12 se muestra la evolución de la infección por HPV en esta población en relación al tipo de tratamiento recibido y de acuerdo a la categoría citológica de la muestra de ingreso al estudio. En total, 35% (24/68) de las pacientes eliminaron la infección por HPV al final del seguimiento (regresión), 31% (21/68) de ellas se identificaron diferentes tipos de HPV en las sucesivas muestras a lo largo del estudio respecto a los hallados en la muestra de ingreso (reinfección) y 31% (21/68) no logró eliminar la infección inicial, detectándose el/los mismo/s tipo/s de HPV al final del estudio (persistencia). Por otro lado solo 2 mujeres tuvieron todas sus muestras negativas para ADN de HPV (negativo) (Tabla 12).

Tabla 12: Evolución de la infección por HPV en mujeres con patología cervical: Tratamiento Expectante vs Tratamiento Quirúrgico

Tipo de tratamiento (edad media)	Citología de ingreso	Todas (n)	Evolución de la infección por HPV, n				Tipos persistentes* (Especie Alfa-PV)
			Negativo	Regresión	Reinfección	Persistencia	
Expectante (27 años)	Negativo	8	0	3	3	2	HPV16, 33 (α -9)
	ASC-US	7	1	2	2	2	HPV16, 58 (α -9)
	L-SIL	30	1	8	8	13	HPV56, 66 (α -6) HPV18, 45, 59 (α -7) HPV16, 31, 33, 58 (α -9)
Subtotal n (%) Expectante		45 (100)	2 (4)	13 (29)	13 (29)	17 (38)	
Quirúrgico n (%) (31 años)	H-SIL	23 (100)	0 (0)	11 (48)	8 (35)	4 (17)	HPV62 (α-3) HPV53 (α -6) HPV16, 31, 33, 58 (α -9)
Total n (%)		68 (100)	2 (3)	24 (35)	21 (31)	21 (31)	

* Los HPV BR se muestran en negrita. α : Alfa

Por otro lado, alrededor de un tercio de las mujeres que recibieron tratamiento expectante (13/45, 29%), logró eliminar el virus al final del seguimiento (regresión), siendo HPV negativas con ambos sistemas de detección en la última muestra secuencial recolectada cuando se finalizó o abandonó el seguimiento. En otro tercio (13/45, 29%) se identificaron tipos de HPV en las muestras secuenciales diferentes al identificado en la primera toma (reinfección). Por último, en el 38% (17/45) de las mujeres analizadas se identificaron los mismos tipos de HPV en al menos dos de las muestras analizadas a lo largo del periodo estudiado (persistencia). La mayor frecuencia de infecciones persistentes se observó en las mujeres que tenían citología L-SIL al principio de tratamiento expectante (13/30, 43%). Por otro lado, el 27% (8/30) de estas pacientes logró eliminar la infección al final de periodo estudiado (regresión), observándose la misma proporción de mujeres en donde se pudo identificar otro/s tipo/s de HPV (reinfección). En cuanto a las demás categorías citológicas (AS-CUS y Negativo al inicio de tratamiento expectante), se observó que hubo una proporción

similar de mujeres que logró eliminar la infección (regresión), que no pudo hacerlo (persistencia) y que se re infectaron con otro/s tipo/s de HPV a lo largo del periodo de seguimiento.

Todos los tipos de HPV involucrados en infecciones persistentes en al menos dos muestras y al final del tratamiento expectante fueron tipos AR, agrupados en las especies que incluyen a los tipos mayormente asociados al desarrollo del cáncer cervical (α -7 y α -9). Entre ellos, los que se identificaron con mayor frecuencia fueron HPV16 (7/17) y HPV31 (5/17), dos de los 5 tipos AR considerados como los más carcinogénicos [63]. Además se identificaron tipos considerados como posibles carcinogénicos (HPV66) y carcinogénicos (HPV56) agrupados en la especie Alfa 6.

En relación a las mujeres que recibieron tratamiento quirúrgico (Tabla 12), todas tenían citología H-SIL en la muestra de ingreso al protocolo. Alrededor de la mitad de las pacientes (11/23, 48%) eliminó la infección al final del tratamiento (regresión), en el 35% (8/23) se detectaron tipos de HPV diferentes a los de la muestra de ingreso (reinfección) y en el 17% (4/23) se detectaron el/los mismo/s tipo/s de HPV al final del tratamiento (persistencia). El tipo que se identificó con mayor frecuencia fue el HPV16 (3/4), los demás tipos identificados corresponden a muestras de una paciente con infecciones múltiples. Todos los tipos detectados en infecciones persistentes de este grupo, excepto el HPV62, fueron tipos AR.

4.I.2.3.2 Análisis de la evolución clínica de 68 mujeres con patología cervical

Para analizar la evolución clínica de las pacientes incluidas en el estudio longitudinal se establecieron las siguientes categorías en base a los resultados obtenidos en la citología al inicio y al final del periodo estudiado:

- **NILM**, negativo para lesión intraepitelial o malignidad, incluidas en el protocolo porque tenían antecedentes de patología cervical aunque al momento del ingreso ya presentaban citología negativa;
- **Persistencia**, cuando la paciente presentaba la misma categoría citológica (lesión) al principio y al final del seguimiento;
- **Regresión**, la categoría citológica establecida al final del seguimiento fue de menor grado a la del inicio del seguimiento;
- **Progresión**, la categoría citológica establecida al final del seguimiento fue H-SIL.

El análisis de la evolución clínica de la población en estudio se realizó por separado en la cohorte de mujeres que recibió tratamiento expectante o quirúrgico debido a que las citologías de ingreso y el criterio del ginecólogo para realizar una u otra práctica fueron diferentes.

4.I.2.3.2.1 Análisis de la evolución clínica (citología) en relación a la evolución de la infección por HPV en las mujeres recibieron Tratamiento Expectante.

Como se observa en la Tabla 13, la mayoría de las mujeres que recibieron tratamiento expectante tuvieron citología negativa (regresión o NILM) al final del periodo de seguimiento (32/45, 71%). Además 25% (11/45) de estas pacientes no sufrió lesiones más severas al finalizar el estudio de las que se determinaron al inicio del tratamiento (persistencia). Es decir que el 96% (43/45) de las mujeres que recibieron tratamiento expectante tuvo una evolución clínica favorable al finalizar el tratamiento respecto a la citología inicial. Sólo 4% (2/45) de las mujeres incluidas en este grupo tuvieron una evolución clínica desfavorable (progresión), con el desarrollo de lesiones de alto grado (H-SIL) al final del periodo estudiado.

Tabla 13: Evolución clínica Vs Evolución virológica en mujeres con Tratamiento Expectante

Evolución Clínica	NILM	Persistencia	Regresión	Progresión	Total n (%)
Infección por HPV*					
Negativo	0	1	1	0	2 (4)
Regresión	2	4	7	0	13 (29)
Reinfección	1	1	10	1	13 (29)
Persistencia (tipos AR)	1	5	10	1	17 (38)
Total n (%)	4 (9)	11 (25)	28 (62)	2 (4)	45 (100)

*La evolución de la infección se categorizó de acuerdo al criterio definido en la sección 4.I.2.3.2

La historia natural de la infección por HPV predice que alrededor de un 70–90% de las pacientes infectadas eliminarán el virus (DNA de HPV negativo) dentro de los 12 a 24 meses de contraída la infección y solo una pequeña proporción progresará a lesiones de alto grado y/o cáncer. [71,83]. En este estudio la evolución natural de infección se determinó en el grupo de mujeres que recibieron tratamiento expectante en donde se observó un mayor porcentaje de mujeres que logró una evolución clínica favorable (regresión) respecto a las que progresaron a lesiones cervicales de mayor grado (progresión) (62% vs 4%), coincidiendo con los datos aportados por otros estudios.

Debido a que diversos estudios relacionan la persistencia de la infección por algún tipo HPV AR con el desarrollo de lesiones de alto grado [187,188], resultó interesante establecer una posible relación entre la evolución clínica y la evolución de la infección por HPV. Como se muestra en la Tabla 13, entre las 28 mujeres que tuvieron evolución clínica favorable (regresión clínica) hubo 10 con infecciones persistentes (persistencia tipos AR), y 10 que se reinfectaron con algún otro/s tipo/s de HPV (reinfección). Finalmente, en 7 mujeres hubo concordancia entre una evolución clínica favorable (regresión clínica) y la eliminación de la infección por HPV (regresión virológica). Es

decir que, a pesar de la condición de la infección, la mayoría de las mujeres de este grupo logró evolucionar favorablemente a citologías negativas.

4.I.2.3.2.2 Análisis de la evolución clínica (citología) en relación a la evolución de la infección por HPV en las mujeres recibieron Tratamiento Quirúrgico.

En el grupo de mujeres que recibieron tratamiento quirúrgico, todas con citología H-SIL al ingreso al estudio (Tabla 12), se realizó un análisis similar al realizado en la sección anterior. Como se muestra en la Tabla 14, el 100% de las mujeres tuvo una evolución clínica favorable con regresión en la categoría citológica al final del seguimiento (regresión). La gran mayoría de ellas (21/23, 91%) tuvo citología negativa, mientras que 2 de las pacientes tuvieron citología L-SIL al final del seguimiento. Por otro lado, no se observaron mujeres con persistencia citológica H-SIL o progresión a cáncer invasor.

En relación a la evolución de la infección por HPV, la mayoría de las mujeres fueron negativas para ADN de HPV al final del tratamiento (11/23, 48%), en concordancia con la regresión clínica. Por otro lado, tanto las mujeres con infección residual con el mismo tipo (persistencia) como aquéllas que se infectaron con nuevos tipos durante el seguimiento (reinfección) tuvieron una evolución clínica favorable (regresión).

Tabla 14: Evolución clínica Vs Evolución virológica en mujeres con Tratamiento Quirúrgico

Evolución clínica Infección por HPV*	Regresión n (%)
Regresión	11 (48)
Reinfección	8 (35)
Persistencia (tipos AR)	4 (17)
Total (%)	23 (100)

*La evolución de la infección se categorizó de acuerdo al criterio definido en la sección 4.I.2.3.2

En general, la mayoría de las pacientes incluidas en el estudio longitudinal, tanto las que recibieron tratamiento expectante como las que recibieron tratamiento quirúrgico, lograron evolucionar clínicamente de manera favorable (citología negativa) a pesar de que los tipos identificados persistentemente fueron de AR y que los dos más persistentes fueron el HPV16 y el HPV31, considerados como más carcinogénicos.

Particularmente, en el caso de las mujeres que recibieron tratamiento quirúrgico observamos la misma tendencia reportada por otros estudios, en donde la evolución clínica favorable (citología

negativa) se observa en pacientes que han eliminado la infección por HPV [72,106,189]. Este resultado confirma que la remoción de la lesión en pacientes lesiones de alto grado es el tratamiento adecuado y efectivo, a pesar de ser invasivo.

Los resultados presentados en este capítulo nos permiten establecer varios puntos importantes acerca de la epidemiología de la infección por tipos de HPV mucosos en cérvix de mujeres con diagnóstico de patología cervical. En primer lugar, el análisis de las muestras se realizó con dos métodos de identificación de HPV, uno de ellos (L1HPVPCR 16.4.1) es considerado como competente por el *WHO HPV LabNet*, y el otro (CUT) ha demostrado tener alta eficiencia en amplificar tipos de HPV de diferentes géneros, cubriendo de esta manera el mayor espectro posible de tipos virales que puedan infectar a la población.

Este tipo de análisis es el primero que se realiza en nuestra provincia, de esta manera los datos hasta aquí expuestos aportan información importante para sentar las bases de los virus y factores involucrados en las infecciones por HPV en mujeres no vacunadas con diagnóstico y/o antecedentes de patología cervical de la provincia de Santa Fe para evaluar a futuro el impacto de la vacuna en el reemplazo de tipos oncogénicos.

Capítulo II

Epidemiología de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar de individuos inmunocompetentes.

4.II. Consideraciones generales.

Como expuesto en la Sección 1.3.5.1, la incidencia del CPNM ha aumentado globalmente en los últimos años como consecuencia del aumento del agujero de ozono [190]. Evidencias experimentales sugieren que la acción combinada entre la UV y la inhibición de los mecanismos reparadores celulares por parte de algunos tipos de HPV podrían favorecer la generación de un fenotipo maligno [118,122,191]. Teniendo en cuenta que Argentina, por su ubicación geográfica, es una de las zonas de alto riesgo de CPNM, nos propusimos avanzar en el conocimiento sobre las características de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar en individuos inmunocompetentes de nuestra región. De acuerdo a nuestra hipótesis, la información resultante permitiría conocer los tipos de HPV que circulan y persisten en epitelios cutáneos cuando el principal factor ambiental es la exposición a la radiación solar.

4.II.1. Descripción de la población y diseño experimental

Con el objetivo de identificar los HPV que circulan y persisten en piel sana expuesta al sol, se puso en marcha un protocolo de reclutamiento de individuos inmunocompetentes sanos que trabajan en laboratorios u oficinas administrativas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) y de la Facultad de Ciencias Médicas (UNR).

El estudio tuvo 1 año de duración, se realizó de acuerdo con los principios enunciados en la Declaración de Helsinki y sus enmiendas, y fue aprobado por los Comités de Ética de cada una de las instituciones involucradas (Anexo I). Todos los individuos que participaron en el estudio dieron su consentimiento escrito e informado y completaron un cuestionario sobre información demográfica, hábitos de exposición al sol y uso de protector solar (Anexo I).

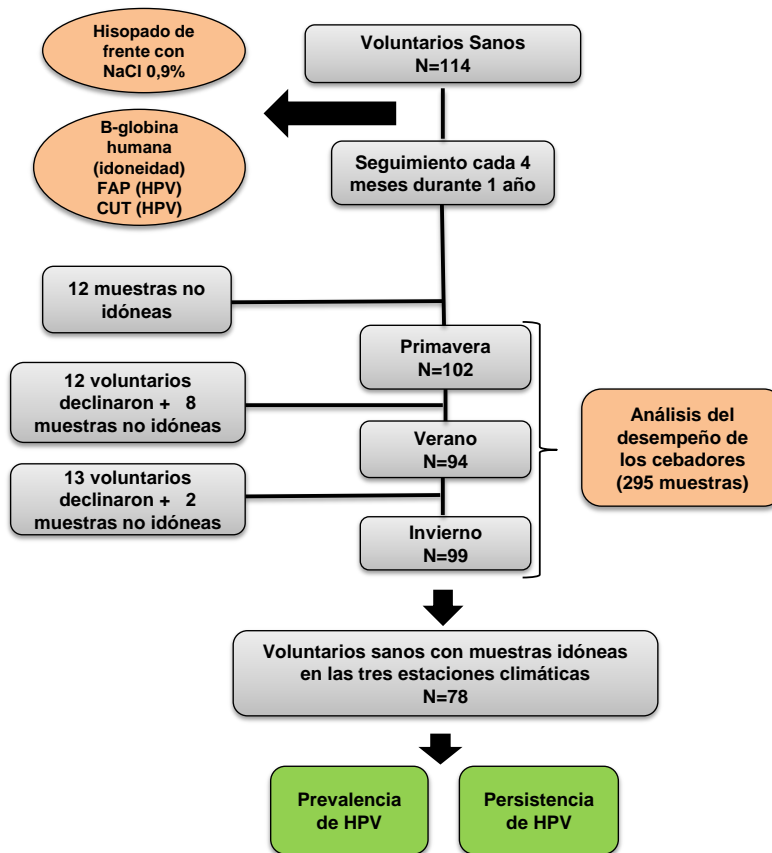
Durante el período 2013-2014, se reclutaron 114 voluntarios que aceptaron participar en el estudio. Para abordar los objetivos planteados, a cada voluntario se le tomó una muestra no invasiva de piel sana expuesta a la radiación solar (hisopado embebido en NaCl de la frente) en 3 estaciones climáticas diferentes (ver Sección 3.1.2). Por lo tanto, en total se tomaron 3 muestras/voluntario durante el curso del estudio. La primera muestra fue recolectada en primavera (octubre 2013), la segunda en verano (marzo 2014) y la tercera en invierno (agosto 2014).

En la Figura 17 se representa gráficamente el diseño experimental llevado a cabo para cumplir con estos objetivos. Con el fin de comparar el desempeño de los dos sistemas de cebadores utilizados en esta sección (CUT y FAP) para identificar tipos de HPV en piel, se analizaron todas las muestras recolectadas que resultaron idóneas durante el estudio. Por lo tanto, para abordar este objetivo se

analizaron en total de 295 muestras (Figura 17): 102 muestras recolectadas en primavera, 94 muestras tomadas en verano y 99 tomadas en invierno.

Por otro lado, los estudios de prevalencia y persistencia de la infección por HPV en piel sana expuesta a radiación solar en 3 estaciones climáticas se realizaron en el grupo de 78 voluntarios que completaron el protocolo (Figura 17), es decir, de los cuales se obtuvieron las 3 muestras previstas en el estudio (total de muestras = 234) y que resultaron idóneas a la amplificación (β -globina positivas). Todas las muestras incluídas en los estudios de prevalencia y persistencia se analizaron en forma combinada con los dos sistemas de cebadores (CUT y FAP), en las condiciones detalladas en la Sección 3.3.2.

Figura 17: Diseño experimental del estudio de prevalencia y persistencia de HPV en piel sana expuesta a la radiación solar



4.II.2. Comparación del desempeño de los sistemas de cebadores CUT y FAP para la identificación de HPV en muestras de piel sana expuesta a la radiación solar.

En primer lugar se analizaron todas las muestras idóneas obtenidas en el estudio ($n = 295$) a fin de comparar las capacidades de los sistemas de cebadores CUT y FAP para identificar la infección por HPV y los tipos circulantes en epitelios cutáneos, de acuerdo al esquema experimental descrito en la Figura 17.

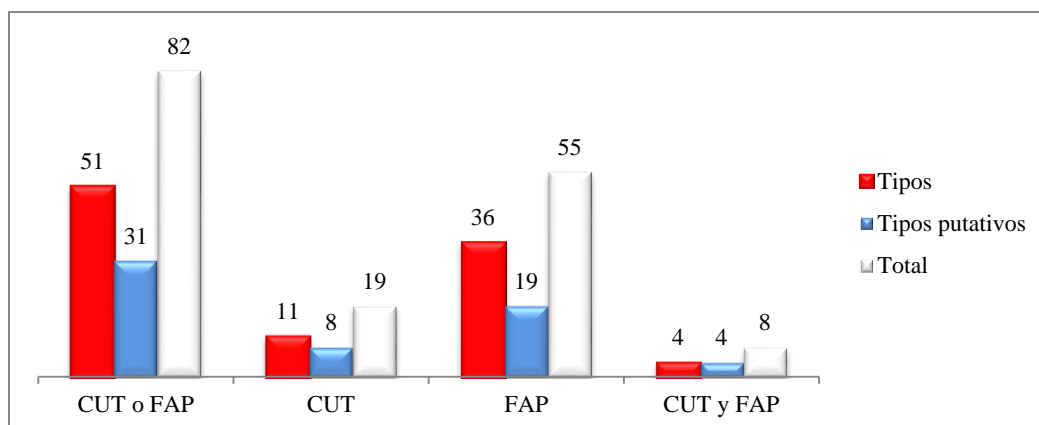
Los resultados obtenidos (Tabla 15) indican una concordancia general entre ambos sistemas de cebadores del 56% (164/295). Si bien la identificación de secuencias de HPV fue más frecuente con los cebadores FAP que con los CUT (46% Vs. 10%, respectivamente), el mayor número de muestras HPV-positivas (165/295; 56%) se obtuvo cuando se consideraron los resultados de ambas metodologías en forma conjunta.

Tabla 15: Presencia de HPV en epitelios cutáneos determinada con los sistemas de cebadores CUT y FAP.

	CUT+ <i>n (%)</i>	CUT- <i>n (%)</i>	Total <i>n (%)</i>
FAP+ <i>n (%)</i>	17 (6)	118 (40)	135 (46)
FAP- <i>n (%)</i>	13 (4)	147 (50)	160 (54)
Total <i>n (%)</i>	30 (10)	265 (90)	295 (100)

Cuando se analizaron las secuencias obtenidas con cada uno de los sistemas de cebadores FAP y CUT, se encontraron en total 82 tipos/tipos putativos diferentes de HPV: 55 se identificaron con los cebadores FAP, 19 con los cebadores CUT y 8 con ambos pares de cebadores (Figura 18), en línea con los resultados expresados en la Tabla 15, donde el sistema FAP identificó mayor cantidad de muestras HPV-positivas. Por otro lado, de los 82 tipos/tipos putativos de HPV identificados (Figura 18 y Tabla 16), 51/82 (62%) fueron tipos previamente caracterizados (se conoce todo su genoma) y 31/82 (38%) fueron tipos putativos (se conoce la secuencia de un fragmento del genoma amplificado por PCR), de los cuales 28 fueron descriptos previamente (denominados tipos FA, FAIMVS, KC, SE, GC, etc) y 3 fueron tipos putativos nuevos identificados por primera vez en este trabajo (denominados “tipos EP”): EP01, EP04 y EP05. En relación a los tipos putativos nuevos, 1 fue identificado con los cebadores FAP (EP01) y 2 con los cebadores CUT (EP04 y EP05).

Figura 18: Tipos/tipos putativos identificados en cebadores CUT y FAP en 295 muestras de piel sana expuesta a radiación solar



Por otro lado, los tipos de HPV identificados con cada sistema de cebadores (CUT y FAP) coincidieron en apenas el 10% (8/82) de los tipos identificados (Figura 18). Además, sólo 4 tipos/tipos putativos fueron identificados simultáneamente en la misma muestra con ambos sistemas (Figura 18). Estos resultados refuerzan la necesidad de utilizar los dos sistemas de amplificación con el fin de conocer exhaustivamente la epidemiología de la infección por HPV en piel.

Tabla 16: Tipos/tipos putativos de HPV identificados con los cebadores CUT y FAP.

Género	Especie	Tipos/tipos putativo de HPV	Tipo más relacionado (%) ^a	FAP	CUT	FAP y CUT	Total
Alfa	2	HPV3		0	1		1
	2	HPV28		0	2		2
	2	HPV78		0	1		1
	3	HPV87		0	1		1
	3	HPV89		0	1		1
	4	HPV2		0	7		7
	8	HPV40		0	1		1
Beta	1	HPV5		14	0		14
	1	HPV8		3	0		3
	1	HPV12		4	0		4
	1	HPV14D		3	0		3
	1	HPV19		11	0		11
	1	HPV20		11	0		11
	1	HPV21		10	1	1 ^b	10
	1	HPV24		5	0		5
	1	HPV25		2	0		2
	1	HPV36		4	0		4
	1	HPV47		1	0		1
	1	HPV93		3	0		3
	1	HPV98		2	0		2
	1	HPV105		2	0		2
	1	HPV124		3	0		3
	1	FA25	HPV152 (81%)	1	0		1
	1	HPVRTRX7		3	0		3
1	FA127	HPV152 (80%)	3	0		3	

Género	Especie	Tipos/tipos putativo de HPV	Tipo más relacionado (%) ^a	FAP	CUT	FAP y CUT	Total
	2	HPV9		1	0		1
	2	HPV17		0	1		1
	2	HPV22		1	0		1
	2	HPV23		1	0		1
	2	HPV37		5	0		5
	2	HPV38b		2	0		2
	2	HPV80		2	0		2
	2	HPV107		4	0		4
	2	HPV110		1	0		1
	2	HPV111		6	0		6
	2	HPV120		8	0		8
	2	FA108	HPV107 (86%)	5	0		5
	2	FA114	HPV15 (83%)	3	0		3
	2	HPV174		2	1	1 ^c	3
	2	SE125	HPV159 (86%)	3	1	1 ^b	3
	2	GC17	HPV110 (81%)	1	0		1
	2	FA116	HPV104 (84%)	1	0		1
	3	HPV115		2	1	2 ^c	3
	3	HPV49		3	0		3
	3	vs40-7	HPV49 (79%)	1	0		1
	3	HPV75		3	0		3
	5	FAIMVS16	HPV96 (82%)	2	0		2
	5	HPV96		3	0		3
	5	HPV150		1	0		1
	5	FA74	HPV150 (86%)	1	0		1
	5	FA42	HPV96 (86%)	1	0		1
	1	EP01*	HPV173 (85%)	2	0		2
	2	HPV48		0	1		1
	3	HPV50		4	2	2 ^c	6
	7	FA142	HPV134 (87%)	1	0		1
	7	FA175	HPV170 (77%)	1	0		1
	7	HPV149		1	0		1
	7	HPV134		1	0		1
	8	FAIMVS9	HPV168 (73%)	0	3		3
	8	HPV119		1	0		1
	8	HPV147		1	0		1
	8	FA15	HPV147 (70%)	1	0		1
	10	FAIMVS7	HPV121 (84%)	1	1	1 ^c	2
	10	EP05*	HPV142 (85%)	0	1		1
	11	FA24.2	HPV141 (76%)	0	2		2
	12	FA10	HPV132 (82%)	1	2	1 ^b , 1 ^c	2
	12	GC08	HPV148 (79%)	0	1		1
	12	KC96	HPV165 (80%)	0	1		1
	12	HPV148		1	0		1
	12	FA97	HPV148 (84%)	2	0		2
	13	HPV153		0	1		1
	15	KC117	HPV135 (78%)	1	0		1
	19	HPV162		1	0		1
	19	FA38	HPV162 (78%)	0	1		1
	20	SE6	HPV163 (81%)	1	0		1
	20	HPV163		1	0		1
	21	HPV167		0	1		1
	22	GC13	HPV50 (70%)	0	1		1
	22	GC16	HPVCH2 (82%)	2	0		2

Gama

Género	Especie	Tipos/tipos putativo de HPV	Tipo más relacionado (%) ^a	FAP	CUT	FAP y CUT	Total
	22	KC62	HPVFi864 (73%)	1	1	1 ^b	1
	24	EP04*	HPV197 (75%)	0	1		1
	24	FA34	HPV197 (77%)	1	0		1
Total				174	38	11	209

^a Los tipos putativos de HPV se muestran con los tipos caracterizados que presentan mayor identidad nucleotídica. El porcentaje de identidad nucleotídica correspondiente se indica entre paréntesis.

^b El mismo tipo de HPV fue encontrado en la misma muestra.

^c El mismo tipo de HPV fue encontrado en muestras diferentes.

*Tipos putativos nuevos de HPV identificados por primera vez en este trabajo.

En total, se obtuvieron 209 secuencias a partir de las 295 muestras analizadas que correspondían a 82 tipos/tipos putativos de HPV: 174 secuencias se obtuvieron con los cebadores FAP, 38 con los CUT y 11 con ambos pares de cebadores (Tabla 16). En relación a la clasificación taxonómica de los distintos tipos/tipos putativos de HPV identificados en este estudio, 44 tipos pertenecían al género Beta PV, 31 al Gama PV y 7 al género Alfa PV (Tabla 16). En relación a la frecuencia de detección dentro de cada género, el tipo más frecuentemente encontrado del género Alfa PV fue el HPV2 (7 muestras clínicas), del género Beta PV fue el HPV5 (14 muestras clínicas) y dentro del género Gama PV el tipo más frecuente fue el HPV50 (6 muestras clínicas). Entre los tipos putativos conocidos, el FAIMVS9 (género Gama PV) fue el más frecuentemente identificado (3 muestras clínicas), y entre los tipos putativos nuevos, el EP01 (género Gama PV) fue el más frecuentemente encontrado (2 muestras clínicas).

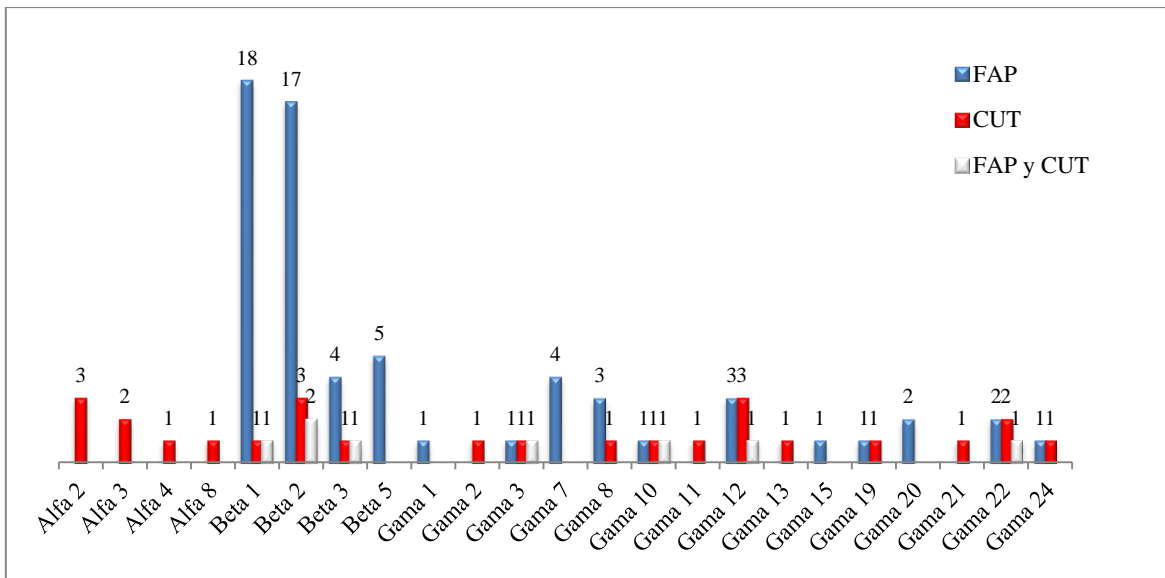
El desempeño de cada sistema de cebadores para detectar tipos/tipos putativos de distintos géneros se muestra en la Tabla 17. A diferencia del sistema de cebadores FAP, el sistema CUT logró amplificar virus del género Alfa PV. Por su parte el sistema FAP fue más eficiente que el sistema CUT en amplificar virus de los géneros Beta PV y Gama PV (148 Vs. 5 y 26 Vs. 19, respectivamente). En relación a los 8 tipos/tipos putativos detectados por ambos sistemas de cebadores (Tabla 16, columna “FAP y CUT”), 4 pertenecían al género Beta PV (HPV21, SE125, HPV115 y HPV174) y 4 al Gama PV (HPV50, FAIMVS7, FA10 y KC62).

Tabla 17: Desempeño de los cebadores CUT y FAP para amplificar tipos de HPV de distintos géneros

Géneros	Número de Virus	
	CUT	FAP
<i>Alfa</i>	14	0
<i>Beta</i>	5	148
<i>Gama</i>	19	26
Total	38	174

La Figura 19 muestra el desempeño de cada sistema de cebadores para detectar virus/virus putativos de diferentes géneros y especies dentro de la familia *Papillomaviridae*. Los cebadores FAP amplificaron principalmente tipos/tipos putativos de distintas especies dentro del género Beta PV (Beta 1, 2, 3 y 5) mientras que los cebadores CUT amplificaron por igual principalmente aquéllos pertenecientes a distintas especies de los géneros Gama PV (Gama 2, 3, 8, 10, 11, 12, 13, 19, 21, 22 y 24) y Alfa PV (Alfa 2, 3, 4 y 8).

Figura 19: Desempeño de los cebadores CUT y FAP para detectar tipos/tipos putativos de distintos géneros y especies



Por su parte, el sistema FAP también logró identificar virus del género Gama PV (Gama 1, 3, 7, 8, 10, 12, 15, 19, 20, 22, 24) y el sistema CUT del género Beta PV (Beta 1, 2, 3). En total, el sistema FAP amplificó tipos/tipos putativos de HPV distribuidos en 15 especies diferentes de los géneros Beta (4 especies) y Gama PV (11 especies), mientras que el sistema CUT amplificó tipos/tipos putativos de HPV distribuidos en 18 especies diferentes de los géneros Alfa (4 especies), Beta (3 especies) y Gama PV (11 especies). Por lo tanto, el uso combinado de los dos sistemas de cebadores permitió identificar tipos pertenecientes a 4/6 especies conocidas de Beta PV, 4/13 especies conocidas de Alfa PV y 15/27 especies conocidas de Gama PV.

Los resultados obtenidos hasta aquí confirman la extraordinaria diversidad de los HPV circulantes en piel humana y que el uso combinado de ambos sistemas de cebadores constituye la mejor estrategia para identificar estos virus. Por un lado, los tipos de HPV identificados con los cebadores CUT complementan los no identificados por los cebadores FAP y viceversa. Además demostramos

que los cebadores CUT tienen mayor capacidad que los cebadores FAP para identificar tipos de HPV pertenecientes a diferentes especies y géneros.

4.II.2.1 Análisis filogenético de los tipos/tipos putativos identificados en este trabajo.

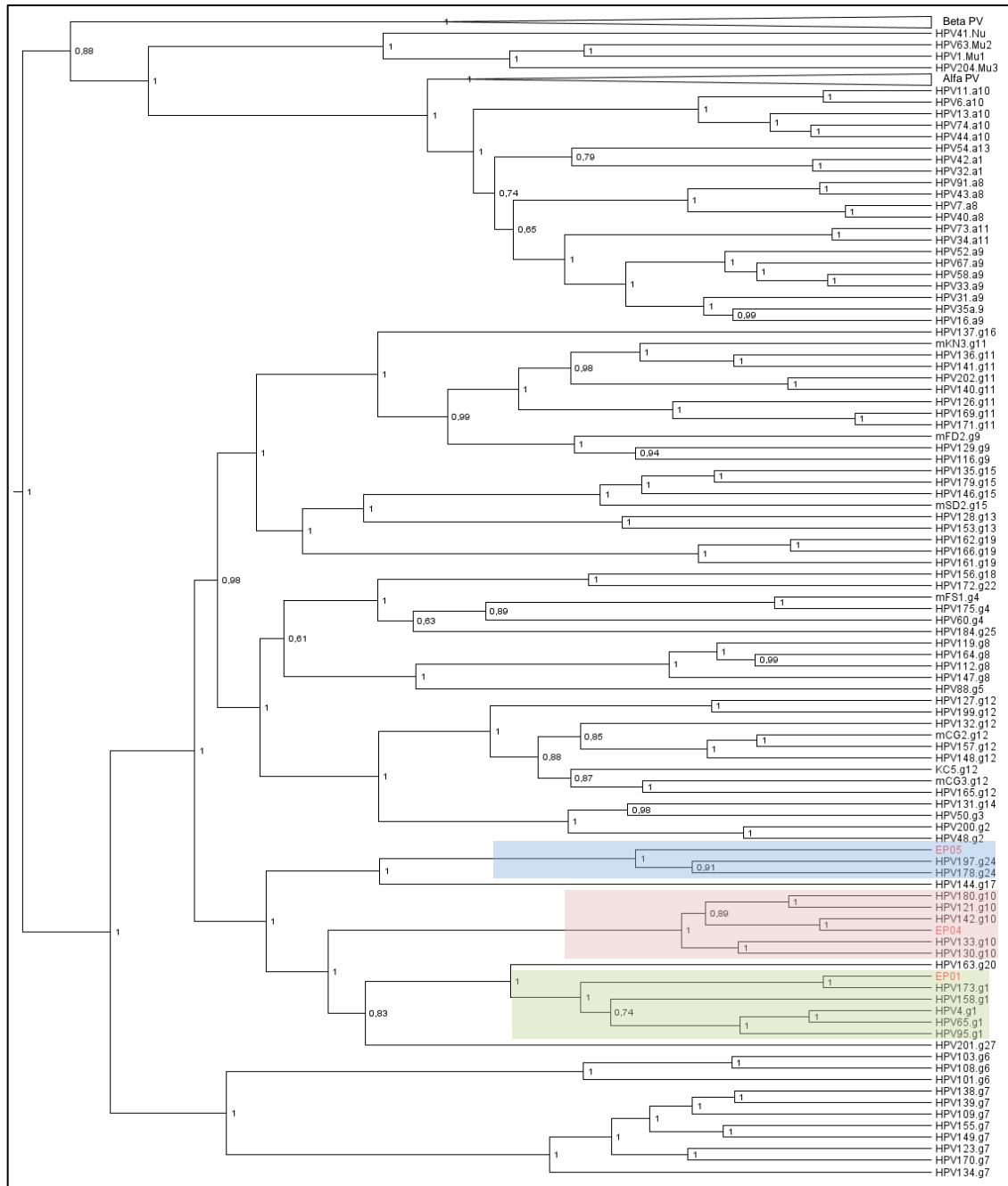
Como dicho anteriormente y como se observa en la Tabla 16, las secuencias obtenidas de todos los fragmentos amplificados a partir de las muestras de piel fueron analizadas y comparadas con todas las secuencias disponibles en el sitio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Aquellas secuencias que presentaban identidades nucleotídicas mayores al 90% respecto a las secuencias contenidas en la base de datos del GenBank fueron clasificadas como “Tipos previamente caracterizados” y por lo tanto su clasificación filogenética era conocida. En contraste, la clasificación filogenética de los tipos putativos nuevos que fueron identificados por primera vez en este trabajo (tipos EP) se desconocía completamente.

Si bien la clasificación actual de los PV está basada en el ORF L1 (región de aproximadamente 1.500 pb) [18], es posible realizar una aproximación correcta utilizando fragmentos de amplificación, tales como los obtenidos con los cebadores CUT o FAP. Esta estrategia fue propuesta previamente para los fragmentos generados con los cebadores FAP [192] y sucesivamente aplicada por nuestro laboratorio para las secuencias derivadas de los cebadores CUT [17,138].

Para determinar las relaciones filogenéticas de los tipos EP con los tipos conocidos de HPV pertenecientes a diferentes géneros y especies, se realizó un alineamiento basado en codones utilizando el programa MEGA 6.0 [171]. Se utilizó además el programa jModel test [172] para la identificación del modelo de sustitución nucleotídica (GTR+I+G) y el paquete Beast 1.7.5 [173] para la construcción de los árboles filogenéticos basados en inferencia bayesiana.

En la Figura 20 se muestra el árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias parciales de los tipos putativos nuevos identificados en este trabajo, en relación a 181 tipos de HPV previamente caracterizados. Del total de tipos caracterizados, 174 han sido oficialmente reconocidos por el Centro de Referencia Internacional de Papillomavirus Humanos (*International Human Papillomavirus Reference Center*) y se encuentran disponibles en www.hpvcenter.se. Por otro lado, los 7 tipos caracterizados restantes han sido identificados por metagenómica, no tienen designación oficial hasta el momento y están disponibles en www.pave.org.

Figura 20: Filogenia bayesiana de los 3 tipos putativos nuevos de HPV identificados en este trabajo respecto a 181 tipos conocidos de HPV.



Los tipos/tipos putativos de HPV se indican de la siguiente forma: nombre del virus, letra correspondiente al género (g: gama, Mu, Nu), el número de especie. Las ramas de los géneros Alfa y Beta PV están colapsadas. Las especies que agrupan los tipos putativos nuevos están sombreadas en color. Los tipos putativos nuevos están resaltados en rojo. Se indican los valores de la probabilidad posterior en cada uno de los nodos.

Como puede observarse en el árbol filogenético (Figura 20), los valores de probabilidad posterior fueron generalmente altos (>70) para todos los nodos. La distribución en *clusters* de las secuencias de los tipos conocidos de HPV se correlacionó con las obtenidas por otros autores [21,30]. Los 3

tipos putativos nuevos identificados en este trabajo fueron clasificados filogenéticamente dentro del género Gama PV (Figura 20). EP01, EP04 y EP05 demostraron estar filogenéticamente relacionados a distintas especies del género Gama PV (Tabla 18): EP01 se agrupó con la especie Gama 1, compartiendo un 84,8% de identidad nucleotídica en el ORF L1 con el HPV173; EP04 que se agrupa en la especie Gama 10 compartiendo un 83,8% de identidad nucleotídica con el HPV142; EP05 comparte un 74,1% de identidad nucleotídica con el HPV197, perteneciendo de esta manera a la especie Gama 24 recientemente reconocida por el Centro Internacional de Referencia de Papillomavirus Humanos, aunque esta especie aún no ha sido oficialmente designada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*) [16].

El hecho que los 3 tipos putativos nuevos identificados en este trabajo mostraron identidades nucleotídicas > 70% en el ORF L1 con virus relacionados dentro del género Gama PV (Tabla 18) indica que son nuevos miembros de las especies conocidas hasta el momento [16].

Tabla 18: Identities nucleotídicas (%) de los tipos putativos nuevos con los HPV representativos dentro de los 5 géneros de HPV.

Tipos HPV	Especie HPV	% identidad nucleotídica en L1		
		EP01	EP04	EP05
HPV173	Gama 1	84,8	65,7	64,5
HPV142	Gama 10	62,7	83,8	65,8
HPV197	Gama 24	60,7	62,1	74,1
HPV5	Beta 1	60,8	63,9	63,9
HPV16	Alfa 9	58,6	59,0	61,1
HPV41	Nu 1	54,3	52,4	55,7
HPV1	Mu 1	57,0	58,6	58,6

4.II.3. Características de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar de individuos inmunocompetentes

En esta sección se analiza la prevalencia y la persistencia de infección por HPV en 234 muestras de piel sana expuesta a radiación solar de 78 voluntarios inmunocompetentes en 3 estaciones climáticas sucesivas a lo largo de un año (primavera, verano e invierno) (ver Figura 17). Este grupo de individuos estuvo constituido por 55 mujeres y 23 hombres, con edad media de 39 años (rango etario: 23-63 años).

La prevalencia de infección se analizó para cada una de las estaciones climáticas. La *persistencia* de infección por HPV fue determinada como la presencia del mismo tipo de HPV en el mismo individuo en al menos 2 de las 3 estaciones climáticas estudiadas. Una infección se consideró

transitoria si al menos una de las muestras fue positiva para un tipo diferente de HPV y *negativa* cuando las 3 muestras resultaron negativas para ADN de HPV.

Por último, exploramos la posible asociación de ciertos factores demográficos (edad, sexo) y de comportamiento (hs. de exposición solar/semana, uso de protector solar) de los voluntarios en relación al tipo de infección que presentaron durante el estudio (transitoria, persistente o negativa).

4.II.3.1 Análisis de la prevalencia de la infección por HPV en 3 estaciones climáticas

La prevalencia de la infección por HPV en piel se determinó en cada estación climática del año a los 78 voluntarios utilizando los resultados arrojados por los sistemas de amplificación FAP y CUT en forma conjunta (ver sección 4.II.1 y Figura 17). Como se muestra en la Tabla 19, la mayor prevalencia de infección por HPV se observó en la primavera (53.9%). Por otro lado, las frecuencias de infección en las otras dos estaciones climáticas estudiadas fueron menores y similares entre sí, con prevalencias de 44.9% en verano y de 47.4% en invierno. Los análisis estadísticos determinaron que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p= 0,43$), sin embargo podemos observar una tendencia de mayor prevalencia de infección en primavera. Teniendo en cuenta que la mayor radiación UV en nuestro país ocurre entre los meses de Septiembre a Noviembre debido al paso del agujero de ozono [190,193], los resultados aquí expuestos ponen de manifiesto la posible influencia de la exposición solar sobre la mayor frecuencia de infección por HPV observada en primavera en esta población.

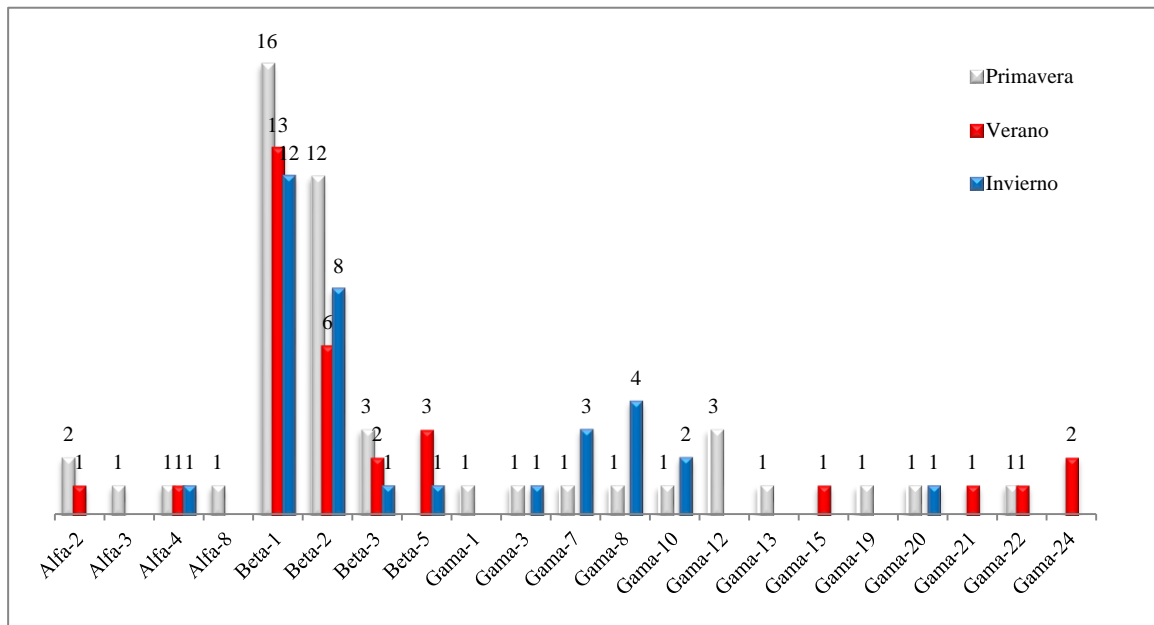
Tabla 19: Prevalencia de la infección por HPV y factores asociados en piel sana expuesta al sol de 78 individuos inmunocompetentes durante 3 estaciones de año.

	Primavera	Verano	Invierno
Infección por HPV <i>n</i> (%)	42 (53.9)	35 (44.9)	37 (47.4)
Especie HPV más prevalente	Beta 1	Beta 1	Beta 1
Tipo(s) HPV más prevalente	HPV5 HPV19	HPV19	HPV5
Especies de HPV identificadas (<i>n</i>)	17	10	10
Tipos/tipos putativos de HPV identificados totales (<i>n</i>)	48	31	34
Tipos putativos identificados, % (<i>n</i>/total)	24 (12/48)	29 (9/31)	24 (8/34)
Tipos putativos nuevos	EP01	EP05	EP04

Como muestran la Figura 21 y la Tabla 19, se lograron identificar diferentes tipos/tipos putativos y especies de HPV en cada estación climática. En primavera se identificó el mayor número de tipos y

de especies de HPV respecto al verano y al invierno. Además ciertas especies (Alfa 3, Alfa 8, Gama 1, Gama 12, Gama 13, Gama 19) se identificaron exclusivamente en primavera mientras que otras (Gama 15, Gama 21 y Gama 24) se identificaron solamente en verano. Por otro lado, las especies Alfa 4, Beta 1, Beta 2 y Beta 3 se identificaron en las 3 estaciones estudiadas (Figura 21). Al analizar los tipos de HPV más prevalentes en cada estación climática en estudio, se determinó que HPV5 y HPV19 fueron los más frecuentes en primavera (5/78), HPV19 en verano (4/78) y HPV5 (5/78) en invierno. Ambos tipos pertenecen a la especie Beta 1 que, además, fue la más prevalente en los tres periodos (Tabla 19 y Figura 21). Por último, el porcentaje de tipos putativos identificados en muestras de piel sana en cada una de las 3 estaciones estudiadas fue similar, identificándose un tipo putativo EP distinto en cada estación climática (Tabla 19).

Figura 21: Especies de HPV identificadas en piel sana expuesta a UV de 78 individuos sanos en 3 estaciones del año



4.II.3.2 Análisis de la persistencia de la infección por HPV en piel sana expuesta a la radiación solar en 3 estaciones climáticas y de la posible asociación con factores demográficos y de comportamiento.

Sucesivamente, analizamos el nivel de persistencia de la infección por HPV en los 78 voluntarios durante las 3 estaciones climáticas. Se observó infección por HPV en al menos una de las muestras en 79.5% (62/78) de ellos, mientras que el 20.5% de los voluntarios (16/78) fue HPV-negativo en las 3 muestras analizadas. Entre los individuos infectados, la presencia de infección se detectó en

1/3 muestras en el 40.3% (25/62), en 2/3 muestras en el 35.5% (22/62) y en 3/3 muestras en el 24.2% (15/62).

En la Tabla 20 se detallan los tipos/tipos putativos identificados con ambos sistemas de cebadores en las muestras incluidas en el estudio. Se identificaron en total 70 tipos/tipos putativos diferentes pertenecientes a 21 especies distintas dentro de los géneros Alfa, Beta y Gama PV. La mayoría de estas infecciones fueron transitorias, sin embargo nuestro interés se centró en aquellas que persistieron.

Tabla 20: Tipos/tipos putativos de HPV identificados con los sistemas CUT y FAP

Género HPV	Especie HPV	Primavera Tipo/tipo putativo HPV	Verano Tipo/tipo putativo HPV	Invierno Tipo/tipo putativo HPV
Alfa	2	HPV3 HPV28 HPV78	HPV28	ND
	3	HPV89	ND	ND
	8	HPV40	ND	ND
	4	HPV2	HPV2	HPV2
Beta	1	HPV5 HPV8 HPV14D HPV19 HPV20 HPV21 HPV24 HPV47 HPV105 FA127 HPVRTRX7	HPV5 HPV8 HPV19 HPV20 HPV21 HPV24 HPV25 HPV36 HPV93 HPV124 FA25 HPVRTRX7	HPV5 HPV8 HPV12 HPV19 HPV20 HPV21 HPV24 HPV25 HPV36 HPV93 HPV124 HPVRTRX7
	2	HPV9 HPV12 HPV17 HPV22 HPV37 HPV38b HPV80 HPV107 HPV110 HPV111 HPV120 HPV174 SE125 GC17 FA108	HPV80 HPV111 HPV120 HPV174 FA114 FA108	HPV12 HPV37 HPV38b HPV107 HPV111 HPV120 HPV145 FA114 FA108
	3	HPV49 HPV75 HPV115	HPV49 HPV75	HPV75
	5	FAIMVS16 HPV150	HPV96 FA74 FA42	HPV96
	Gama	1	EP01	ND
3		HPV50	ND	HPV50

Género HPV	Especie HPV	Primavera Tipo/tipo putativo HPV	Verano Tipo/tipo putativo HPV	Invierno Tipo/tipo putativo HPV
	7	FA142	ND	FA175 HPV134 HPV149
	8	FAIMVS9	ND	HPV119 FA15 FAIMVS9
	10	FAIMVS7	ND	FAIMVS7 EP04
	12	FA10	ND	ND
		GC08		
		KC96		
	13	HPV153	ND	ND
	15	ND	KC117	ND
	19	FA38	ND	ND
	20	HPV163	ND	SE6
	21	ND	HPV167	ND
	22	KC62	GC16	ND
	24	ND	FA34 EP05	ND

ND: No detectado

Como antes mencionado (Sección 4.II.3), la persistencia de la infección por HPV se definió como la presencia del mismo tipo en al menos 2 de las 3 estaciones climáticas analizadas en el mismo individuo. En base a esto, se determinó que 23/78 (29%) voluntarios presentaron infecciones persistentes con al menos un tipo/tipo putativo de HPV en común. De ellos, 5 individuos (6%) presentaron infecciones con el mismo tipo/tipo putativo en los 3 periodos estudiados.

En la Tabla 21 se muestran los tipos/tipos putativos de HPV identificados en los 23 voluntarios con infecciones persistentes. La mayoría de los virus involucrados en las infecciones persistentes pertenecen al género Beta PV: 10 tipos/tipos putativos de la especie Beta 1 (HPV5, HPV19, HPV20, HPV21, HPV24, HPV25, HPV36, HPV93, HPV124 y HPVTRX7), 5 de la especie Beta 2 (HPV37, HPV111, HPV174, FA108, FA114), 1 en la especie Beta 3 (HPV75) y 1 pertenece a la especie Beta 5 (HPV96). Dos voluntarios presentaron infecciones persistentes con virus del género Gama PV: HPV50 (Gama 3) y el tipo putativo FAIMVS9 (Gama 8). Por último, un solo individuo presentó una infección persistente con un tipo del género Alfa PV (HPV28 de la especie Alfa 2).

En relación a los tipos/tipos putativos individuales, el HPV5 (Beta 1) fue el más frecuentemente encontrado (3/23), seguido por HPV37 (Beta 2) (2/23) y HPV75 (Beta 3) (2/23). Interesantemente, todos los tipos identificados en los 5 voluntarios con las 3 muestras HPV-positivas pertenecían al género Beta PV y a la especie Beta 1 (HPV5, HPV19, HPV20, HPV21 y HPVTRX7) (Tabla 21, **negrita**).

Tabla 21: Tipos/tipos putativos identificados en piel sana expuesta a radiación solar de 23 voluntarios inmunocompetentes con infección persistente de HPV

Voluntario	Edad (años)	Sexo	Primavera Tipo/s HPV	Verano Tipo/s HPV	Invierno Tipo/s HPV	Tipo persistente (especie)*
1	26	M	Negativo	HPV96	HPV96	HPV96 (Beta 5)
2	28	F	Negativo	HPV124	HPV124	HPV124 (Beta 1)
3	34	F	HPV-5	HPV2	HPV8 HPV5	HPV5 (Beta 1)
4*	33	F	HPV20 HPV2	HPV20 HPV36	HPV20	HPV20 (Beta 1)
5	51	F	Negativo	HPV111	HPV111 HPV93 HPV21	HPV111 (Beta 2)
6	52	F	HPV75 HPV111	Negativo	HPV75 HPV5	HPV75 (Beta 3)
7	55	M	HPV75 HPV8	HPV75 FA74	Negativo	HPV75 (Beta 3)
8*	33	F	HPV21 HPV78 FAIMVS9	HPV21 HPV-167	HPV21	HPV21 (Beta 1)
9*	36	M	HPV19	HPV19	HPV19	HPV19 (Beta 1)
10	52	F	HPV20	HPV36	HPV124 HPV36	HPV36 (Beta 1)
11	35	M	HPV174	HPV174	EP04	HPV174 (Beta 2)
12*	35	M	HPV5	HPV5	HPV5	HPV5 (Beta 1)
13	52	F	Negativo	FA108 HPV111 EP05	FA108	FA108 (Beta 2)
14	51	F	HPV14D FA108 HPV120 HPV17	HPV25	HPV25	HPV25 (Beta 1)

Voluntario	Edad (años)	Sexo	Primavera Tipo/s HPV	Verano Tipo/s HPV	Invierno Tipo/s HPV	Tipo persistente (especie)*
15	45	F	HPV28	HPV28	Negativo	HPV28 (Alfa 2)
16	56	F	HPV163 GC17	FA114	FA114	FA114 (Beta 2)
17*	53	F	HPVRTRX7 HPV50	HPVRTRX7	HPVRTRX7	HPVRTRX7 (Beta 1)
18	58	F	SE125	HPV37	HPV37 HPV21	HPV37 (Beta 2)
19	45	F	HPV5 FAIMVS9 HPV3 HPV20	HPV5 HPV21	FAIMVS9	HPV5 (Beta 1) FAIMVS9 (Gama 8)
20	29	F	HPV50	HPV20	HPV50	HPV50 (Gama 3)
21	32	F	HPV37	Negativo	HPV37 HPV119	HPV37 (Beta 2)
22	39	F	Negativo	HPV24	HPV24 HPV12	HPV24 (Beta 1)
23	52	F	Negativo	HPV93	HPV93	HPV-93 (Beta 1)

* Los 5 voluntarios con tipos persistentes durante las 3 estaciones climáticas
M: masculino F: femenino

Los resultados hasta aquí expuestos ponen en evidencia, no solamente que los tipos/tipos putativos pertenecientes al género Beta PV son los más prevalentes, sino que también son los que se han asociado más frecuentemente a infecciones persistentes en muestras de piel sana expuesta al sol de individuos inmunocompetentes [140,144,194]. Como muestran las Figuras 19, 21 y Tabla 19, los tipos/tipos putativos de la especie Beta 1 son los que se identificaron más frecuentemente en las 3 estaciones del año analizadas.

4.II.3.2.1 Análisis de la posible asociación de factores demográficos y de comportamiento con el estado de la infección por HPV en piel sana expuesta a radiación solar

Trabajos previos han demostrado que los HPV pueden establecer una infección en la piel sin inducir daño en el tejido, y que ciertos factores como la edad de las personas y el tiempo de exposición a

luz solar podrían estar asociados a una mayor susceptibilidad a dicha infección [137,139,195]. En base a esta consideración, nos pareció interesante conocer si los factores demográficos (edad y género) y de comportamiento (hs exposición al sol/semana y uso de protector solar) podrían influenciar el estado de la infección de los voluntarios incluidos en esta población.

Con ese objetivo se compararon las variables en estudio entre los individuos con al menos una muestra positiva para HPV a lo largo del periodo estudiado (n : 62) (infecciones transitorias y persistentes) y los que fueron negativos para HPV en las tres estaciones climáticas (n : 16).

Al analizar la edad de los voluntarios, se observó que los aquéllos con infecciones (transitorias o persistentes) eran significativamente mayores (edad media: 39 años) que los individuos que fueron negativos para HPV en las 3 estaciones (edad media: 33 años) ($p=0,019$). Este resultado nos permite inferir que la mayor edad sería un factor asociado a la infección por HPV en piel de individuos sanos. Respecto al género no se observaron diferencias entre ambos grupos por lo que esta variable no estaría relacionada a la adquisición de la infección por HPV ($p=0,16$).

En cuanto a la comparación variables de comportamiento (hs de exposición solar/semana y uso de protector solar) entre los individuos con infecciones (62/78) respecto de los HPV-negativos (16/78), ninguna de ellas resultó ser significativamente diferente ($p=0,322$ y $p=0,360$, respectivamente). Sin embargo podemos observar que la exposición solar media en los individuos infectados fue de 6 hs/semana a diferencia de las 4 hs/semana que declararon los individuos negativos para las 3 tomas. Por lo tanto el tiempo de exposición al sol, podría ser un factor que influya en la infección por HPV. La asociación de la infección por HPV con todas las variables fue analizada además mediante una regresión logística multivariada, determinando que la edad fue la única variable que influyó significativamente en la adquisición de la infección ($p=0,0128$).

Con el fin de establecer si la persistencia de la infección estaba influenciada por alguno de los factores, analizamos y comparamos cada una de las variables en relación a cada uno de los estados de infección (persistencia, transitoria, negativa). Al igual que en el análisis previo el género ($p=0,32$), las hs de exposición al sol/semana ($p=0,41$) y el uso de protector solar ($p=0,34$) no difirieron significativamente entre los tres grupos. En cambio se logró determinar que la edad de los individuos con infecciones persistentes fue significativamente mayor (45 años) que la de los individuos no infectados (negativo) (33 años) ($p=0,05$). El análisis de asociación multivariado confirmó este resultado ($p=0,0158$).

Estos resultados en conjunto, nos permiten establecer y determinar, por un lado, que los HPV pueden propagarse fácilmente entre los individuos y causar infecciones persistentes sin inducir ningún daño en el tejido, y por el otro, que pueden infectar persistentemente la piel de individuos sanos por un período de al menos un año. Además determinamos que la mayor edad estaría

relacionada tanto con la adquisición de la infección como también en la persistencia de las infecciones por HPV en piel sana expuesta al sol.

Por otro lado pudimos observar que la prevalencia de infección en primavera fue mayor que en los otros dos periodos y que el tiempo medio de exposición al sol/semana en los individuos infectados (6 hs/semana) era mayor que el de los individuos que fueron negativos para HPV en las 3 estaciones (4 hs/semana). Si bien estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas determinamos que existe una tendencia y que la radiación solar podría ser un factor que influya en la infección por HPV en piel de individuos inmunocompetentes.

Capítulo III

**Caracterización de nuevos tipos
de HPV y análisis de eventos de
recombinación en el género
Gama PV**

4.III.1 Caracterización de nuevos tipos de HPV identificados en muestras de piel sana expuesta a radiación solar.

En los últimos años se avanzó considerablemente en la identificación de genomas completos de nuevos tipos de HPV, en particular de virus aislados de epitelios cutáneos [16,30]. Como descrito en el Capítulo II, en las muestras de individuos inmunocompetentes se identificaron 31 tipos putativos de HPV (no se conoce su genoma completo), de los cuales 3 fueron detectados por primera vez en este trabajo. A continuación se describen las actividades llevadas a cabo para amplificar los genomas completos de tipos putativos de HPV detectados en piel sana expuesta a la radiación solar de individuos inmunocompetentes utilizando la técnica denominada “PCR altamente sensible para fragmentos largos” desarrollada en nuestro laboratorio [35]. Esta herramienta es aplicable a genomas circulares como el de los PV y permite la amplificación de fragmentos largos de ADN con mayor eficiencia que las técnicas convencionales para tal fin. Como dicho en la Sección 3.3.2.2, esta técnica permite amplificar dos fragmentos solapantes de alrededor de 4 kpb que corresponden a las mitades genómicas de los tipos putativos de HPV de interés mediante el uso de cebadores genéricos y/o específicos que hibridan en las regiones L1 y E1 del genoma viral (Figura 14, Sección 3.3.2.2).

4.III.1.1 Amplificación de mitades genómicas de potenciales tipos nuevos con cebadores genéricos

Para la amplificación de mitades genómicas de tipos potenciales de HPV se utilizaron 2 muestras de hisopado de piel obtenidas en el estudio longitudinal descrito en el capítulo II de este trabajo (muestras V48-1 y V77-1) y 6 muestras de piel sana expuesta a la radiación solar recolectadas previamente para poner a punto el protocolo de toma de muestra utilizado en nuestro laboratorio (muestras 06C, 27A, 43A, 08C, 22A, 47C). En todas las muestras seleccionadas se habían identificado previamente tipos putativos de los géneros Gama PV y Beta PV cuyos genomas completos eran desconocidos (Tabla 22).

Los cebadores genéricos que hibridan en las regiones L1 y E1 de HPV utilizados para lograr la amplificación y caracterización de mitades genómicas de tipos potenciales de HPV fueron descritos en trabajos anteriores (ver Sección 3.3.2 y Tabla 4). Los cebadores genéricos que hibridan en la región L1 disponibles en el laboratorio y que han demostrado tener gran capacidad de identificar tipos y tipos putativos de diferentes géneros de HPV son los cebadores FAP [28,133] y CUT [138]. Por otro lado, los cebadores genéricos que hibridan en el ORF E1 fueron diseñados en nuestro laboratorio para el desarrollo de la técnica de amplificación de fragmentos largos [35]. En

efecto, la aplicación de esta estrategia utilizando los cebadores genéricos que hibridan E1 y L1 en forma combinada permitió la completa caracterización del HPV156 [35].

En base a lo expuesto, en primer lugar se alinearon todos los cebadores genéricos disponibles (Tabla 4) con las secuencias nucleotídicas correspondientes a los ORF L1 o E1 de los tipos de HPV de los géneros Gama-PV y Beta-PV filogenéticamente relacionados con los tipos putativos de HPV que se deseaban caracterizar y que están disponibles en www.hpvcenter.se y pave.niaid.nih.gov. De esta manera fue posible inferir qué cebadores tenían el menor número de bases desapareadas en las regiones E1 y L1, para su uso en la caracterización de genomas completos (Tabla 4, Sección 3.2.1). En base a este análisis, se seleccionaron los cebadores genéricos indicados en la Tabla 22. Las condiciones de la reacción de PCR y el perfil térmico se detallan en la Sección 3.3.2.2. En todos los casos, se ensayaron 3 TH (50°C, 52°C, 55°C) en la primera ronda de amplificación y 1 TH (50°C) en la segunda a fin de lograr bandas específicas y visibles luego de la amplificación para su posterior purificación y clonado.

Tabla 22: Tamizaje de tipos putativos de HPV con cebadores genéricos y “PCR altamente sensible para fragmentos largos”.

Código de Muestra	Tipo putativo (especie)	Tipo más relacionado (%) ^a	Cebadores Genéricos	Mitad genómica a amplificar	Mitad genómica obtenida
06C	GC14 (γ -12)	HPV132 (73%)	FAP64-Rv/E1 γ 2-Fw	L1parcial-L2-E2-E1parcial	Ninguna
27A	EP01 (γ -1)	HPV173 (85%)	FAP64-Rv/E1 γ 2-Fw	L1parcial-L2-E2-E1parcial	L1parcial-L2-E2-E1parcial
43A	FA91 (γ -12)	KC5 (78%)	FAP64-Rv/E1 γ 2-Fw	L1parcial-L2-E2-E1parcial	L1parcial-L2-E2-E1parcial
08C	GC09 (γ -12)	HPV165 (75%)	FAP64-Rv/E1 γ 2-Fw	L1parcial-L2-E2-E1parcial	Ninguna
22A	FA10 (γ -12)	HPV132 (82%)	FAP64-Rv/E1 γ 2-Fw	L1parcial-L2-E2-E1parcial	Ninguna
47C	FA91 (γ -12)	KC5 (78%)	FAP64-Rv/E1 γ 2-Fw	L1parcial-L2-E2-E1parcial	L1parcial-L2-E2-E1parcial
V48-1	FA10 (γ -12)	HPV132 (82%)	FAP64-Rv/E1 γ 2-Fw	L1parcial-L2-E2-E1parcial	L1parcial-L2-E2-E1parcial
V77-1	FA108 (β -2)	HPV107 (86%)	FAP6085-Fw/E1 β 2-Rv	L1parcial-LCR-E6-E7-E1parcial	L1parcial-LCR-E6-E7-E1parcial

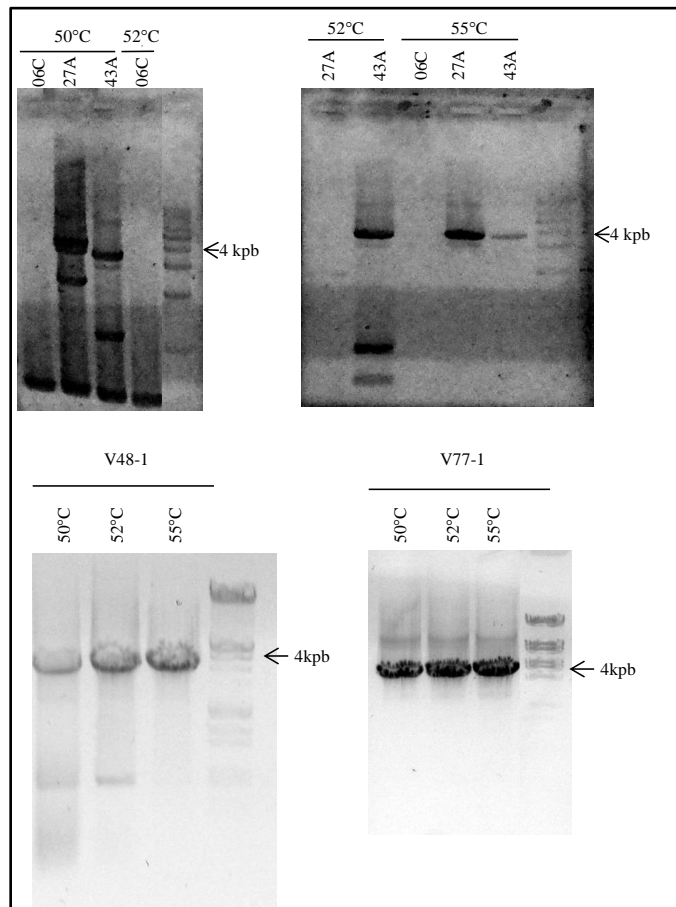
^aLos tipos putativos de HPV se muestran con los tipos previamente caracterizados que presentan mayor identidad nucleotídica. El porcentaje de identidad nucleotídica correspondiente se indica entre paréntesis. β : Beta, γ : Gama

Mediante esta estrategia se obtuvieron bandas de alrededor de 4 kpb en 5 (muestras 27A, 43A, 47C, V48-1, V77-1) de las 8 muestras en las distintas condiciones de TH aplicadas (Tabla 22). La Figura 22 muestra los resultados obtenidos de algunas muestras en las condiciones ensayadas. Por ejemplo, se obtuvieron bandas con el tamaño deseado en la muestra 27A (TH: 50° y 55°C), y en las muestras

43A, V48-1 y V77-1 (todas las TH utilizadas). En contraste, no se logró amplificar las mitades genómicas correspondientes a la muestra 06C en ninguna de las TH utilizadas.

Sucesivamente, se procedió a purificar todas las bandas de 4 kpb obtenidas por separado para luego ser clonadas en el vector p-Gem-T-easy (Promega). Los clones con el inserto correspondiente fueron identificados mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores M13Fw/Rv, como descrito en la sección 3.7.6, y se enviaron a secuenciar a un servicio especializado (Macrogen, EE.UU.). El análisis de sus secuencias permitió determinar que todas las bandas amplificadas a partir de la misma muestra contenían el mismo tipo putativo de HPV, no obstante haber sido generadas con diferentes TH. En la Tabla 22 se resumen las mitades genómicas obtenidas a partir de las muestras analizadas.

Figura 22: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados (~4 kpb) en muestras seleccionadas con cebadores genéricos y “PCR altamente sensible para fragmentos largos”.



Las secuencias resultantes fueron analizadas y comparadas con el gen L1 de los genomas de HPV disponibles (www.hpvcenter.se, pave.niaid.nih.gov) mediante herramientas bioinformáticas. Como

resultado de este análisis se determinó que la muestra 27A contenía un tipo putativo nuevo no identificado previamente, que denominamos EP01, que compartía 85% de identidad nucleotídica en el ORF L1 con el HPV173 (Gama 1). Por otro lado, las muestras 43A y 47C contenían ambas el FA91, un tipo putativo originalmente identificado en piel sana de un individuo inmunocompetente [196] que comparte 78% de identidad nucleotídica en el ORF L1 con el virus KC5 (Gama 12) identificado por metagenómica y que no tiene designación oficial hasta el momento (pave.niaid.nih.gov).

El análisis de la secuencia de la mitad genómica amplificada a partir de la muestra V48-1 determinó que contenía el tipo putativo FA10 identificado previamente en piel de un individuo inmunosuprimido y comparte 82% de identidad nucleotídica en el ORF L1 con el HPV132 (Gama 12). Asimismo, el fragmento de 4 Kpb amplificado a partir de la muestra V77-1 correspondía al tipo putativo FA108, identificado en piel de un individuo inmunocompetente y comparte 86% de identidad nucleotídica con el HPV107 (Beta 2) (Tabla 22).

4.III.1.2 Amplificación de las mitades genómicas de los potenciales tipos nuevos identificados con cebadores específicos.

En base a los resultados obtenidos en la sección 4.III.1.1, nos propusimos completar la caracterización de los genomas correspondientes a los tipos putativos EP01, FA91, FA10 y FA108. Con ese objetivo se diseñaron cebadores específicos en las regiones L1 y E1 en base a las secuencias obtenidas a partir de cada una de las mitades genómicas amplificadas previamente (Tabla 4, Sección 3.2.1). Para ello se utilizaron como molde las secuencias de 4 Kpb amplificadas con los cebadores genéricos (Tabla 22). Debido a que la secuencia obtenida de la muestra 47C no resultó adecuada por presentar cromatogramas superpuestos, se continuó con la identificación del genoma completo del tipo putativo FA91 con la muestra 43A.

Como resultado de este análisis, se diseñaron 4 pares de cebadores específicos para completar los genomas y proceder a la caracterización de los nuevos tipos. La Tabla 23 muestra los cebadores específicos seleccionados para abordar este objetivo, cuyas secuencias se detallan en la sección 3.2.1 (Tabla 4) para cada muestra en estudio. Los cebadores específicos se probaron a 3 TH diferentes en la MIX I (50°C, 52°C, 55°C) y a 50°C en la MIX II en las mismas condiciones de PCR que las utilizadas previamente con los cebadores genéricos. Como se observa en la Tabla 23, fue posible amplificar los fragmentos deseados de cada una de las 4 muestras analizadas ya sea en todas (tipos putativos EP01 y FA108) o en ciertas (tipos putativos FA10 y FA91) TH de la MIX I ensayadas.

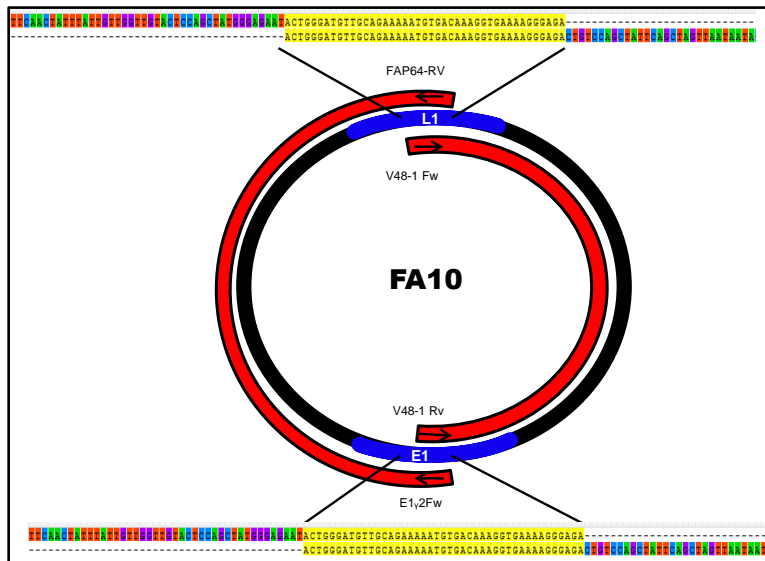
Tabla 23: Cebadores específicos y TH utilizados para amplificar las mitades genómicas de 4 tipos putativos de HPV.

Tipo putativo	Cebadores Específicos	TH de amplificación en MIX I (°C)	Mitad genómica amplificada
EP01	27A-Fw/27A-Rv	50-52-55	L1 (parcial)-LCR-E6-E7-E1 (parcial)
FA10	V48-1Fw/V48-1Rv	50	L1 (parcial)-LCR-E6-E7-E1 (parcial)
FA91	43A-Fw/43A-Rv	55	L1 (parcial)-LCR-E6-E7-E1 (parcial)
FA108	V77-1Fw/V77-1Rv	50-52-55	E1 (parcial)-E2-L2-L1 (parcial)

La mitad genómica correspondiente al tipo putativo EP1 fue clonada en el vector pGem-T-Easy (Promega) y las correspondientes a los tipos FA10 y FA108 fueron clonadas en el vector TOPO XL (Invitrogen); la mitad genómica correspondiente al tipo FA91 no se logró clonar al momento de finalizar este trabajo de tesis. Los clones con el inserto correspondiente fueron identificados mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores M13Fw/Rv. Las tres mitades genómicas clonadas fueron enviadas a secuenciar y todas las secuencias se solaparon con las mitades genómicas amplificadas con los cebadores genéricos. Así, utilizando las herramientas bioinformáticas, pudimos confirmar que las mitades amplificadas con cebadores específicos completaban las mitades genómicas obtenidas previamente con cebadores genéricos. Por lo tanto, podemos concluir que la estrategia abordada permitió obtener los genomas completos de 3 tipos nuevos de HPV a partir de muestras de piel de individuos de nuestra región. En la Figura 23 se esquematiza la estrategia utilizada para caracterizar los genomas completos de los 3 tipos nuevos utilizando como modelo el tipo FA10.

Los clones y las secuencias correspondientes fueron enviadas al *International Reference Centre for Papillomaviruses* ubicado en el *Karolinska Institute* (Estocolmo, Suecia), donde los genomas completos de los tres nuevos virus fueron confirmados y oficialmente designados como HPV205 (EP01) [197], HPV209 (FA108) y HPV210 (FA10) (www.hpvcenter.se). Todos los virus caracterizados fueron aislados de muestras de piel sana expuesta al sol de individuos inmunocompetentes. Los tipos HPV205, HPV209 y HPV210 fueron posteriormente identificados en muestras de hisopado de piel analizadas en el estudio longitudinal realizado en este trabajo de tesis. Particularmente, los tipos HPV205 y HPV210 fueron identificados por única vez en 2 muestras pertenecientes a dos individuos diferentes. Por su parte, el HPV209 fue identificado en 5 muestras clínicas tomadas de 4 individuos, uno de los cuales presentó una infección persistente con este tipo viral (Sección 4.II.4.2). Sin embargo, queda pendiente el análisis de la prevalencia de los 3 nuevos virus caracterizados en muestras de distintos epitelios a fin de poder dilucidar el tropismo y significado clínico de sus infecciones.

Figura 23: Esquema de la estrategia utilizada para caracterizar genomas completos de tipos nuevos de HPV



Par de cebadores genéricos utilizados para generar la mitad genómica de FA10 (sección 4.III.1.1): E1 γ 2Fw/FAP64-Rv
 Par de cebadores específicos para completar el genoma del nuevo virus (sección 4.III.1.2): V48-1 Fw/ V48-1 Rv

4.III.1.3 Caracterización de los nuevos tipos HPV205, HPV209 y HPV210

El análisis filogenético y la comparación de secuencias del ORF L1 con 181 HPV de referencia confirmaron al HPV205 y al HPV210 como miembros del género Gama PV, con identidades nucleotídicas de 84,8% y de 82,4% con respecto a HPV173 (Gama 1) y a HPV132 (Gama 12), respectivamente. Por su parte, el HPV209 es un nuevo miembro del género Beta PV y comparte 88,1% de identidad nucleotídica en el ORF L1 con HPV107 (Beta 2). En la Tabla 24 se muestran las identidades nucleotídicas de los 3 tipos nuevos con tipos representativos de especies conocidas de los géneros Beta PV y Gama PV cuyas secuencias están disponibles en www.hpvcenter.se.

Tabla 24: Porcentaje de identidad nucleotídica en el ORF L1 de los 3 nuevos tipos de HPV con tipos representativos de las especies de los géneros Beta PV y Gama PV

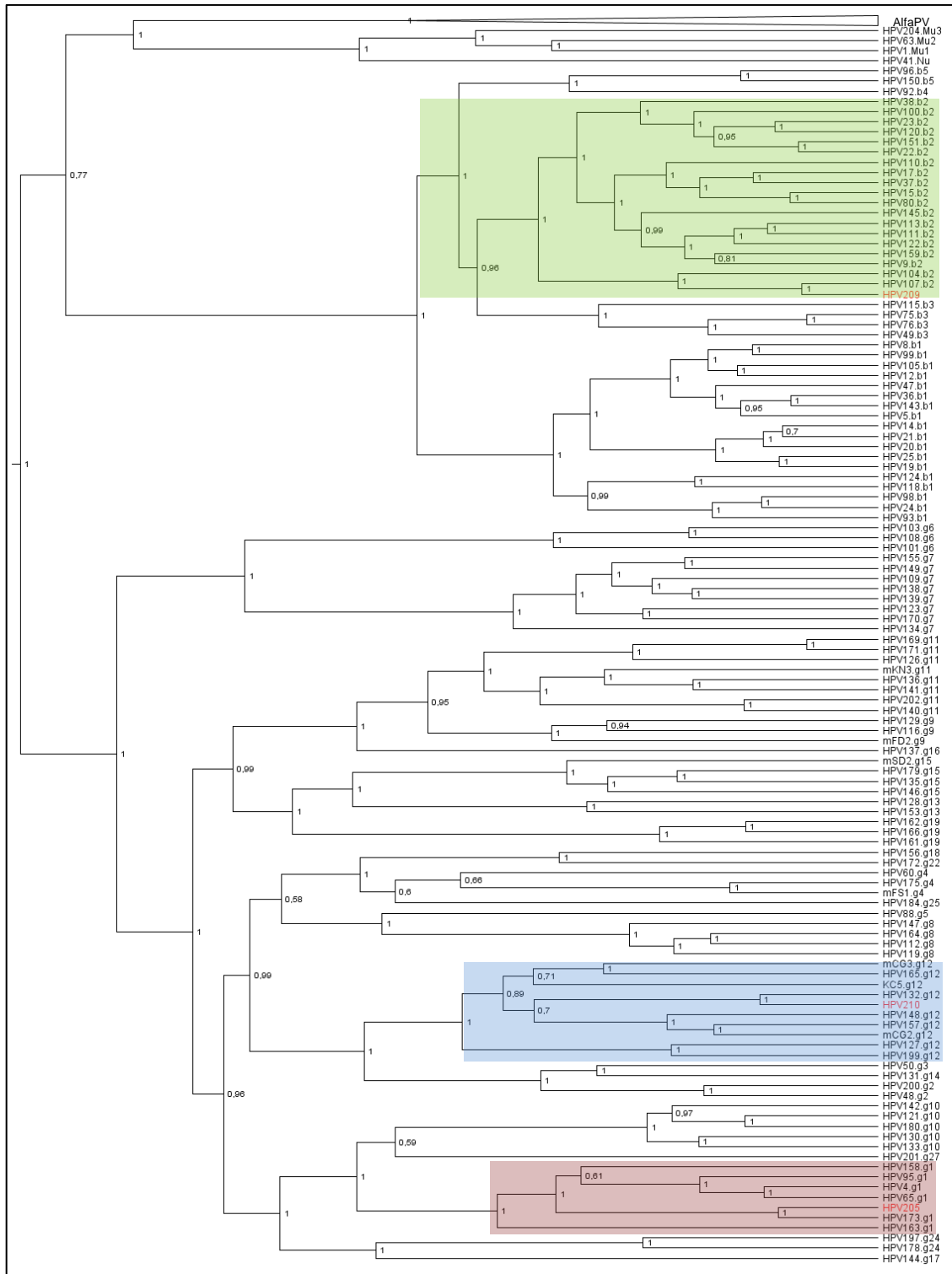
Tipo HPV	Especie HPV	% identidad nucleotídica en el ORF L1		
		HPV209	HPV210	HPV205
HPV5	Beta 1	68,6	58,4	60,7
HPV107	Beta 2	88,1	57,5	57,8
HPV49	Beta 3	71,5	58,8	61,4
HPV92	Beta 4	69,5	57,8	61,6
HPV96	Beta 5	68,2	58,1	58,9
HPV173	Gama 1	58,8	61,9	84,8
HPV200	Gama 2	60,5	65,0	63,9
HPV50	Gama 3	59,7	63,7	63,6
HPV175	Gama 4	58,8	62,1	61,4
HPV88	Gama 5	59,2	62,8	63,8
HPV108	Gama 6	58,7	58,8	60,6
HPV109	Gama 7	60,6	60,4	64,1
HPV112	Gama 8	59,1	62,7	63,3
HPV116	Gama 9	59,3	57,3	60,7
HPV121	Gama 10	61,4	61,1	63,5
HPV126	Gama 11	60,2	60,7	61,8
HPV132	Gama 12	59,2	82,4	62,0
HPV128	Gama 13	58,7	61,6	61,1
HPV131	Gama 14	60,2	65,8	63,1
HPV135	Gama 15	60,4	62,5	63,9
HPV137	Gama 16	58,2	60,3	60,7
HPV144	Gama 17	60,5	63,3	64,0
HPV156	Gama 18	60,6	61,5	63,5
HPV161	Gama 19	61,0	60,7	62,3
HPV163	Gama 20	61,4	63,2	67,5
HPV172	Gama 22	57,5	58,8	59,2
HPV178	Gama 24	61,2	62,4	62,7
HPV184	Gama 25	58,3	63,1	61,0
HPV201	Gama 27	60,3	61,6	66,2

Se resaltan los porcentajes de identidad nucleotídica más (ocre) y menos relacionados (rosa) de los tipos nuevos con HPV de referencia del mismo género.

El análisis filogenético de las secuencias del ORF L1 de los 3 nuevos tipos de HPV caracterizados en este trabajo y de 181 tipos de HPV de referencia se realizó con metodología bayesiana (Figura 24).

Las principales características genómicas de los tres nuevos virus se describen en la Tabla 25. El análisis de los ORF y de comparación de secuencias muestran que los tres virus tienen una organización genómica típica de los HPV y codifican al menos 6 genes: E6, E7, E1, E2, L2 y L1.

Figura 24: Análisis Filogenético de los nuevos HPV caracterizados en este trabajo en relación a 181 tipos de referencia



Los tipos de HPV se indican de la siguiente forma: nombre del virus, letra correspondiente al género (g: gama, b: beta, Mu, Nu), el número de especie. Las ramas de género Alfa PV están colapsadas. Las especies que agrupan los tipos nuevos están sombreadas en color. Los tipos nuevos están resaltados en rojo. Se indican los valores de la probabilidad posterior en cada uno de los nodos.

Como en otros miembros de los géneros Gama PV y Beta PV, la región intergénica entre los genes E2 y L2 es muy corta (HPV205: 20 bp, posiciones 3.632-3.652 nt; HPV EP02: 51 pb, posiciones 3.854-3.940 nt; HPV EP03: 97 pb, posiciones 3.497-3.592 nt) y ninguno de los 3 virus nuevos codifican para el ORF E5. En el HPV EP02 se pudo identificar además un ORF que codifica para la proteína E4, característico de los virus del género Beta PV. Por su parte, tal como otros miembros del género Gama PV, ninguno de los 2 virus caracterizados (HPV205 y HPV210) codifican para la proteína E4. Sin embargo, se identificaron secuencias cortas de 87-118 aminoácidos de longitud (HPV205: posición 3.036-3.392 nt; HPV210 posición: 3.037-3.292 nt) con remanentes de sitios ricos en prolina, característico de la proteína E4.

Además de los ORF mencionados anteriormente, en los genomas de los 3 nuevos virus se observa una región regulatoria no codificante (LCR) en donde se identificaron sitios de unión a E2 [ACC(N)6GGT], proteína viral que controla la replicación y la expresión de los virus (Tabla 25). En esta región, además, se identificaron secuencias típicas TATA box (TATAA), como así también múltiples sitios de unión para factores de transcripción como AP-1, NF-1 y SP-1.

La habilidad de los HPV de inducir la proliferación de los keratinocitos se ha atribuido principalmente a las oncoproteínas E6 y E7 por su habilidad de unirse a proteínas celulares que regulan el ciclo celular, tales como p53 y pRB, respectivamente [49,52]. Una característica distintiva de los HPV oncogénicos es la presencia de sitios de unión a PDZ en el carboxilo terminal de la proteína E6 [198]. Como se observa en la Tabla 25, las proteínas E6 de los 3 virus caracterizados presentan un número variable de dominios putativos de unión a PDZ; sin embargo ninguno de ellos se encuentra en el extremo carboxilo terminal.

Con respecto a las oncoproteínas E7 de los nuevos virus, se identificaron sitios putativos de unión a pRB en HPV209 y HPV210 pero no en HPV205, tal como reportado para los demás miembros de especie Gama 1 [197,199]. Por otro lado, tipos filogenéticamente relacionados al HPV210 (HPV132, HPV148 y HPV157) también contienen sitios putativos de unión a pRB en sus secuencias [197,199].

Por último, el análisis de las secuencias codificantes de la proteína E1 (helicasa ATP-dependiente viral) de los 3 tipos nuevos permitió la identificación de sitios putativos de unión a ATP en las secuencias nucleotídicas correspondientes [200].

Tabla 25: Características genómicas y proteínas putativas de los 3 nuevos HPV caracterizados

Características del genoma	HPV209	HPV210	HPV205	
Longitud del genoma (pb)	7.399	7.134	7.298	
Contenido de GC (%)	40,4	38	37,5	
Género y Especie	Beta 2	Gama 12	Gama 1	
ORFs	E6, E7, E1, E2, E4, L2, L1	E6, E7, E1, E2, L2, L1	E6, E7, E1, E2, L2, L1	
Longitud (pb)	400	462	500	
URR	Posición en el genoma	7.000-7.399 nt	6.671-7.134 nt	6.799-7.298 nt
	TATA box	2	2	2
	Sitio de unión a E2 ACC(N) ₆ GGT	2	4	1
Tamaño de la proteína (aa)	140	139	140	
Posición en el genoma	1-423 nt	1-420 nt	1-423 nt	
E6	Sitio de unión a Zinc CXXC(X) ₂₉ CXXC [†]	2 separados por 36 aa	2 separados por 36 aa	2 separados por 36 aa
	Dominios de unión a PDZ X(T/S)X(L/V) [#]	RTIL (6-10 aa)	FTDV (20-23 aa) KSWL (31-34 aa) LSLL (47-50 aa) QTPL (90-93 aa)	PTGL (6-9 aa) LSLV (47-50 aa) LSAL (66-69 aa)
Tamaño de la proteína (aa)	102	92	97	
E7	Posición en el genoma	420-728 nt	417-695 nt	420-713 nt
	Sitio de unión a Zinc CXXC(X) ₂₉₋₃₀ CXXC [†]	CXXC(X) ₂₉ CXXC	CXXC(X) ₂₉ CXXC	CXXC(X) ₃₀ CXXC
	Sitio de unión a pRB LXCXE [‡]	1	1	Ausente
Tamaño de la proteína (aa)	607	599	603	
E1	Posición en el genoma	715-2538 nt	679-2478 nt	700-2511 nt
	Sitio de unión a ATP GXXXXGK(T/S) [§]	GPPDSGKS	GPSDTGKS	GPPDTGKS
Tamaño de la proteína (aa)	457	363	392	
E2	Posición en el genoma	2,480-3,853 nt	2,405-3,496 nt	2,453-3,631 nt
E4	Tamaño de la proteína (aa)	202	Ausente	Ausente
	Posición en el genoma	3,000-3608 nt		
L2	Tamaño de la proteína (aa)	519	513	527
	Posición en el genoma	3,905-5,464 nt	3,593-5,134 nt	3,653-5,236 nt
L1	Tamaño de la proteína (aa)	507	508	515
	Posición en el genoma	5,476-6,999 nt	5,145-6,671 nt	5,251-6,798 nt

[†]Secuencia consenso de sitio de unión a Zinc [201]; [#] Secuencia consenso de dominio de unión a PDZ [198]; [‡]Secuencia consenso de sitio de unión a pRB [202]; [§]Secuencia consenso de sitio de unión a ATP [200].

URR: Región regulatoria no codificante; aa: aminoácidos; nt: nucleótidos.

4.III.2. Análisis “*in silico*” de posibles eventos de recombinación en el género Gama PV

Como dicho anteriormente, una de las posibles fuerzas evolutivas que podría haber influenciado en la diversidad genética de los PV es la recombinación [20]. Estudios *in silico* realizados en el género Alfa PV han identificado eventos de recombinación con significancia estadística en regiones codificantes de las proteínas tempranas y tardías del genoma viral [152,157]. Teniendo en cuenta que el Gama PV es uno de los géneros más diversos y en rápida expansión de la familia *Papillomaviridae*, nos propusimos explorar la recombinación como posible fuerza evolutiva en este género utilizando herramientas bioinformáticas y una base de datos actualizada de 74 tipos de HPV: 73 virus previamente descritos y el HPV205, uno de los nuevos Gama PV caracterizados en este trabajo. Es necesario aclarar que el HPV210 no fue incluido en la base de datos ya que la completa caracterización del genoma fue posterior a la realización del análisis de recombinación descrito a continuación.

4.III.2.1. Búsqueda de posibles eventos de recombinación en el género Gama PV con el programa RDP4.1

La búsqueda de posibles eventos de recombinación con el programa RDP4.1 [177] se realizó en dos etapas. El primer cribado se realizó en cada ORF individual por separado (E1, E2, L2, L1). En el segundo cribado, el análisis con RDP se realizó aumentando gradualmente el número de ORF y analizándolos en diferentes combinaciones (E1-E2, E1-E2-L2, E1-E2-L1 y E1-E1-L2-L1).

Los potenciales eventos de recombinación identificados en este análisis y que cumplieron con el criterio de inclusión ($p < 0,05$ en al menos 4 métodos de los incluidos en el programa RDP4.1) se muestran en la Tabla 26. En los ORFs individuales analizados, se encontraron posibles eventos que cumplieran con el criterio de inclusión en ORF E2 y ORF L2. En contraste, no se detectó ningún evento en el ORF L1, mientras que en el ORF E1 se encontraron posibles eventos con soporte estadístico con menos de 4 métodos (datos no mostrados), y por lo tanto el ORF E1 no cumplió con el criterio de inclusión establecido.

Con respecto al análisis realizado en los ORF combinados, de todos los eventos que si cumplieron con el criterio de inclusión, sólo 2 persistieron en las diferentes combinaciones de ORF analizadas (Tabla 26, en negrita). El primer evento putativo representa una recombinación inter-especie que se detectó en todos los tipos agrupados en la especie Gama 8, e involucra alrededor de 200 pb en el ORF E1 (región recombinante: 1.045 a 1.253 nt en el alineamiento E1-E2-L2-L1 con respecto al tipo de referencia HPV112). Los parentales menores y mayores serían virus ancestrales que pertenecen a la especie Gama 11 y Gama 24 respectivamente. El segundo evento putativo es una recombinación intra-especie entre miembros de la especie Gama 7. El HPV170 fue identificado

como el tipo recombinante y la región recombinante involucra alrededor de 420 pb en el ORF E1 (1.422 a 1.846 nt en el alineamiento E1-E2-L2-L1); los tipos HPV109 y HPV149 fueron identificados como los virus parentales mayores y menores, respectivamente. Vale la pena aclarar que ambos eventos se indican en relación al alineamiento E1-E2-L2-L1 para facilitar el análisis. Sin embargo, como puede observarse en la Tabla 26, los tipos identificados como recombinantes, así como los parentales mayores y menores de las potenciales recombinaciones intra- e inter-especies, coinciden en las demás combinaciones de ORF, tales como E1-E2, E1-E2-L2 y E1-E2-L1.

Tabla 26: Análisis de posibles eventos de recombinación en el género Gama-PV con el programa RDP4.1

Posible virus recombinante	Especies	Localización sitio de recombinación (virus, N° acceso GenBank)*	ORF	Secuencias parentales		Métodos	p	
				Mayor	Menor			
HPV155	γ -7	3.253 – 3.460 nt (HPV155, JF906559)	E2	HPV149 (γ -7)	HPV109 (γ -7)	GENECONV BootScan MaxChi Chimaera SiScan	3.9×10^{-2} 1.7×10^{-3} 2.6×10^{-5} 3.5×10^{-5} 2.0×10^{-9}	E2 ORF
HPV116 HPV129 mFD2*	γ -9	4.439 – 4.727 nt (HPV116, FJ804072)	L2	HPV199 (γ -12)	UN (γ -1)	RDP BootScan MaxChi Chimaera SiScan	2.2×10^{-4} 1.0×10^{-3} 4.6×10^{-4} 4.1×10^{-3} 4.8×10^{-5}	L2 ORF
HPV136 HPV168 HPV171 mKN3* HPV126	γ -11							
HPV112 HPV147 HPV164 HPV168 HPV176	γ -8	1.045 – 1.244 nt (HPV112, EU541442)	E1	mFD1* (γ -24)	HPV140 (γ -11)	RDP GENECONV BootScan MaxChi Chimaera SiScan	8.4×10^{-4} 7.8×10^{-3} 3.9×10^{-3} 2.2×10^{-2} 1.1×10^{-2} 3.6×10^{-2}	E1-E2 ORF
HPV178 HPV197 mFD1* mKN1*	γ -24	746 - 929 nt (HPV178, KJ130020)	E1	HPV140 (γ -11)	mSD2* (γ -15)	RDP GENECONV BootScan SiScan	4.0×10^{-3} 2.6×10^{-2} 2.2×10^{-2} 1.5×10^{-4}	
HPV170	γ -7	1.430 – 1.846 nt (HPV170, JX413110)	E1	HPV109 (γ -7)	HPV149 (γ -7)	RDP BootScan MaxChi Chimaera SiScan	2.3×10^{-6} 1.6×10^{-4} 2.9×10^{-2} 3.3×10^{-2} 2.7×10^{-5}	E1-E2 ORF
HPV127 HPV132 HPV148 HPV157 HPV165 HPV199 mCG2* mCG3*	γ -12	2.442 – 2.589 nt (HPV127, HM011570)	E1	HPV141 (γ -11)	HPV119 (γ -8)	RDP BootScan MaxChi Chimaera SiScan	2.3×10^{-4} 1.7×10^{-2} 8.8×10^{-3} 2.8×10^{-2} 5.5×10^{-4}	
HPV112 HPV147 HPV164 HPV168 HPV176	γ -8	1.045 – 1.253 nt (HPV112, EU541442)	E1	mFD1* (γ -24)	HPV140 (γ -11)	RDP GENECONV BootScan MaxChi SiScan	2.0×10^{-4} 4.5×10^{-3} 1.4×10^{-3} 2.2×10^{-2} 1.2×10^{-3}	E1-E2-L2 ORF
HPV88	γ -5							

Posible virus recombinante	Especies	Localización sitio de recombinación (virus, N° acceso GenBank) [#]	ORF	Secuencias parentales		Métodos	p
				Mayor	Menor		
HPV116 HPV129 mFD2* mKN3*	γ-9	4.447 – 4.656 nt (HPV116, FJ804072)	L2	HPV199 (γ-12)	UN (γ-10)	RDP BootScan MaxChi SiScan	5.8x10 ⁻³ 2.4x10 ⁻² 7.3x10 ⁻³ 1.2x10 ⁻²
HPV170	γ-7	1.430 – 1.855 nt (HPV170, JX413110)	E1	HPV109 (γ-7)	HPV149 (γ-7)	RDP BootScan MaxChi Chimaera SiScan	1.3x10⁻⁶ 1.9x10⁻⁴ 4.5x10⁻² 5.0x10⁻² 2.1x10⁻⁵
HPV155	γ-7	3.253 – 3.460 nt (HPV155, JF906559)	E2	HPV149 (γ-7)	HPV109 (γ-78)	BootScan MaxChi Chimaera SiScan	3.7x10 ⁻² 7.9x10 ⁻⁵ 1.0x10 ⁻⁴ 3.2x10 ⁻⁸
HPV156 HPV172 HPV175 mFi884	γ-18 γ-22 γ-23 γ-UN	3.817 – 4.134 nt (HPV156, JX429973)	L2	HPV205 (γ-1)	UN (γ-7)	RDP GENECONV BootScan MaxChi Chimaera SiScan	4.5x10 ⁻⁵ 5.8x10 ⁻⁴ 1.7x10 ⁻⁵ 2.5x10 ⁻² 5.8x10 ⁻³ 5.3x10 ⁻⁶
HPV112 HPV147 HPV164 HPV168 HPV176	γ-8	1.045 – 1.238 nt (HPV112, EU541442)	E1	mFD1* (γ-24)	HPV140 (γ-11)	RDP GENECONV BootScan MaxChi SiScan	1.1x10⁻³ 1.3x10⁻² 3.3x10⁻⁴ 2.1x10⁻² 6.8x10⁻³
HPV112 HPV147 HPV164 HPV168 HPV176	γ-8	2.597 – 2.787 nt (HPV112, EU541442)	E1/E2	HPV141 (γ-11)	HPV119 (γ-8)	GENECONV BootScan MaxChi Chimaera SiScan	3.2x10 ⁻⁵ 2.8x10 ⁻² 2.3x10 ⁻² 1.8x10 ⁻³ 2.4x10 ⁻⁴
HPV170	γ-7	1.420 – 1.848 nt (HPV170, JX413110)	E1	HPV109 (γ-7)	HPV149 (γ-7)	RDP BootScan MaxChi Chimaera SiScan	2.4x10⁻⁶ 2.7x10⁻⁴ 9.3x10⁻³ 4.9x10⁻² 6.3x10⁻⁵
HPV112 HPV147 HPV164 HPV168 HPV176	γ-8	1.045 – 1.253 nt (HPV112, EU541442)	E1	mFD1* (γ-24)	HPV140 (γ-11)	RDP GENECONV BootScan MaxChi SiScan	3.8x10⁻⁴ 8.1x10⁻³ 1.6x10⁻³ 3.0x10⁻² 1.3x10⁻²
HPV109 HPV123 HPV134 HPV138 HPV139 HPV149 HPV155 HPV170	γ-7	5.072 – 5.445 nt (HPV170, JX413110)	L2	HPV119 (γ-8)	HPV173 (γ-1)	RDP GENECONV BootScan MaxChi Chimaera SiScan	1.8x10 ⁻⁴ 1.5x10 ⁻³ 6.5x10 ⁻³ 3.8x10 ⁻³ 6.4x10 ⁻⁴ 9.5x10 ⁻⁶
HPV170	γ-7	1.422 – 1.846 nt (HPV170, JX413110)	E1	HPV109 (γ-7)	HPV149 (γ-7)	RDP BootScan MaxChi Chimaera SiScan	1.5x10⁻⁶ 1.9x10⁻⁴ 1.7x10⁻² 3.5x10⁻² 1.2x10⁻⁴

E1-E2-L1 ORF

E1-E2-L2-L1 ORF

Se detallan los eventos de recombinación que cumplen con los criterios de inclusión (un mínimo de 4 métodos con $p < 0.05$). Los eventos que persistieron en las diferentes combinaciones de ORF se resaltan en negrita.

[#]Secuencias de referencia utilizadas para posicionar el sitio de recombinación.

*Tipo putativo de HPV sin denominación oficial.

nt: nucleótido

UN: Tipo desconocido aunque filogenéticamente relacionado con la respectiva especie de HPV

4.III.2.2. Análisis de incongruencia filogenética.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el tamizaje exploratorio realizado con el programa RDP4.1, se generaron árboles filogenéticos con diferentes partes del alineamiento E1-E2-L2-L1 a fin de visualizar potenciales incongruencias filogenéticas.

Para analizar el posible evento de recombinación inter-especie que daría origen a la especie Gama 8, se construyeron árboles con metodología bayesiana utilizando la región recombinante de 200 pb (Figura 25, izquierda) y el resto del alineamiento (alineamiento concatenado E1-E2-L2-L1 sin la región recombinante) (Figura 25, derecha). Como se puede observar en el árbol de la izquierda, la especie recombinante Gama 8 se agrupa con la especie que contiene al parental menor (Gama 11), mientras que en el árbol de la derecha la especie Gama-8 se aproxima a la especie que contiene al parental mayor (Gama 24).

Tal como esperado, se obtuvieron resultados similares cuando se realizó el mismo análisis para examinar el soporte filogenético en el potencial evento de recombinación intra-especie dentro de la especie Gama 7 (Figura 26). En el árbol construido con la región recombinante de 420 pb (Figura 26, izquierda) se observa que el posible tipo recombinante (HPV170) se agrupa con el parental menor (HPV149), mientras que en el árbol construido con el resto del alineamiento (alineamiento concatenado E1-E2-L2-L1 sin la región recombinante) (Figura 26, derecha), el HPV170 se acerca al parental mayor (HPV109).

Curiosamente, se identificó un interesante movimiento de ramas dentro de la especie Gama 9 que agrupa a los tipos de referencia HPV116 y HPV129 y al virus mFD2, caracterizado por metagenómica, (Figura 25). Esta especie forma un típico clado monofilético que se observa en los árboles construidos sin la región recombinante (Figura 25, derecha). Por el contrario, el HPV129 cambia drásticamente su topología y se agrupa con el HPV175 (Gama 23) en el árbol construido con la región recombinante (Figura 25, izquierda). Sin embargo, este evento no fue detectado por ninguno de los métodos incluidos en el programa RDP4.1.

Los resultados expuestos en este capítulo, por un lado, muestran la caracterización de 3 nuevos tipos de HPV identificados en piel sana expuesta al sol de individuos inmunocompetentes de nuestra región pertenecientes a diferentes géneros y especies: HPV205 (Gama 1), HPV210 (Gama 12) y HPV209 (Beta 2). Por otro lado, se aportan evidencias sobre 2 posibles eventos de recombinación entre virus del género Gama PV: un evento inter-especie que podría haber dado origen a una especie (Gama 8), y un evento intra-especie que podría haber originado un tipo (HPV170). Estos aportes, en conjunto, contribuyen a completar la taxonomía de la familia *Papillomaviridae* y la filogenia, y proveen nuevas evidencias para comprender mejor la historia evolutiva del género Gama PV.

5. Discusión

Los tipos de HPV mucosotrópicos asociados al desarrollo del cáncer anogenital y sus lesiones precursoras han sido definidos. La aplicación masiva de las vacunas contra HPV tiene como objetivo prevenir el desarrollo de patologías asociadas a la infección de ciertos tipos de HPV AR. Con la aprobación de la vacuna nonavalente el riesgo de adquirir la infección y posteriormente el desarrollo de lesiones producidas por estos virus en epitelios mucosos se reduciría un 90% [92]. En el enunciado emitido en 2014 sobre su posición acerca de la vacunación masiva contra HPV, la OMS recomienda que la vacuna debe introducirse como parte de una estrategia integral coordinada para prevenir el cáncer cérvico-uterino y otras enfermedades relacionadas con el virus, y que estas acciones no deben menoscabar ni desviar el financiamiento del desarrollo ni del mantenimiento de programas eficaces de tamizaje de cáncer cérvico-uterino [203]. Los métodos moleculares de identificación y detección de HPV son un componente esencial tanto en el desarrollo como en la evaluación de vacunas contra HPV y también en la implementación y monitoreo de los programas de vacunación masivos [103]. Los ensayos de genotipificación utilizados actualmente difieren en sus aptitudes analíticas con respecto a la sensibilidad tipo específica y la especificidad. Numerosos estudios han comparado diferentes ensayos de tipificación de HPV para evaluar su aptitudes en tamizajes y estudios epidemiológicos utilizando muestras clínicas [204-206]. Sin embargo, las evaluaciones de la aptitud de un ensayo en diferentes laboratorios necesitan ser realizados de manera estandarizada, así los resultados pueden ser comparados en el tiempo con un estándar conocido y aceptado [103]. Con este objetivo, la OMS a través del *HPV LabNet* provee paneles a los laboratorios externos con muestras conteniendo plásmidos de 16 tipos mucosos de HPV en diferentes concentraciones calibradas según estándares internacionales [207].

Nuestro laboratorio viene participando de este estudio de competencia desde 2008 con el fin de evaluar la aptitud del ensayo L1HPVPCR 16.4. Este ensayo está basado en la amplificación con los cebadores MY11/09 [165], seguido de detección con sondas y revelado colorimétrico en formato de EIA. Los cebadores MY11/09 son ampliamente utilizados en todo el mundo para la amplificación de HPV mucosotrópicos y se han descrito distintos formatos de amplificación y detección, tales como PCR seguido de Enzima Inmuno Ensayo [168,208], PCR anidada [209] y PCR seguido de RFLP [210].

Basándonos en el criterio establecido por la *WHO HPV LabNet* (detección de 50 UI de HPV16 y HPV 18 y 500 GE de los otros 13 tipos en muestras simples y múltiples) observamos que el desempeño del sistema L1HPVPCR 16.1 era sub-óptimo para amplificar e identificar los tipos HPV18 y HPV45. En base a esto optimizamos el sistema con el agregado de cebadores específicos para ambos tipos. La nueva versión del sistema (L1HPVPCR 16.4.1) logró detectar 5 UI de HPV16, 5 UI de HPV18 y 50 GE de HPV45. Cabe destacar que el sistema L1HPVPCR 16.4.1 resultó ser

competente para la identificación de 15 tipos mucosos de HPV en los paneles de la *WHO HPV LabNet* de los años 2013 y 2014.

Teniendo en cuenta que los ensayos de competencia son particularmente útiles para estimular un proceso de aprendizaje para mejorar los desempeños de los métodos de identificación de HPV en los laboratorios participantes [103], a través de los años en que nuestro laboratorio viene participando, hemos mejorado el sistema L1HPVPCR obteniendo una sensibilidad de hasta 5 UI/5 μ l de los dos tipos más frecuentemente asociados a lesiones (HPV16 y HPV18) y 50 GE/5 μ l de otros 13 tipos mucosos altamente prevalentes. Por otro lado, este estudio fue diseñado para evaluar el desempeño de los métodos de tipificación de HPV utilizados en vacunología y programas de vigilancia virológica, en donde una alta sensibilidad analítica es requerida. En este sentido el ensayo L1HPVPCR 16.4.1 ha logrado cumplimentar con este tipo de exigencias siendo un método eficaz y competente para utilizarse en el análisis de muestras clínicas para estudios epidemiológicos.

Los datos aportados por estos estudios en todo el mundo son los que han sido utilizados como base para el desarrollo de las 3 vacunas contra HPV y forman (o formarán en el caso de la vacuna nonavalente) parte de programas de vacunación masivos. Según estos estudios las prevalencias más altas de infección por HPV en la población general se encuentran en los países en vías de desarrollo. Particularmente, Sudamérica tiene una prevalencia del 13.2% y en Argentina, se han reportado prevalencias cercanas al 20% [95].

Las estimaciones realizadas en nuestro país provienen de 2 estudios con prevalencias muy diferentes entre sí [98,211]. Basados en esta problemática y con el fin de aportar mayor información sobre la prevalencia de HPV en otras áreas de Argentina nuestro grupo de trabajo llevó a cabo un estudio transversal durante los años 2008 y 2010 para evaluar la prevalencia general y tipo-específica de HPV en mujeres no vacunadas que concurrieron a 2 hospitales públicos situados en regiones altamente pobladas de la Argentina (Santa Fe y Buenos Aires) por control ginecológico de rutina [99]. Utilizando los sistemas L1HPVPCR 16.1 y CUT se encontró una mayor prevalencia de HPV en Buenos Aires (53,8%) en comparación con Santa Fe (41,2%). La misma tendencia se encontró en las prevalencias observadas de tipos AR y BR, e infecciones múltiples. Estos resultados confirman la heterogeneidad de las infecciones de HPV a través del país y son consistentes con las variaciones entre diferentes regiones reportadas en otras partes del mundo [212,213] por lo que es importante tener información sobre los tipos de HPV que circulan en poblaciones de diferentes regiones para evaluar el impacto de la vacuna.

Por otro lado, los datos sobre los tipos de HPV más frecuentemente asociados al desarrollo de lesiones cervicales de alto grado dan idea acerca de los tipos asociados a este tipo de lesiones para evaluar el futuro impacto de la vacunación y de los programas de tamizaje, como así también para

establecer una adecuada vigilancia epidemiológica [97]. En nuestro país se han realizado estudios de prevalencia destinados a conocer los tipos de HPV asociados a lesiones de alto grado en diferentes provincias pero ninguno de ellos en la provincia de Santa Fe [101,102,214,215].

Teniendo en cuenta esto, quisimos conocer las características de la infección por HPV en una población de mujeres con diagnóstico de patología cervical de nuestra región (Sección 4.I.2.1 y Figura 16). En primer lugar determinamos la prevalencia de infección por HPV en 115 mujeres y comparamos el desempeño de 2 sistemas de tipificación para analizar las muestras clínicas: L1HPVPCR 16.4.1 y CUT. El hecho de utilizar dos sistemas de tamizaje para identificar tipos de HPV en cérvix se basó en observaciones previas donde se pudo establecer que la epidemiología de HPV es compleja y requiere de varias estrategias de amplificación y de detección que permitan cubrir todos los tipos involucrados [99]. Como dicho anteriormente el sistema L1HPVPCR 16.4.1 permite la tipificación de 15 tipos de HPV mucosotrópicos y fue considerado como competente por la *WHO HPV LabNet*. Por su parte el sistema CUT se basa en una técnica de amplificación altamente sensible llamada “PCR de la gota colgante” seguido de electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La identificación de los tipos de HPV se realiza mediante secuenciación directa de los productos amplificados [138].

El análisis de las muestras de cepillado cervical de las mujeres incluidas en nuestro estudio con los dos sistemas de cebadores permitió obtener una prevalencia de infección del 85% (Tabla 8). Este resultado concuerda con los estimaciones realizadas en estudios de meta-análisis sobre la prevalencia de HPV en poblaciones de mujeres con lesiones cervicales en las cuales la mayoría de ellas estaba infectada con HPV [97,136]. El sistema L1HPVPCR 16.4.1 logró identificar la presencia de HPV con mayor frecuencia que el sistema CUT (69% vs 60%). La concordancia general entre ambos métodos fue del 58% y la concordancia tipo-específica en detectar al menos un tipo de HPV en común fue del 30% entre las mujeres positivas por ambos métodos (Tabla 8). Esto confirma los resultados previos respecto a que ambos sistemas se complementan entre sí, y gracias a la distinta especificidad es posible determinar con mayor precisión los tipos de HPV que infectan a la población en estudio (Tabla 9).

En cuanto a la capacidad de detectar tipos de diferentes especies observamos que los cebadores CUT identificaron 30 tipos de HPV diferentes (17 tipos AR, 12 tipos BR y un Gama PV) distribuidos en 8 de las 13 especies conocidas de Alfa PV. En cambio el L1HPVPCR16.4.1 detectó los 15 tipos para los cuales se cuenta con sondas tipo-específicas (Tabla 9). Cabe destacar que el sistema CUT tuvo mejor desempeño en identificar mayor número de especies debido a que los productos de amplificación son secuenciados, permitiendo la identificación de cualquier tipo de HPV.

Respecto a la prevalencia tipo-específica determinamos que el tipo más prevalente en esta población fue el HPV16 (25%) seguido de los tipos HPV31 (13%) y HPV33 (7%) (Tabla 9). Estudios de meta-análisis han reportado que el HPV16 es el tipo más prevalente a nivel global tanto en mujeres con citología normal [213] que en mujeres con patologías cervicales [136]. Particularmente para nuestra región se ha estimado que los tipos más frecuentes de HPV asociados a lesiones de alto grado son el HPV16, HPV18, HPV58 y HPV31 [97] y en Argentina en particular, el HPV16 ha sido identificado con mayor frecuencia en las poblaciones estudiadas [101,102,215] por lo que nuestros resultados están en línea con estas observaciones.

La mayoría de los tipos virales identificados en esta población de mujeres (Tabla 11) fueron tipos AR (77,4%), y dentro de ellos, los 5 tipos considerados como más carcinogénicos fueron los más prevalentes (60,9%). La prevalencia de infección y la distribución de tipos virales varió de acuerdo al grado de lesión de la mujer, en línea con otros estudios [96,136]. Cuando se analizó su presencia de acuerdo a las categorías citológicas observamos que los tipos AR estaban asociados más frecuentemente a lesiones H-SIL (84,4%), disminuyendo su prevalencia en las categorías L-SIL (79,2%), ASCUS (68,4%) y Negativo (63,6%). Al igual que para los tipos de AR la frecuencia general de infección por HPV aumentó significativamente con la severidad de la lesión ($p=0,047$) (H-SIL, L-SIL, ASCUS y Negativo) (Tabla 11), en línea con con otros estudios epidemiológicos en donde tanto la prevalencia de la infección general como la de tipos AR aumenta con el grado de las lesiones [136,216].

Los tipos HPV16 y HPV31 fueron los más frecuentemente identificados en las categorías ASC-US, L-SIL y H-SIL (Tabla 11). Los datos de prevalencia de tipos según el tipo de lesión reportados por la OMS son consistentes con nuestros resultados [78] donde se estimó que los dos tipos más frecuentemente identificados en lesiones H-SIL son HPV16 y HPV31.

El riesgo de adquirir la infección por algún tipo de HPV esta relacionado con el comportamiento sexual en combinación con otros co-factores [217], sin embargo en nuestra población la edad de inicio de relaciones sexuales no estuvo relacionada con una mayor prevalencia de HPV. La mayor frecuencia de infección se observó en mujeres menores a 30 años y la menor prevalencia se determinó en la última categoría etaria (40-53 años) (Tabla 10), en línea con otros reportes que indican que la prevalencia de la infección disminuye a medida que aumenta la edad de las mujeres [78,217]. Las diferencias en la frecuencia de infección entre los estratos etarios fueron estadísticamente significativos ($p=0,034$).

En cuanto a los co-factores relacionados al desarrollo de cáncer cervical (número de partos, métodos anticonceptivos hormonales, hábito de fumar y antecedentes de ITS) ninguno estuvo relacionado con la frecuencia de infección por HPV en este grupo de mujeres. El hábito de fumar

tabaco ha sido implicado como co-factor con el HPV en el desarrollo de lesiones CIN III y cáncer cervical [218,219], pero no se ha establecido claramente que represente un riesgo para la adquisición de la infección por HPV

Los datos provenientes de la WHO/ICO y de estudios epidemiológicos indican que las mujeres que utilizan anticonceptivos hormonales son más propensas a adquirir una infección por HPV en comparación con aquellas que utilizan preservativos como método anticonceptivo [217]. En nuestro estudio, encontramos mayores prevalencias de HPV en mujeres que utilizaban preservativos respecto a aquellas que utilizan anticonceptivos hormonales. Si bien este resultado fue inesperado, el grupo de mujeres que declararon usar preservativo en sus relaciones sexuales estaba también relacionado a edades jóvenes, donde la prevalencia de infección es mayor (datos no mostrados). Por otro lado, no está del todo claro que el uso de preservativos prevenga completamente la transmisión de la infección por HPV, y probablemente dependa de si es o no utilizado consistentemente [220,221]. En nuestro estudio no se indagó a las mujeres en cuanto a si los preservativos eran utilizados en todas las ocasiones, frecuentemente o en algunas ocasiones.

Un estudio de meta-análisis en donde se analizaron 25 estudios epidemiológicos ha relacionado el número de partos con el riesgo de adquirir lesiones cervicales de alto grado [222]. Las mujeres con 7 o más embarazos a término tendrían mayor riesgo a desarrollar cáncer cervical que aquellas que tuvieron 1 o 2 partos. Además el mismo estudio determinó que el riesgo de adquirir un tipo de HPV AR aumenta en mujeres que hayan tenido al menos un parto [222]. En nuestro estudio la tendencia fue contraria a lo reportado, es decir, mujeres con más de 5 partos tuvieron menor prevalencia de infección por HPV respecto a las que tuvieron menos paridad. Este resultado puede explicarse con el hecho que el menor número de partos esta relacionado a edades jóvenes, y al contrario, una mayor paridad esta relacionado con edades mayores (datos no mostrados).

La asociación entre infecciones múltiples y el desarrollo de patologías cervicales ha sido reportada por algunos autores que sugieren que los virus presentes en este tipo de infecciones actúan de forma sinérgica en el desarrollo de cáncer cervical [223]. En contraste, otros autores postulan que un genotipo sería el responsable de esa lesión no obstante varios tipos HPV estén involucrados en la infección del mismo sitio anatómico [224,225]. En nuestro estudio observamos una menor proporción de infecciones múltiples en mujeres con citología H-SIL con respecto a que tenían citología L-SIL o ASC-US (34,4% vs. 43,4% y 42,1%, respectivamente) (Tabla 11), en línea con otros reportes [72]. Si bien las asociaciones que se establecen entre los distintos tipos de HPV que infectan un tejido al mismo tiempo es aún desconocida, éstos fenómenos podrían afectar el impacto de la vacuna en la población. En particular, el fenómeno de “asociación negativa” entre tipos podría producirse cuando la infección con un dado tipo de HPV inhibiera la adquisición o persistencia de

otro [226]. Este fenómeno podría implicar un “reemplazo de tipos”, trayendo como consecuencia el incremento de la prevalencia de los tipos no incluidos en la vacuna cuando los tipos incluidos se reduzcan o eliminen por su aplicación masiva [227]. Hay que tener en cuenta que, cualquier asociación entre tipos de HPV estaría afectada por la combinación de la exposición a HPV y de la distribución de tipos, y por lo tanto con las características inmunológicas y el comportamiento de los individuos [61,226,228]. En este punto, ciertos autores proponen que debido a la alta protección otorgada por la vacuna contra los virus blanco y contra otros tipos AR filogenéticamente relacionados con los incluidos en la vacuna [186] y la baja tasa de evolución de los HPV, es poco probable que ocurra un reemplazo de tipos a corto plazo [229,230]. Esto refuerza la necesidad de realizar estudios de vigilancia epidemiológica para comparar los tipos de HPV asociados a lesiones cervicales en poblaciones de mujeres no vacunadas y vacunadas para conocer a largo plazo el impacto de la vacuna en la población general. La información resultante permitirá definir si el reemplazo de tipos ocurrirá efectivamente y en ese contexto será necesario considerar nuevas formulaciones en las futuras vacunas multivalentes [229].

Teniendo en cuenta estas consideraciones, analizamos la persistencia de la infección por HPV en 68 mujeres con diagnóstico de patología cervical con el fin de analizar la evolución clínica y virológica en esta población. De acuerdo al protocolo de tratamiento de mujeres con lesiones cervicales del Servicio de Ginecología del HEEP, aquellas con diagnóstico de L-SIL y AS-CUS reciben un tratamiento expectante (n : 45) y las mujeres con citología H-SIL reciben un tratamiento quirúrgico (n : 23). Es necesario considerar que las mujeres con citología normal con tratamiento expectante tenían antecedentes de patología cervical y al momento de ser incluidas en el estudio se encontraban en seguimiento ginecológico.

Los estudios longitudinales que han analizado la historia natural de la infección por HPV reportan que alrededor de un 70-90% de las pacientes infectadas con HPV eliminarán el virus dentro de los 12-24 meses de contraída la infección [71,83,231]. En nuestro estudio las pacientes que recibieron tratamiento expectante (n : 45) representan la evolución natural del virus. Este tipo de tratamiento evita agredir el cuello del útero y afectar la fertilidad por lo que está recomendado en mujeres con lesiones de bajo grado [82]. En este grupo de mujeres se pudo determinar (Tabla 13) que sólo el 29% (13/45) fue negativa para ADN de HPV al final de seguimiento (regresión), lo cual es un porcentaje mucho menor al definido previamente [71,83,231]. Sin embargo, es necesario considerar que otro 29% (13/45) mostró infecciones con tipos diferentes a los identificados al ingreso del estudio (reinfección), por lo que se puede inferir que 58% (26/45) de las mujeres de este grupo pudo eliminar la infección inicial. Si bien nuestro estudio presenta limitaciones en cuanto a que fue realizado en un hospital público y tuvo una adherencia dispar de las participantes al protocolo que

redundó en sesgos de seguimiento, consideramos que esta información es relevante para el manejo de mujeres con lesiones cervicales de bajo grado de nuestra región.

Si bien la proporción de mujeres con tratamiento expectante que tuvieron infecciones persistentes (Tabla 12) fue del 38% (17/45), la mayoría de las mujeres incluidas en este grupo tuvo una evolución clínica favorable [71% (32/45), Tabla 13: NILM + Regresión]. Por otro lado, sólo el 4% (2/45) progresó a lesiones H-SIL al final del estudio, en coincidencia con lo reportado por otros estudios que indican que una pequeña proporción de las mujeres con lesiones de bajo grado progresa a lesiones de alto grado [72,231]. Respecto a las mujeres que progresaron a lesiones de alto grado al final del estudio, una de ellas tenía una infección persistente con HPV16, coincidiendo con numerosos estudios donde se ha determinado que este tipo de infecciones están más asociadas al desarrollo de lesiones CIN III/H-SIL en comparación a otros tipos AR [72,96,116,189].

El análisis de la evolución clínica y virológica en las mujeres que recibieron tratamiento expectante no permitió establecer una relación concreta como observada en otros estudios, en donde la eliminación de la infección coincide con una evolución clínica favorable [69,189]. En efecto, 62% (28/45) de ellas tuvieron una evolución clínica favorable (Tabla 13), aunque sólo en 61% (17/28) no se detectó la presencia del mismo tipo de HPV que al inicio del seguimiento, ya sea por regresión de la infección o reinfección.

La remoción o escisión de la lesión está recomendada solamente en mujeres con lesiones de alto grado y que puedan progresar a cáncer cervical. El tratamiento quirúrgico fue aplicado en 23 de las 68 mujeres incluidas en el estudio longitudinal por presentar estas características. Todas ellas lograron evolucionar clínicamente favorable y la categoría citológica al final del seguimiento fue de menor grado que la del inicio (Tabla 12). En relación a la evolución virológica, alrededor de la mitad de las mujeres fueron negativas para ADN de HPV al final del tratamiento (11/23, 48%), y 35% (8/23) de ellas no fue posible identificar el mismo tipo de HPV que al inicio (reinfeksi3n). Por lo tanto, 83% (19/23) de estas pacientes logró eliminar la infecci3n responsable del desarrollo de la lesi3n, coincidiendo con la evoluci3n clínic3 (Tabla 14).

Otros estudios han demostrado que un 5-25% de las mujeres que son tratadas quirúrgicamente pueden volver a desarrollar lesiones L-SIL o de mayor grado y que este riesgo está asociado a las infecciones con tipos de AR, sobre todo al HPV16 [116,232,233]. En nuestro estudio, un 17% (4/23) de las mujeres que recibieron tratamiento quirúrgico tuvieron infecciones persistentes con al menos un tipo de HPV AR. El análisis del seguimiento post-quirúrgico de estas mujeres determinó que una de ellas presentó una lesi3n de tipo L-SIL al final del mismo, coincidiendo con otros estudios [116]. En las otras 3 mujeres (13%) no se observó desarrollo de lesiones de ningún tipo y tuvieron citologías negativas al final del tiempo de seguimiento. Este resultado está en línea con

otros trabajos en donde se reportó que un 11-17% de las mujeres en las que se ha removido satisfactoriamente de la lesión no logran eliminar la infección persistente [116,234]. Esta condición ha sido propuesta como un factor predictivo positivo en la recurrencia de lesiones cervicales luego de una cirugía [234]. En este sentido el seguimiento post-quirúrgico mediante la identificación molecular de tipos de HPV AR es fundamental para controlar este tipo de pacientes [116].

El análisis de las muestras con los sistemas L1HPVPCR 16.4.1 y CUT determinó que los dos tipos de HPV que más prevalecen y persisten en mujeres con lesiones cervicales son el HPV16 y HPV31 (Tabla 12). Este resultado era el esperado, ya que los tipos más persistentes tienden a ser los más comunes en una población [235]. Diversos estudios han demostrado que el HPV16 tiene mayor capacidad para persistir respecto a cualquier otro tipo de HPV [96,106,115,236], asociado o no a la progresión de lesiones malignas [72,116]. Por otro lado, un estudio de meta-análisis determinó que los tipos AR que tienen un tiempo medio de persistencia significativamente mayor respecto a otros tipos son HPV16, HPV31, HPV33, HPV52 [115]. Además los tipos HPV31, HPV33 y HPV58 conferirían un riesgo significativamente mayor de desarrollar una lesión CIN III comparado con otros tipos AR, excepto HPV16 [96]. Todas estas observaciones coinciden con los datos aportados por nuestro estudio.

El conocimiento acerca de los tipos de HPV que prevalecen y persisten en una población de mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical de la provincia de Santa Fe aporta datos importantes sobre el posible efecto que tendrá la vacunación masiva en nuestro país. Este tipo de estudio es el primero que se ha llevado a cabo en nuestra provincia y confirma las diferencias geográficas que existen en cuanto a los tipos de HPV que circulan en las poblaciones [213].

Uno de los tipos más prevalentes y persistentes que se ha identificado en la población de estudio es el HPV16, el cual está incluido en la vacuna cuadrivalente actualmente utilizada en Argentina (Gardasil). Sin embargo, si bien se ha reportado protección cruzada de la vacuna cuadrivalente con tipos filogenéticamente relacionados con HPV16 y HPV18 (HPV31 y HPV45, respectivamente) no se ha observado una reducción significativa en lesiones cervicales asociadas a estos tipos virales [237]. En este sentido es importante continuar con la vigilancia epidemiológica a nivel molecular de las poblaciones de mujeres vacunadas y no vacunadas para evaluar qué tipos de HPV efectivamente son eliminados con la introducción de la vacuna y si este nicho ecológico eventualmente puede ser reemplazado por otros tipos AR no incluidos en la vacuna [229].

Una de las características de las infecciones por HPV que aún no es del todo comprendida es el tropismo de los distintos tipos de HPV por epitelios mucosos y cutáneos. En general se pensaba que algunas especies del género Alfa PV eran los únicos capaces de infectar epitelios mucosos. Sin embargo, en la última década se ha evidenciado la presencia de tipos pertenecientes a los géneros

Gama y Beta PV en estos epitelios [31,147]. Estos hallazgos están relacionados en gran parte con el desarrollo de técnicas de identificación molecular genéricas y sensibles que permitieron explorar con mayor profundidad que tipo de relaciones establecen los HPV con los tejidos [130,149,238]. Como dicho anteriormente, las muestras de cepillado cervical de las mujeres incluidas en los estudios de prevalencia y persistencia fueron analizadas con el sistema CUT. Estos cebadores tienen gran sensibilidad para amplificar tipos de HPV de los géneros Alfa, Beta y Gama PV [138] por lo que resultó una herramienta interesante para evaluar la presencia de otros tipos de HPV en cérvix, además de los Alfa PV.

Efectivamente el análisis de las muestras con los cebadores CUT permitió detectar un tipo putativo de la especie Gama 10 (GC12_03) que ha sido identificado previamente en epitelios cutáneos tanto en lesiones como formando parte de la flora normal de la piel [138]. En este estudio, el tipo GC12_03 fue identificado en una muestra de una paciente con citología ASC-US presentando además un co-infección con el HPV18. Interesantemente, este tipo putativo también había sido identificado previamente en una muestra de cepillado cervical de una mujer con citología normal incluida en un estudio de prevalencia realizado en nuestro laboratorio [99]. Otros estudios han reportado la presencia de tipos del género Gama PV en múltiples sitios anatómicos como cavidad oral y nasal [147,239], en piel sana o en lesiones cutáneas [135,196] y también en cérvix [31,32,41]. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado establecer una relación entre la presencia de estos tipos virales con el desarrollo de una lesión. En nuestro estudio, el tipo GC12_03 podría ser parte de la flora normal del tejido y probablemente el HPV18 fue el responsable del desarrollo de la lesión. Para profundizar en el tema, el genoma completo de este tipo putativo del género Gama PV debería ser completamente caracterizado, como así también determinar su implicancia clínica y conocer su prevalencia en muestras de diferentes sitios anatómicos para establecer su tropismo.

A diferencia de los HPV mucosotrópicos, los HPV identificados en piel muestran una gran heterogeneidad genética que al momento los ubica en 5 géneros diferentes según la clasificación taxonómica actual [16]. Esta diversidad y su persistencia en la piel en bajo número de copias requieren de la aplicación de técnicas altamente sensibles combinadas con el uso de cebadores que permitan la amplificación de un amplio espectro de tipos. Por ello, para el análisis de los tipos de HPV presentes en epitelios cutáneos se utilizaron los sistemas de amplificación CUT [99,138] y FAP [133,139,141,196], que demostraron previamente su capacidad para identificar un amplio rango de HPV. Ambos sistemas de amplificación fueron aplicados sobre muestras de piel sana expuesta a la luz solar provenientes de individuos inmunocompetentes que trabajan en laboratorios y oficinas cercanas a nuestro laboratorio. Estos voluntarios participaron del estudio longitudinal

presentado en este trabajo de tesis diseñado para determinar la prevalencia y persistencia de la infección de HPV a lo largo de 3 estaciones climáticas (Figura 17).

El análisis de 295 muestras de hisopados de piel determinó que el sistema FAP tuvo mayor capacidad para identificar secuencias de HPV (46%) en relación al sistema CUT (10%). Ambos sistemas tuvieron una concordancia general del 56% por lo que los cebadores CUT complementan a los FAP y viceversa, demostrando que el uso combinado de ambos sistemas de cebadores constituye la mejor estrategia para identificar los HPV circulantes en epitelios cutáneos (Tabla 15). Al analizar los tipos/tipos putativos identificados con cada sistema de cebadores, se observó la misma tendencia (Tabla 16, Figura 18), confirmando que el uso de dos sistemas de cebadores con diferentes especificidades permite conocer con mayor profundidad la epidemiología de la infección por HPV en piel.

El análisis de las secuencias obtenidas con ambos sistemas de cebadores en forma conjunta permitió identificar 82 virus diferentes, de los cuales 51 (62%) eran tipos previamente caracterizados y 31 (38%) eran tipos putativos. La mayoría de los tipos putativos fueron descritos previamente en la literatura (“tipos FA, FAIM, GC”, etc.) y 3 fueron identificados por primera vez en este trabajo (“tipos EP”). Es necesario considerar que en todo el mundo se han descrito más de 200 tipos putativos [17] y con el avance en las técnicas moleculares muchos de ellos se han podido caracterizar completamente. En este trabajo se identificaron 3 tipos putativos nuevos (EP01, EP04 y EP05; Tabla 19) que se agrupan en especies conocidas de Gama PV evidenciando que en los últimos años se ha avanzado enormemente en la identificación de nuevos tipos de HPV en diferentes epitelios, sobre todo con el uso de las técnicas de secuenciamiento profundo [16,34]. Los tipos EP04 y EP05 fueron identificados con el sistema CUT, el cual además demostró tener mayor capacidad de identificar tipos putativos en relación al sistema FAP (42% vs 35%). El tipo EP05 se agrupa en la especie Gama 24 y tiene un 74,1% de identidad nucleotídica en el ORF L1 con el HPV197 (Tabla 18), el cual ha sido identificado en alta prevalencia en diferentes tipos de tumores cutáneos [240]. Sin bien su significancia biológica aún debe determinarse, sería interesante caracterizar completamente el genoma completo de EP05 y determinar su prevalencia tanto en lesiones como en piel sana de otras poblaciones para establecer su eventual asociación con patologías cutáneas.

Los cebadores CUT y los FAP mostraron buen desempeño para detectar tipos/tipos putativos de distintos géneros de HPV (Tabla 17). Los cebadores CUT fueron capaces de amplificar tipos de distintas especies de los géneros Alfa PV, Beta PV y Gama PV (Tabla 17, Figura 19). En cambio, los cebadores FAP fueron más específicos para la detección de tipos de distintas especies de los géneros Beta PV y Gama PV. El sistema de cebadores CUT logró identificar una mayor variedad de

especies que los cebadores FAP y fue capaz de detectar 3 tipos del género Alfa PV (HPV40, HPV87, HPV89) que infectan tanto epitelios mucosos como cutáneos pertenecientes a las especies Alfa 3 y Alfa 8 [241-243]. Estos resultados confirman que ambos sistemas de cebadores usados en forma conjunta permitieron identificar tipos de HPV pertenecientes a 23 de las 50 especies definidas en los 5 géneros que agrupan a los HPV de acuerdo a la taxonomía actual [16].

La epidemiología y las implicancias clínicas de los HPV cutaneotrópicos no está del todo entendida. Se ha postulado que ciertos tipos del género Beta PV pueden tener un rol en la carcinogénesis cutánea pero hasta el momento no se ha podido discriminar los tipos específicos de HPV prevalentes en las lesiones malignas de la piel de los tipos presentes como flora normal [125]. Por otro lado, en los últimos años se han identificado ciertos tipos del género Gama PV que podrían estar implicados en el desarrollo de ciertas lesiones cutáneas. Sin embargo estas relaciones deben ser aún confirmadas [130,199,240].

La exposición al sol es un factor que está asociado con el desarrollo de cáncer de piel [121] y diversos estudios han relacionado la prevalencia de infección por HPV con la mayor exposición al sol [139,142]. Argentina se encuentra en una zona de alto riesgo por el paso del agujero de ozono de Septiembre a Noviembre [244], por ello resulta interesante conocer que tipos de HPV circulan y persisten en piel sana expuesta al sol de individuos inmunocompetentes.

Con el fin de conocer si la mayor exposición a UV debido al paso del agujero de ozono esta asociada a la infección por HPV en piel sana de individuos inmunocompetentes, diseñamos un estudio longitudinal de un año de duración. El análisis de prevalencia en cada uno de las estaciones climáticas permitió estimar que alrededor de la mitad de los individuos estaba infectado con al menos un tipo de HPV en cada una de ellas (Tabla 19), evidenciando que la propagación de estos virus es muy frecuente y que forman parte de la flora normal de la piel sin causar lesiones aparentes, tal como observado por otros autores [37,135,140]. La prevalencia en áreas de piel expuestas al sol fue determinada en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio en donde las muestras también se analizaron con los sistemas CUT y FAP. En este caso se determinó que el 71% de los individuos estaba infectado con HPV, diferencia que podría deberse a que la población en estudio fue diferente ya que se incluyeron individuos con lesiones cutáneas [138]. Sin embargo las prevalencias obtenidas en el estudio realizado para este trabajo de tesis están en línea con otras investigaciones [137,195].

En primavera, la prevalencia de infección fue mayor respecto a verano e invierno (54% vs. 45% y 47%). A pesar de que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,43$) observamos una tendencia de que la mayor prevalencia de infección coincidió con el paso del agujero de ozono en nuestro país [244]. Otros estudios han relacionado la mayor exposición a la

radiación solar con mayor frecuencia de infección por HPV [139,142,245]. Un estudio en donde se evaluaron dos grupos de individuos con diferentes hábitos de exposición al sol se demostró que cuanto mayor era el tiempo de exposición a la radiación solar, mayor era el riesgo de adquirir una infección por HPV en piel [142]. Cabe destacar que este estudio fue realizado en Australia, donde la radiación solar es alta y similar a la de Argentina por lo que también es un país de alto riesgo de CPNM por el paso del agujero de ozono.

El análisis de los tipos y especies de HPV más prevalentes en las tres estaciones climáticas determinó que la especie Beta 1 fue la más prevalente en todas ellas (Tabla 19). El tipo HPV5 fue el más frecuente en primavera e invierno, y el HPV19 lo fue en primavera y verano. Una mayor frecuencia de infección con tipos agrupados en la especie Beta 1 ha sido reportada por otros estudios tanto en piel sana como en lesiones [145,196,246]. Por otro lado, se ha demostrado mediante experimentos realizados en queratinocitos primarios que el promotor del HPV5 es activado por la radiación UV [247].

Otros estudios han demostrado que ciertos tipos del género Beta PV pueden inhibir los mecanismos de reparación del ADN y apoptosis después de una excesiva exposición a UV [248,249]. Como resultado de esto, la infección persistente en la piel por tipos del género Beta PV durante un largo período de tiempo podrían facilitar la acumulación de errores genéticos en la célula infectada, facilitando el desarrollo de lesiones precursoras del CPNM en sitios expuestos al sol, [250]. Un estudio que incluyó muestras de piel de individuos con CCE provenientes de varios países con diferentes grados de radiación solar determinó que la asociación entre la susceptibilidad a la radiación a UV y el desarrollo de CCE es mayor en individuos infectados con tipos de Beta PV [251]. Sin embargo, la alta prevalencia de tipos de Beta PV en piel de individuos sanos sugiere que sólo ciertos tipos estarían implicados en el desarrollo de patologías cutáneas [252].

El análisis de los tipos de HPV que persisten en piel sana expuesta al sol en una población de individuos inmunocompetentes es importante para dilucidar la controversia que existe en cuanto al rol de estos virus en el desarrollo de patologías cutáneas. En nuestro estudio la *persistencia* de la infección por HPV se definió como la presencia del mismo tipo en al menos 2 de las 3 estaciones climáticas analizadas en el mismo individuo. Una infección se consideró como *transitoria* si se identificaban tipos de HPV diferentes en al menos 1 de las estaciones y *negativa* si no se identificaba ADN de HPV a lo largo de las 3 estaciones estudiadas. En el 79.5% (62/78) de los individuos se identificó la presencia de HPV en al menos unas de sus muestras, mientras que el 20.5% de los voluntarios (16/78) fue HPV-negativo en las 3 muestras analizadas. Esto vuelve a reforzar las observaciones realizadas previamente en este trabajo y por otros estudios que

determinaron que la infección por HPV en piel es común entre los individuos y que se propagan fácilmente [135,140].

Además determinamos que el 29% (23/78) de los voluntarios presentaron infecciones persistentes con al menos un tipo/tipo putativo de HPV y 6% (5/78) de ellos presentaron infecciones con el mismo tipo/tipo putativo en los 3 periodos estudiados (Tabla 21). Estudios previos realizados por periodos de más de 6 meses determinaron que alrededor de la mitad de los individuos tenían infecciones persistentes en piel por algún tipo de HPV [144,145]. La menor proporción de individuos con infecciones persistentes identificados en nuestro estudio podría deberse a que los tipos de HPV cutaneotrópicos se encuentran en bajo número de copias. Probablemente ciertos tipos no pudieron ser identificados debido a la competencia entre los diferentes genotipos y a la preferencia de los cebadores genéricos en amplificar uno u otro [253]. Este fenómeno es un problema común en las técnicas basadas en PCR donde se utilizan cebadores de amplio espectro y puede llevar a la subestimación del número de tipos de HPV presentes en una muestra [144]. Además en el análisis de infecciones múltiples, solo se analizaron 3 clones por muestra, lo que tendería a detectar las infecciones más abundantes y los tipos de HPV que podrían estar infectando persistentemente en bajo número de copias podrían no ser identificados [145]. De hecho, en 5 individuos se pudo detectar el mismo tipo de HPV en primavera e invierno, pero no en verano (Tabla 21). Este resultado sugiere que ese tipo estaba presente en ese periodo pero que no pudo ser amplificado, tal vez debido a este fenómeno de competencia y a que se encontraba en bajo número de copias.

Los tipos de HPV más persistentes pertenecían al género Beta PV, específicamente a la especie Beta 1. El tipo de HPV más frecuente durante 2/3 estaciones estudiadas fue el HPV5 (Beta 1) seguido por los tipos HPV37 (Beta 2) y HPV75 (Beta 3). Además los tipos que presentaron infecciones persistentes en 5 individuos durante las 3 estaciones pertenecían a la especie Beta 1 (Tabla 21).

En principio podría pensarse que el hecho de que las infecciones persistentes estén asociadas principalmente a tipos/tipos putativos del género Beta PV podría deberse a las especificidades de los cebadores utilizados, ya que a lo largo de este trabajo el sistema de cebadores FAP logró identificar una mayor cantidad de virus, y estos cebadores tienen probada eficiencia en amplificar tipos de HPV de este género [145,196]. Sin embargo, se identificaron también tipos/tipos putativos pertenecientes a los géneros Gama y Alfa PV, cuyas infecciones no fueron persistentes en nuestro grupo de voluntarios (Tabla 20). En ese sentido, otros estudios en donde se analizó la persistencia de HPV en piel sana o en lesiones de individuos inmunocompetentes e inmunosuprimidos también

observaron que los tipos del género Beta PV persisten con mayor frecuencia que los tipos de género Gama PV [145,194].

Determinamos que el tipo más persistente en la población fue el HPV5 (Beta 1), uno de los tipos que se han asociado al desarrollo lesiones cutáneas en individuos con EV [118] e identificado frecuentemente en individuos con CPNM [246,254]. Si bien en nuestro estudio la relación de estos virus con el huésped parece ser de tipo comensal no podemos excluir que las infecciones por tipos del género Beta PV no tengan un rol en la patogénesis cutánea. En efecto, la infección persistente por tipos del género Beta PV en piel expuesta a radiación solar ha sido propuesta como un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones precursoras de CPNM como la queratosis actínica o la queratosis seborreica [250,255]. Además, el tiempo de seguimiento de los individuos fue relativamente corto (1 año) por lo que no fue posible determinar que la persistencia de la infección por alguno de estos tipos fuera un factor de riesgo. Sin embargo, otros autores han reportado la identificación y persistencia de múltiples tipos de Beta PV (incluido el HPV5) en piel sana por meses, e incluso años, sin inducir ningún daño [139,140,144,145,256], en línea con nuestros resultados.

En cuanto a las variables demográficas y de comportamiento que podrían influenciar la infección por HPV en piel (Sección 4.II.4.2.1), analizamos en primer lugar si existían diferencias entre los individuos que fueron negativos para ADN de HPV en las 3 estaciones con los individuos que tuvieron algún tipo de infección (transitoria o persistente). Si bien el tiempo medio de exposición al sol del primer grupo (4 hs/semana) fue mayor a lo que declararon los individuos infectados (6 hs/semana), esa diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,322$). Teniendo en cuenta que otros autores [138,139,142] han determinado que el tiempo de exposición al sol influye en la adquisición de la infección por algún tipo de HPV, profundizamos este análisis considerando el uso de protector solar y tipo de factor, hábito que podría asociarse a una menor infección por HPV. El análisis de estas variables entre ambos grupos (negativos e infectados) no arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,36$). Vale la pena considerar que en un estudio donde se evaluaron los métodos de protección solar (uso de protector solar, uso de ropa protectora y uso de sombrero) en individuos que pasaban muchas horas al sol no se encontró una asociación con la frecuencia de infección por HPV [142].

Una posible explicación a la mayor frecuencia de infección por HPV en relación a mayor exposición a la radiación solar podría ser la inmunosupresión local [257] que facilitaría la infección por HPV. El estado inmune de un individuo también se ha relacionado con la edad, indicando que la respuesta inmune decaería a edades mayores [258] Cuando comparamos la edad de los individuos que fueron HPV-negativos en las 3 estaciones (16/78) respecto a los que fueron positivos en al

menos 1 de ellas (62/78) observamos que los individuos de éste último grupo eran significativamente mayores en edad ($p=0,019$). Este resultado está en línea con otros autores e indica que la prevalencia de la infección por HPV es más frecuente en edades mayores [195,255]. Otro factor demográfico analizado en este estudio fue el género, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,16$), como reportado por otros [139].

Sucesivamente, quisimos conocer si las variables estudiadas podrían relacionarse con la persistencia de la infección por HPV. Con ese objetivo se realizaron comparaciones entre los 3 estados de infección definidos durante el seguimiento: persistente (23/78), transitoria (39/78) y negativa (16/78). Nuevamente, no se observaron diferencias significativas en cuanto al tiempo de exposición al sol ($p=0,41$) y al uso de protector solar ($p=0,34$) entre los 3 grupos de individuos. Estos resultados sugieren que las horas y el uso de protección a UV no serían factores que influyen en la persistencia de la infección por HPV en piel, en línea con otros estudios que determinaron que la persistencia de HPV en piel ocurre tanto en países con altos (Australia) [142] y bajos (Suiza) [256] niveles de radiación UV. Debido a que la edad fue la única variable asociada significativamente como un factor que influiría en la adquisición de la infección por HPV en piel resultó interesante analizar esta variable en la relación al estado de la infección. La comparación de las edades entre los 3 grupos de individuos determinó que la edad promedio de los voluntarios con infecciones persistentes fue significativamente mayor que la de los individuos no infectados (negativo) ($p=0,05$), tal como observado por otros [255]. Cabe destacar que los análisis de regresión multivariados confirmaron que la edad de los individuos fue la única variable asociada significativamente tanto a la frecuencia ($p=0,0128$) como a la persistencia ($p=0,0158$) de la infección por HPV en piel expuesta a radiación solar en esta población de individuos inmunocompetentes.

Nuestros resultados aportan información relevante acerca de los tipos de HPV que circulan y persisten en una población de individuos inmunocompetentes y es el primero realizado en nuestro país. El hecho de haber determinado por un lado, que en primavera la prevalencia de infección fue mayor que en verano e invierno, y por el otro que los individuos infectados pasen más horas/semana al sol que los no infectados, es de suma importancia en Argentina teniendo en cuenta de que se encuentra en una zona de alto riesgo de exposición a UV por el paso del agujero de ozono durante esa estación climática [244].

Debido a la alta heterogeneidad de los tipos de HPV cutaneotrópicos algunos autores sugieren que los tipos realmente asociados al desarrollo del CPNM aún no han sido identificados [259]. Por lo que resulta importante realizar esfuerzos para conocer y caracterizar los tipos de HPV que infectan la piel.

Recientemente, la aplicación de la técnica de secuenciación profundo ha permitido la identificación de un mayor número de tipos de HPV respecto a las estrategias convencionales [39,135], aunque estas nuevas tecnologías siguen dependiendo de la capacidad de los cebadores en amplificar todos los HPV presentes en una muestra. Este tipo de estrategias y el análisis de muestras con cebadores genéricos han permitido identificar más de 200 tipos putativos, en su mayoría en piel, que aún no han sido caracterizados completamente [17].

La aplicación de la técnica “PCR altamente sensible para fragmentos largos” ha permitido la caracterización de 4 nuevos tipos de HPV de individuos de nuestra región: 1 tipo de Beta PV (HPV115) [138] y 3 tipos de Gama PV (HPV156, HPV157 y HPV158) [35,197]. En este trabajo de tesis, esta metodología permitió obtener los genomas completos de 3 tipos nuevos de HPV a partir de muestras de hisopados de piel sana expuesta a radiación solar en las cuales se habían identificado previamente tipos putativos de los géneros Gama PV y Beta PV: HPV205 (Gama 1) [197], HPV 210 (Gama 12) y HPV 209 (Beta 2).

El análisis filogenético y la comparación de secuencias del ORF L1 (Figura 24) confirmaron al HPV205 como un nuevo miembro de la especie Gama 1 con una identidad nucleotídica del 84.8% con respecto al HPV173. El tipo HPV 210 es miembro de la especie Gama 12 y comparte 82.4% de identidad nucleotídica en el ORF L1 con el HPV132. Por su parte el HPV 209 se agrupa en la especie Beta 2 y comparte 88.1% de identidad nucleotídica en el ORF L1 con el HPV107 (Figura 24).

El análisis *in silico* de los genomas de los 3 tipos nuevos (Tabla 25) demostró la presencia de al menos 6 ORF putativos que potencialmente codifican para 4 proteínas tempranas (E6, E7, E1, E2) y 2 proteínas tardías (L2 y L1) (Tabla 25). La ausencia del ORF E5, está en línea con otros miembros de los géneros Beta y Gama PV [32,199]. Por otro lado en el genoma del HPV 209 se pudo identificar un ORF que codifica para la proteína E4, presente en todos los miembros del género Beta PV [44]. En ninguno de los tipos nuevos del género Gama PV se identificó un ORF que codifique para la proteína E4, sin embargo sus secuencias presentaron sitios ricos en prolina, característico de esta proteína. La presencia variable de la proteína E4 es una característica de algunos miembros del género Gama PV. Por ejemplo, en la especie Gama 1 (HPV205), 3 de los 6 miembros (HPV4, HPV65 y HPV95) tienen el ORF E4 [197,260-262], mientras que en la especie Gama 12 (HPV 210), ninguno de los 8 virus que la componen codifican para la proteína E4 [149,197,199].

Las proteínas putativas de los 3 tipos nuevos mostraron aspectos comunes de los demás HPV cutaneotrópicos [45,263]. Las proteínas E6 de HPV205, HPV210 y HPV209 contienen 3, 4 y 1 dominios putativos de unión a PDZ respectivamente [198]. Una característica específica de los tipos

mucosos AR es la presencia de un dominio de unión a PDZ en el carboxilo terminal de la proteína E6, lo que es importante en la proliferación, polaridad y transformación celular [264]. Ninguno de los dominios de unión a PDZ en los 3 tipos nuevos fue identificado en el carboxilo terminal. Sin embargo se demostró que las proteínas E6 de algunos tipos oncogénicos del género Beta PV (HPV5 y HPV8, Beta 1) codifican para un dominio conservado (YXDM) en el carboxilo terminal que está relacionado con el incremento de la migración celular y por lo tanto con una mayor patogenicidad [265]. Si bien este dominio no fue identificado en el HPV209, sería interesante profundizar sobre los patrones de unión y posibles funciones de los diferentes dominios conservados de las proteínas E6 de ciertos tipos de la especie Beta 2. Por otro lado, la proteína E7 de HPV209 contiene un sitio putativo de unión a pRB al igual que los otros miembros de su especie [266]. Esta característica resulta interesante para investigar el rol que cumplen estos virus en el desarrollo de lesiones cutáneas teniendo en cuenta que se han identificado altas prevalencias de tipos de la especie Beta 2 en CCE [245] y queratosis actínica [266].

La presencia del sitio de unión a pRB en las proteínas putativas E7 de los virus del género Gama PV es variable. En este sentido, no se lo identificó en la proteína E7 del HPV205, al igual que otros miembros de la especie Gama 1 [199], pero si fue posible identificar un sitio putativo de unión a pRB en el HPV210. Un estudio reciente propone que este sitio putativo de unión a pRB se habría perdido en algún ancestro de los virus de la especie Gama 12, lo cual habría llevado a que aquellos tipos sin sitio de unión a pRB tengan relaciones evolutivas más cercanas, y viceversa [149]. De esta manera, el HPV210 se agrupó con aquellos tipos pertenecientes a la especie Gama 12 en los que este sitio de unión estaba presente (HPV132 y HPV148; Figura 24) [199]. En particular, el HPV148 fue caracterizado de una biopsia de queratosis actínica proveniente de un paciente inmunosuprimido [199], y dado que se trata de una lesión precursora del CPNM, sería interesante investigar los potenciales oncogénicos de los demás tipos agrupados en la especie Gama 12.

Recientemente se identificaron tipos del género Gama PV que podrían estar relacionados con el desarrollo de lesiones cutáneas. Particularmente el HPV197 (Gama 24) y los tipos de la especie Gama 1, donde se agrupa el HPV205, se han asociado con el desarrollo de CCB [136,240].

Los estudios que han aplicado metagenómica para explorar los tipos de HPV presentes en distintas muestras sugieren que ya se habrían identificado la mayoría de los tipos de Alfa PV [267]. En cambio, el género Gama PV es altamente divergente y en los últimos años se han identificado numerosos virus agrupados en al menos 27 especies [16]. Además, la mayoría de los tipos que aún quedan por caracterizar pertenecen a este género [39,135]. Esto se refleja en la evolución del número de secuencias de HPV depositadas en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) en donde se observa que el descubrimiento de nuevos tipos del género Gama PV se ha disparado en los últimos

años [16]. Estos resultados sugieren que este género ha continuado diversificándose y colonizando otros sitios anatómicos [20].

Numerosos autores proponen que los PV han evolucionado con sus huéspedes a lo largo de cientos de años lo que los ha llevado a tener bajas tasas de evolución [15,19]. Si bien aún no se ha aislado ningún tipo recombinante, existen ciertas evidencias que sugieren que la recombinación sería una fuerza evolutiva que pudo haber moldeado la filogenia de la familia *Papillomaviridae*. Las evidencias de incongruencias filogenéticas en los géneros Alfa PV, [42,156] Ípsilon PV y Ómicron PV [153], sumados a los estudios realizados *in silico* que sugieren la presencia de eventos de recombinación ancestral en el género Alfa PV [152,157], refuerzan esta teoría. Considerando que los reportes sobre recombinación en el género Gama PV son escasos, exploramos si esta fuerza evolutiva podría haber influenciado la diversidad genética de este género utilizando una base de datos actualizada e incluyendo uno de los tipos de Gama PV identificados en este trabajo, el HPV205.

El uso de un método basado en distancia como el programa RDP4.1 [268] para la identificación de eventos de recombinación requiere que el alineamiento sea confiable, ya que esta herramienta es extremadamente sensible a los alineamientos erróneos y posiblemente se identificarán las regiones desalineadas de las secuencias como un evento de recombinación. Teniendo en cuenta esta limitación y considerando que el género Gama PV es altamente divergente [16], se alineó cada ORF por separado y se los combinó en una secuencia concatenada. Otros estudios han demostrado que la combinación de los ORF E1-E2-L1 es adecuada para realizar inferencias filogenéticas cuando se utiliza una gran cantidad de secuencias de PV de diferentes niveles taxonómicos [150,151]. Por otro lado, la incorporación del ORF L2 en el análisis solo estaría justificada cuando la reconstrucción de la filogenia de los PV es llevada a cabo en niveles taxonómicos más bajos [150].

En base a estas consideraciones, exploramos los potenciales eventos de recombinación en el género Gama PV (nivel taxonómico bajo) en todas las combinaciones de ORF (E1-E2-L1, E1-E2-L2 y E1-E2-L2-L1) para reforzar nuestros resultados. De acuerdo al análisis realizado, se detectaron numerosas señales de recombinación en los ORF por separado y en sus combinaciones (Tabla 26). Sin embargo, solo dos señales estuvieron presentes en todas las combinaciones de ORFs: un evento putativo intra-especie en la especie Gama 7 y un potencial evento inter-especie entre virus ancestrales de la especie Gama 24 y Gama 11 que habría dado origen a los tipos actualmente agrupados en la especie Gama 8. Ambos eventos fueron identificados cuando se realizó el análisis con los ORFs concatenados, pero no se detectaron cuando se utilizaron los ORF por separado. Esto podría explicarse por el hecho de que hay menos información filogenética en un solo ORF respecto a la contenida en las secuencias concatenadas.

Con el fin de confirmar estos resultados, se construyeron árboles filogenéticos utilizando las regiones de las secuencias parentales menores y mayores por separado para evaluar posibles incongruencias topológicas (Figuras 25 y 26). Este tipo de incongruencias fueron observadas en las filogenias realizadas con genes tempranos y tardíos en los géneros Alfa PV [156], Gama PV [199], Ípsilon PV y Omicron PV [153], y han sido explicadas como potenciales eventos de recombinación [150]. En este trabajo, se utilizaron las regiones entre los sitios de recombinación detectados por el programa RDP4.1 para realizar la filogenia en lugar de los genes tempranos y tardíos. Esta separación contendría información más precisa acerca del posible evento de recombinación. Algunos de los nodos más recientes del árbol construido con la región recombinante del evento inter-especie tuvieron valores de BPP bajos probablemente debido a que las secuencias utilizadas en el alineamiento eran cortas. Por lo tanto, se construyó un árbol filogenético utilizando Maximum Likelihood con el programa RAxML [269] confirmando la misma topología obtenida anteriormente y con valores de soporte aceptables (> 0.5) en los nodos (datos no mostrados). Los árboles filogenéticos realizados para el analizar el evento de recombinación intra-especie en la especie Gama PV tuvieron valores de BPP altos (Figura 26). Estudios previos realizados por Kohler y cols. demostraron que el HPV149 era el tipo filogenéticamente más relacionado al HPV109 analizando los genes tempranos [199]. En este trabajo de tesis se realizó un análisis similar con una base de datos actualizada que permitió identificar al HPV170 como un posible virus recombinante cuyos parentales menor y mayor serían los tipos HPV109 y HPV149, respectivamente (Tabla 26).

Un hallazgo interesante fue la posible recombinación ancestral que habría originado al HPV129 identificada en el análisis topológico del evento intra-especie (Figura 25). El HPV129 fue identificado previamente por Kohler y cols., quienes no lograron detectar ningún posible evento de recombinación en este tipo [199]. El hecho de que en la base de datos utilizada para realizar el análisis en este trabajo se haya incluido al HPV175 (parental menor), no disponible cuando el HPV129 fue caracterizado, hizo posible la identificación de este evento putativo de recombinación. Sin embargo, estos resultados merecen ser investigados profundamente para comprender si son una evidencia real de recombinación, una prueba de que los diferentes genes tienen historias evolutivas distintas o si son un artefacto debido a errores en el alineamiento de las secuencias. Este hecho expresa la problemática que existe en la detección de eventos de recombinación en los PV. A pesar de que hay varias evidencias que sugieren que la recombinación es una fuerza evolutiva importante en la evolución de los PV [20,152,159,270] aún no se ha encontrado un método confiable que logre diferenciar entre verdaderas señales de recombinación y artefactos producidos por los alineamientos. En cualquiera de los casos, la información filogenética del género Gama PV tiende a incrementar cada año y aún es incompleta [16,20]. En este sentido existen más de 150 tipos

putativos del género Gama PV que aún no han sido caracterizados [17] y más de 30 tipos putativos identificados en primates [199] que se agrupan en este. Estos datos sugieren que los HPV podrían ser polifiléticos si nuevos virus se incorporaran para el análisis filogenético del género Gama PV [199]. Por lo tanto, deben realizarse mayores esfuerzos para identificar nuevos tipos de PV en huéspedes de otras especies para tener un panorama completo de este género altamente divergente y de esta manera entender la evolución de los Gama PV y sus interacciones con los huéspedes.

6. Conclusiones

En la primera parte de este trabajo de tesis se optimizó el sistema de detección de HPV L1HPVPCR 16.4 diseñado previamente en nuestro laboratorio y que, según el criterio de competencia de la *WHO HPV LabNet*, tenía sensibilidades sub-óptimas para identificar dos de los tipos de HPV más prevalentes en carcinomas cervicales, HPV18 y HPV45.

En los años 2013 y 2014 nuestro laboratorio participó en el estudio de competencia de la *WHO HPV LabNet*, utilizando el sistema optimizado L1HPVPCR 16.4.1 que resultó ser competente para la identificación de 15 tipos de HPV mucosotrópicos (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Estos estudios permiten disponer de una herramienta apta para el análisis de la infección por HPV en epitelios mucosos para su aplicación en la vigilancia epidemiológica a nivel molecular en la era de la vacunación masiva.

La versión L1HPVPCR 16.4.1 junto con los cebadores CUT se utilizaron para conocer la epidemiología de HPV en cérvix en un grupo de mujeres no vacunadas contra HPV y con diagnóstico de patología cervical de nuestra región. Utilizando ambas estrategias metodológicas determinamos la prevalencia general de HPV y tipo específica pre-vacunal en 115 mujeres que concurrieron al Servicio de Ginecología del HEEP. Este análisis determinó que el 85% de las mujeres estaba infectada con al menos un tipo de HPV y que los tipos de HPV más prevalentes en esta población fueron el HPV16 (25%) y HPV31 (13%). En total ambos sistemas identificaron 33 tipos diferentes de HPV (17 tipos AR y 15 tipos BR) agrupados en 8 especies del género Alfa PV y un tipo putativo de Gama PV (GC12_03). De acuerdo al análisis de los tipos presentes en cada una de las categorías citológicas, se observó que la prevalencia de HPV aumentó significativamente con el incremento de la severidad de la lesión y que los tipos AR estaban mayormente asociados a lesiones H-SIL. Por otro lado, determinamos que la prevalencia de HPV disminuye significativamente al aumentar la edad. No obstante, las frecuencias de infección fueron relativamente altas en todas las categorías etarias por lo que no fue posible establecer una relación con los demás factores y co-factores estudiados.

El análisis de persistencia de la infección por HPV en 68 mujeres determinó que los tratamientos recibidos en cada uno de los subgrupos fue el adecuado ya que la mayoría de ellas logró una evolución clínica favorable en un tiempo promedio de 24 meses. Solo dos mujeres que recibieron tratamiento expectante desarrollaron lesiones de mayor gravedad (H-SIL) y 2 mujeres que recibieron tratamiento quirúrgico tuvieron lesiones de tipo L-SIL al final del periodo estudiado. Por otro lado, identificamos a los tipos HPV16 y HPV31 como los tipos más persistentes y mayormente asociados al desarrollo de lesiones cervicales en esta población.

Los resultados de esta sección aportan nueva información sobre la prevalencia y persistencia de tipos de HPV en mujeres no vacunadas con diagnóstico de patología cervical que residen en la

provincia de Santa Fe. Este análisis descriptivo sienta las bases para la vigilancia epidemiológica post-vacunación en nuestra región de manera de poder evaluar el impacto del programa de vacunación implementado en nuestro país y la posible incorporación de vacunas multivalentes a futuro.

En la segunda parte del trabajo utilizamos el sistema CUT para analizar los HPV cutaneotrópicos circulantes en nuestra región, comparando los resultados obtenidos con el sistema de cebadores FAP, como ensayo de referencia. El análisis de 295 muestras de piel sana expuesta a radiación solar determinó que los cebadores FAP tenían mayor capacidad para amplificar tipos de HPV, pero que ambos tenían especificidades diferentes para amplificar tipos de distintos géneros. Por lo tanto, el uso combinado de ambos sistemas de cebadores constituye la mejor estrategia para analizar los HPV circulantes en epitelios cutáneos.

Utilizando ambas estrategias de amplificación se identificaron en total 82 tipos/tipos putativos en las muestras analizadas: 51 (62%) fueron tipos previamente caracterizados, 31 (38%) fueron tipos putativos de los cuales 28 habían sido descriptos previamente y 3 fueron tipos putativos nuevos identificados por primera vez en este trabajo (denominados “tipos EP”): EP01, EP04 y EP05. En total se identificaron tipos pertenecientes a 4/6 especies conocidas de Beta PV, 4/13 especies conocidas de Alfa PV y 15/27 especies conocidas de Gama PV confirmando la gran diversidad de tipos de HPV que infectan la piel.

Seguidamente analizamos la prevalencia de infección por HPV en piel sana expuesta a radiación solar de individuos inmunocompetentes en 3 estaciones climáticas diferentes. Determinamos que en primavera la prevalencia fue mayor, aunque no significativamente, respecto a las observadas en verano e invierno (53.9% vs 44.9% y 47.4%, respectivamente), coincidiendo con el paso del agujero de ozono por Argentina en esa época del año. Los tipos más prevalentes en general fueron HPV5 y HPV19, ambos de la especie Beta 1. Además observamos que los individuos infectados pasaban más tiempo al sol (6 hs/semana) que los individuos que fueron negativos a lo largo del estudio (4 hs/semana), sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Ambos resultados sugieren que existe una posible relación entre la exposición a la luz solar y la infección por HPV.

El estudio de la persistencia de los tipos virales que infectan la piel a largo de las 3 estaciones climáticas determinó que el 29% de los voluntarios tuvieron infecciones persistentes y que los tipos del género Beta PV fueron los que se identificaron más frecuentemente asociados a este tipo de infecciones. No se logró establecer una asociación entre el estado de la persistencia de la infección y el tiempo de exposición al sol. Sin embargo, observamos que la edad de las personas es una variable que influye significativamente en la adquisición y en la persistencia de la infección de HPV

en piel. Estos resultados, nos permiten determinar que los HPV pueden propagarse fácilmente entre los individuos y causar infecciones persistentes sin inducir ningún daño en el tejido por un período de al menos un año.

El análisis de las muestras de hisopado de piel sana con una metodología genérica y sensible para la amplificación de fragmentos largos permitió la completa caracterización de 3 tipos nuevos virus. Dos de ellos (HPV 210 y HPV205) pertenecen a las especies Gama 12 y Gama 1, respectivamente mientras que el HPV EP02 pertenece a la especie Beta 1. Los genomas de HPV205, HPV 209 y HPV 210 tienen 7.298, 7.399 y 7.134 pb, respectivamente, con una organización genómica típica de los HPV. El análisis de los genomas de los 3 virus permitió identificar al menos 6 genes que potencialmente codifican para 4 proteínas tempranas (E1, E2, E6 y E7) y dos proteínas tardías (L1 y L2). Al igual que los demás miembros del género Beta PV, el genoma de HPV 209 posee además un ORF que codifica para la proteína E4.

Por último, exploramos los posibles eventos putativos de recombinación que podrían haber tenido lugar en la historia evolutiva de los Gama PV utilizando una base de datos actualizada y realizando dos tipos de análisis. En primer lugar se realizó un análisis exploratorio con el programa RDP4.1 con el cual se identificaron 2 eventos putativos de recombinación con significancia estadística en al menos 4 métodos. Uno de los eventos sería una recombinación inter-especie entre virus ancestrales de la especie Gama 11 y Gama 24 que habría dado origen a todos los tipos agrupados en la especie Gama 8. El otro evento putativo sería una recombinación intra-especie entre el HPV109 (parental mayor) y HPV 149 (parental menor) que habría dado origen al HPV170 (Gama 7). El segundo lugar se realizó un análisis confirmatorio mediante la construcción de árboles filogenéticos con diferentes partes del alineamiento de los genes concatenados E1-E2-L2-L1 y permitió visualizar las incongruencias filogenéticas que confirmaron los potenciales eventos de recombinación identificados con el programa RDP4.1. El análisis de incongruencia topológica permitió además identificar una posible recombinación ancestral que pudo haber originado al HPV129 (Gama 9) y que no fue detectado por el programa RDP4.1. Este evento habría ocurrido entre alguno de los virus de la especie Gama 9 (parental mayor) y el HPV175, un miembro de especie Gama 23 (parental menor).

En conclusión hemos contribuido al conocimiento acerca de la epidemiología de las infecciones por HPV en epitelios mucosos y cutáneos utilizando herramientas de identificación sensibles y genéricas desarrolladas por nuestro grupo y que permiten abarcar un amplio espectro de tipos de distintos géneros y especies. En conjunto estos hallazgos contribuyen a expandir el conocimiento sobre la diversidad, la filogenia y la historia evolutiva de la familia *Papillomaviridae*, información esencial para dilucidar el rol que cumplen las infecciones por estos virus en distintos epitelios.

7. Bibliografía

1. Ciuffo G (1907) Innesso positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol* 48: 12–17.
2. Shope RE, Hurst EW (1933) Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med* 58: 607-624.
3. Rous P, Beard JW (1935) The Progression to Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope). *J Exp Med* 62: 523-548.
4. Jablonska S, Biczysko W, Jakubowicz K, Dabrowski J (1968) On the viral etiology of epidermodysplasia verruciformis Lewandowsky-Lutz. *Electron microscope studies. Dermatologica* 137: 113-125.
5. Olson C, Pamukcu AM, Brobst DF, Kowalczyk T, Satter EJ, et al. (1959) A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer Res* 19: 779-782.
6. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Wolf H, Dorries K, Egger H (1974) Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. *Int J Cancer* 13: 657-664.
7. Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H (1977) Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 76: 569-580.
8. Orth G, Favre M, Croissant O (1977) Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 24: 108-120.
9. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, et al. (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3: 1151-1157.
10. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 3812-3815.
11. Parkin DM, Bray F (2006) Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/11-25.
12. IARC (2007) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses, vol. 90. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
13. Syrjänen K, Syrjänen S (1999) Pathogenesis of HPV infections. In: Syrjanen K, editor. *Papillomavirus Infections in Human Pathology* Department of Pathology, University of Siena, Italy Department of Oral Pathology, University of Turku, Finland. pp. 52-88.
14. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (2007) *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
15. Van Doorslaer K (2013) Evolution of the papillomaviridae. *Virology* 445: 11-20.
16. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J (2015) International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* 476: 341-344.
17. Chouhy D, Bolatti EM, Perez GR, Giri AA (2013) Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *J Gen Virol*.
18. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27.
19. Bravo IG, de Sanjose S, Gottschling M (2010) The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol* 18: 432-438.
20. Bravo IG, Felez-Sanchez M (2015) Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health* 2015: 32-51.
21. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, et al. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401: 70-79.
22. Collins Y, Einstein MH, Gostout BS, Herzog TJ, Massad LS, et al. (2006) Cervical cancer prevention in the era of prophylactic vaccines: a preview for gynecologic oncologists. *Gynecol Oncol* 102: 552-562.

23. Gissmann L, zur Hausen H (1980) Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer* 25: 605-609.
24. Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelska M, et al. (1978) Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 1537-1541.
25. Berkhout RJ, Bouwes Bavinck JN, ter Schegget J (2000) Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 38: 2087-2096.
26. Berkhout RJ, Tieben LM, Smits HL, Bavinck JN, Vermeer BJ, et al. (1995) Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 33: 690-695.
27. Forslund O, DeAngelis PM, Beigi M, Schjolberg AR, Clausen OP (2003) Identification of human papillomavirus in keratoacanthomas. *J Cutan Pathol* 30: 423-429.
28. Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Hansson BG (1999) A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 80 (Pt 9): 2437-2443.
29. Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, Leigh IM, de Villiers EM, et al. (1999) Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J Clin Microbiol* 37: 3545-3555.
30. de Villiers EM (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 10.1016/j.virol.2013.04.023
31. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Burk RD (2007) Human papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology* 360: 447-453.
32. de Villiers EM, Gunst K (2009) Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *J Gen Virol* 90: 1999-2004.
33. Kohler A, Gottschling M, Forster J, Rowert-Huber J, Stockfleth E, et al. (2010) Genomic characterization of a novel human papillomavirus (HPV-117) with a high viral load in a persisting wart. *Virology* 399: 129-133.
34. Kocjan BJ, Bzhalava D, Forslund O, Dillner J, Poljak M (2015) Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clin Microbiol Infect* 21: 808-816.
35. Chouhy D, Bolatti EM, Piccirilli G, Sanchez A, Fernandez Bussy R, et al. (2013) Identification of human papillomavirus type 156, the prototype of a new human gammapapillomavirus species, by a generic and highly sensitive PCR strategy for long DNA fragments. *J Gen Virol* 94: 524-533.
36. Kocjan BJ, Sterbenc A, Hosnjak L, Chouhy D, Bolatti E, et al. (2015) Genome announcement: complete genome sequence of a novel Mupapillomavirus, HPV204. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 24: 21-23.
37. Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, et al. (2012) Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One* 7: e38499.
38. Li L, Barry P, Yeh E, Glaser C, Schnurr D, et al. (2009) Identification of a novel human gammapapillomavirus species. *J Gen Virol* 90: 2413-2417.
39. Ekstrom J, Bzhalava D, Svenback D, Forslund O, Dillner J (2011) High throughput sequencing reveals diversity of Human Papillomaviruses in cutaneous lesions. *Int J Cancer* 129: 2643-2650.

40. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I (2015) Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 25 Suppl 1: 2-23.
41. Nobre RJ, Herraes-Hernandez E, Fei JW, Langbein L, Kaden S, et al. (2009) E7 oncoprotein of novel human papillomavirus type 108 lacking the E6 gene induces dysplasia in organotypic keratinocyte cultures. *J Virol* 83: 2907-2916.
42. Bravo IG, Alonso A (2004) Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J Virol* 78: 13613-13626.
43. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2006-2011.
44. Doorbar J (2013) The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 445: 80-98.
45. Zheng ZM, Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 11: 2286-2302.
46. Isegawa N, Ohta M, Shirasawa H, Tokita H, Yamaura A, et al. (1995) Nucleotide-sequence of a canine oral papillomavirus containing a long noncoding region. *Int J Oncol* 7: 155-159.
47. Meyers C, Laimins LA (1994) In vitro systems for the study and propagation of human papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 186: 199-215.
48. Laimins LA (1998) Regulation of Transcription and Replication by Human Papillomaviruses. In: McCance DJ, editor. *Human tumor viruses*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. pp. 201-223.
49. Nead MA (1998) Activities of the Transforming Proteins of Human Papillomaviruses. In: McCance DJ, editor. *Human tumor viruses*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. pp. 201-223.
50. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, et al. (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5: F55-70.
51. Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E (1992) Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 66: 6893-6902.
52. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10: 4129-4135.
53. Javier RT (2008) Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses. *Oncogene* 27: 7031-7046.
54. Culp TD, Cladel NM, Balogh KK, Budgeon LR, Mejia AF, et al. (2006) Papillomavirus particles assembled in 293TT cells are infectious in vivo. *J Virol* 80: 11381-11384.
55. Gardiol D, Kuhne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, et al. (1999) Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 18: 5487-5496.
56. Elsum I, Yates L, Humbert PO, Richardson HE (2012) The Scribble-Dlg-Lgl polarity module in development and cancer: from flies to man. *Essays Biochem* 53: 141-168.
57. Daniel B, Rangarajan A, Mukherjee G, Vallikad E, Krishna S (1997) The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol* 78 (Pt 5): 1095-1101.
58. Howley P (1985) Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119: 361-366.
59. Romanczuk H, Howley PM (1992) Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3159-3163.

60. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69: 2989-2997.
61. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM (2007) A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis* 195: 1582-1589.
62. Bosch X, Harper D (2006) Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecol Oncol* 103: 21-24.
63. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, et al. (2010) Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 11: 1048-1056.
64. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518-527.
65. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, et al. (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287: 2114-2119.
66. zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288: F55-F78.
67. Lowy DR, Schiller JT (2006) Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 116: 1167-1173.
68. Woodman CB, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7: 11-22.
69. Schiffman M, Kjaer SK (2003) Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 14-19.
70. zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350.
71. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, et al. (1998) The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr* 132: 277-284.
72. An HJ, Sung JM, Park AR, Song KJ, Lee YN, et al. (2011) Prospective evaluation of longitudinal changes in human papillomavirus genotype and phylogenetic clade associated with cervical disease progression. *Gynecol Oncol* 120: 284-290.
73. Sudenga SL, Shrestha S (2013) Key considerations and current perspectives of epidemiological studies on human papillomavirus persistence, the intermediate phenotype to cervical cancer. *Int J Infect Dis* 17: e216-220.
74. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N (2002) Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89: 191-199.
75. Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, Franco EL, et al. (2002) Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 186: 164-172.
76. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, et al. (2002) Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* 346: 1105-1112.
77. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, et al. (2002) Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 1604-1613.
78. WHO/ICO (2010) Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Argentina. Summary Report 2010.: www.who.int/hpvcentre.

79. WHO/ICO (2015) Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Argentina. Summary Report 2015. <http://www.hpvcentre.net/>.
80. Cubie HA (2013) Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* 445: 21-34.
81. Comparetto C, Borruto F (2015) Cervical cancer screening: A never-ending developing program. *World J Clin Cases* 3: 614-624.
82. WHO (2015) Control integral del cáncer cervicouterino. Guía de prácticas esenciales. www.who.int.
83. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338: 423-428.
84. Hovadhanakul P, Mehra U, Terragno A, Taylor HB, Cavanagh D (1976) Comparison of colposcopy directed biopsies and cold knife conization in patients with abnormal cytology. *Surg Gynecol Obstet* 142: 333-336.
85. Santesso N, Mustafa RA, Wiercioch W, Kehar R, Gandhi S, et al. (2015) Systematic reviews and meta-analyses of benefits and harms of cryotherapy, LEEP, and cold knife conization to treat cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*.
86. Devesa SS, Young JL, Jr., Brinton LA, Fraumeni JF, Jr. (1989) Recent trends in cervix uteri cancer. *Cancer* 64: 2184-2190.
87. Anttila A, Nieminen P (2000) Cervical cancer screening programme in Finland. *Eur J Cancer* 36: 2209-2214.
88. Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA (1993) Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 67: 315-322.
89. Coseo SE, Porras C, Dodd LE, Hildesheim A, Rodriguez AC, et al. (2011) Evaluation of the polyclonal ELISA HPV serology assay as a biomarker for human papillomavirus exposure. *Sex Transm Dis* 38: 976-982.
90. Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, et al. (2007) Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* 298: 743-753.
91. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, et al. (2006) 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* 367: 1247-1255.
92. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, et al. (2015) A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med* 372: 711-723.
93. Rositch AF, Poole C, Hudgens MG, Agot K, Nyagaya E, et al. (2012) Multiple human papillomavirus infections and type competition in men. *J Infect Dis* 205: 72-81.
94. Crum CP, Abbott DW, Quade BJ (2003) Cervical cancer screening: from the Papanicolaou smear to the vaccine era. *J Clin Oncol* 21: 224s-230s.
95. IARC/ICO (2010) Human Papillomavirus and Related Cancers. Summary Report Update. June 22, 2010. <http://screening.iarc.fr/>.
96. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, et al. (2012) Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer* 131: 2349-2359.
97. Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA (2011) Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 6: e25493.
98. Matos E, Loria D, Amestoy GM, Herrera L, Prince MA, et al. (2003) Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study. *Sex Transm Dis* 30: 593-599.

99. Chouhy D, D'Andrea RM, Iglesias M, Messina A, Ivancovich JJ, et al. (2013) Prevalence of human papillomavirus infection in Argentinean women attending two different hospitals prior to the implementation of the National Vaccination Program. *J Med Virol* 85: 655-666.
100. Marin HM, Torres C, Deluca GD, Mbayed VA (2015) Human papillomavirus detection in Corrientes, Argentina: High prevalence of type 58 and its phylodynamics. *Rev Argent Microbiol* 47: 302-311.
101. Deluca GD, Marin HM, Blanco NS, Basiletti JA, Gonzalez JV, et al. (2013) Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical alterations from north Argentina. *Indian J Med Microbiol* 31: 138-141.
102. Venezuela RF, Kiguen AX, Frutos MC, Cuffini CG (2012) Circulation of human papillomavirus (HPV) genotypes in women from Cordoba, Argentina, with squamous intraepithelial lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54: 11-16.
103. Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Dillner J (2014) Global improvement in genotyping of human papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study. *J Clin Microbiol* 52: 449-459.
104. Eklund C, Zhou T, Dillner J (2010) Global proficiency study of human papillomavirus genotyping. *J Clin Microbiol* 48: 4147-4155.
105. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM (2009) Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer* 4: 8.
106. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S (2007) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370: 890-907.
107. Moscicki AB (1998) Genital infections with human papillomavirus (HPV). *Pediatr Infect Dis J* 17: 651-652.
108. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, et al. (1992) A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327: 1272-1278.
109. Paraskevaidis E, Kaponis A, Malamou-Mitsi V, Davidson EJ, Hirsch PM, et al. (2002) The natural history of HPV infection of the uterine cervix. Long-term observational and histological data. *Anticancer Res* 22: 1177-1181.
110. Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, et al. (2003) Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106: 396-403.
111. Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J (2004) Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis* 190: 37-45.
112. Castle PE, Rodriguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, et al. (2011) Long-term persistence of prevalently detected human papillomavirus infections in the absence of detectable cervical precancer and cancer. *J Infect Dis* 203: 814-822.
113. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, et al. (2003) Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control* 14: 805-814.
114. Schmeink CE, Melchers WJ, Siebers AG, Quint WG, Massuger LF, et al. (2011) Human papillomavirus persistence in young unscreened women, a prospective cohort study. *PLoS One* 6: e27937.
115. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, et al. (2013) Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *Int J Cancer* 133: 1271-1285.
116. Kudoh A, Sato S, Itamochi H, Komatsu H, Nonaka M, et al. (2015) Human papillomavirus type-specific persistence and reappearance after successful conization in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Oncol*.

117. Soto-De Leon SC, Del Rio-Ospina L, Camargo M, Sanchez R, Moreno-Perez DA, et al. (2014) Persistence, clearance and reinfection regarding six high risk human papillomavirus types in Colombian women: a follow-up study. *BMC Infect Dis* 14: 395.
118. Pfister H (2003) Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 52-56.
119. Jenson AB, Geyer S, Sundberg JP, Ghim S (2001) Human papillomavirus and skin cancer. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6: 203-206.
120. Moloney FJ, Comber H, O'Lorcain P, O'Kelly P, Conlon PJ, et al. (2006) A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 154: 498-504.
121. Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, et al. (2006) Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust* 184: 6-10.
122. Akgul B, Cooke JC, Storey A (2006) HPV-associated skin disease. *J Pathol* 208: 165-175.
123. Ruhland A, de Villiers EM (2001) Opposite regulation of the HPV 20-URR and HPV 27-URR promoters by ultraviolet irradiation and cytokines. *Int J Cancer* 91: 828-834.
124. Purdie KJ, Pennington J, Proby CM, Khalaf S, de Villiers EM, et al. (1999) The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J* 18: 5359-5369.
125. Pfister H, Fuchs PG, Majewski S, Jablonska S, Pniewska I, et al. (2003) High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population. *Arch Dermatol Res* 295: 273-279.
126. de Koning MN, ter Schegget J, Eekhof JA, Kamp M, Kleter B, et al. (2010) Evaluation of a novel broad-spectrum PCR-multiplex genotyping assay for identification of cutaneous wart-associated human papillomavirus types. *J Clin Microbiol* 48: 1706-1711.
127. Hagiwara K, Uezato H, Arakaki H, Nonaka S, Nonaka K, et al. (2005) A genotype distribution of human papillomaviruses detected by polymerase chain reaction and direct sequencing analysis in a large sample of common warts in Japan. *J Med Virol* 77: 107-112.
128. Porro AM, Alchorne MM, Mota GR, Michalany N, Pignatari AC, et al. (2003) Detection and typing of human papillomavirus in cutaneous warts of patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Br J Dermatol* 149: 1192-1199.
129. Rubben A, Kalka K, Spelten B, Grussendorf-Conen EI (1997) Clinical features and age distribution of patients with HPV 2/27/57-induced common warts. *Arch Dermatol Res* 289: 337-340.
130. Hosnjak L, Kocjan BJ, Pirs B, Seme K, Poljak M (2015) Characterization of two novel gammapapillomaviruses, HPV179 and HPV184, isolated from common warts of a renal-transplant recipient. *PLoS One* 10: e0119154.
131. Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, et al. (2000) Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 61: 289-297.
132. Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, Proby CM, Bordea C, et al. (2004) Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol* 150: 949-957.
133. Forslund O, Ly H, Higgins G (2003) Improved detection of cutaneous human papillomavirus DNA by single tube nested 'hanging droplet' PCR. *J Virol Methods* 110: 129-136.
134. Ekstrom J, Muhr LS, Bzhalava D, Soderlund-Strand A, Hultin E, et al. (2013) Diversity of human papillomaviruses in skin lesions. *Virology* 447: 300-311.
135. Bzhalava D, Muhr LS, Lagheden C, Ekstrom J, Forslund O, et al. (2014) Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci Rep* 4: 5807.
136. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G (2013) A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 445: 224-231.

137. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, Holmgren V, Simon M, et al. (2003) Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 84: 1881-1886.
138. Chouhy D, Gorosito M, Sanchez A, Serra EC, Bergero A, et al. (2010) New generic primer system targeting mucosal/genital and cutaneous human papillomaviruses leads to the characterization of HPV 115, a novel Beta-papillomavirus species 3. *Virology* 397: 205-216.
139. Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG (2000) The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* 74: 11636-11641.
140. Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG (2003) General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol* 41: 2509-2514.
141. Forslund O, Lindelof B, Hradil E, Nordin P, Stenquist B, et al. (2004) High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of skin tumors but not in "Stripped" biopsies from the same tumors. *J Invest Dermatol* 123: 388-394.
142. Chen AC, McMillan NA, Antonsson A (2008) Human papillomavirus type spectrum in normal skin of individuals with or without a history of frequent sun exposure. *J Gen Virol* 89: 2891-2897.
143. Borgogna C, Lanfredini S, Peretti A, De Andrea M, Zavattaro E, et al. (2014) Improved detection reveals active beta-papillomavirus infection in skin lesions from kidney transplant recipients. *Mod Pathol* 27: 1101-1115.
144. de Koning MN, Struijk L, Bavinck JN, Kleter B, ter Schegget J, et al. (2007) Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *J Gen Virol* 88: 1489-1495.
145. Hazard K, Karlsson A, Andersson K, Ekberg H, Dillner J, et al. (2007) Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol* 127: 116-119.
146. Antonsson A, Pawlita M, Feltkamp MC, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S, et al. (2013) Longitudinal study of seroprevalence and serostability of the human polyomaviruses JCv and BKv in organ transplant recipients. *J Med Virol* 85: 327-335.
147. Bottalico D, Chen Z, Dunne A, Ostolozza J, McKinney S, et al. (2011) The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis* 204: 787-792.
148. Chen Z, DeSalle R, Schiffman M, Herrero R, Burk RD (2009) Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *J Virol* 83: 1443-1455.
149. Ostrbenk A, Kocjan BJ, Hosnjak L, Li J, Deng Q, et al. (2015) Identification of a Novel Human Papillomavirus, Type HPV199, Isolated from a Nasopharynx and Anal Canal, and Complete Genomic Characterization of Papillomavirus Species Gamma-12. *PLoS One* 10: e0138628.
150. Gottschling M, Stamatakis A, Nindl I, Stockfleth E, Alonso A, et al. (2007) Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Mol Biol Evol* 24: 1242-1258.
151. Gottschling M, Goker M, Stamatakis A, Bininda-Emonds OR, Nindl I, et al. (2011) Quantifying the phylodynamic forces driving papillomavirus evolution. *Mol Biol Evol* 28: 2101-2113.
152. Carvajal-Rodriguez A (2008) Detecting recombination and diversifying selection in human alpha-papillomavirus. *Infect Genet Evol* 8: 689-692.
153. Rector A, Stevens H, Lacave G, Lemey P, Mostmans S, et al. (2008) Genomic characterization of novel dolphin papillomaviruses provides indications for recombination within the Papillomaviridae. *Virology* 378: 151-161.

154. Hu J, Cladel NM, Budgeon L, Balogh KK, Christensen ND (2009) Papillomavirus DNA complementation in vivo. *Virus Res* 144: 117-122.
155. Orav M, Henno L, Isok-Paas H, Geimanen J, Ustav M, et al. (2013) Recombination-dependent oligomerization of human papillomavirus genomes upon transient DNA replication. *J Virol* 87: 12051-12068.
156. Narechania A, Chen Z, DeSalle R, Burk RD (2005) Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses. *J Virol* 79: 15503-15510.
157. Varsani A, van der Walt E, Heath L, Rybicki EP, Williamson AL, et al. (2006) Evidence of ancient papillomavirus recombination. *J Gen Virol* 87: 2527-2531.
158. Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, et al. (2014) Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 383: 524-532.
159. Shah SD, Doorbar J, Goldstein RA (2010) Analysis of host-parasite incongruence in papillomavirus evolution using importance sampling. *Mol Biol Evol* 27: 1301-1314.
160. Woolford L, Rector A, Van Ranst M, Ducki A, Bennett MD, et al. (2007) A novel virus detected in papillomas and carcinomas of the endangered western barred bandicoot (*Perameles bougainville*) exhibits genomic features of both the Papillomaviridae and Polyomaviridae. *J Virol* 81: 13280-13290.
161. Jiang M, Xi LF, Edelstein ZR, Galloway DA, Olsem GJ, et al. (2009) Identification of recombinant human papillomavirus type 16 variants. *Virology* 394: 8-11.
162. Madan V, Lear JT, Szeimies RM (2010) Non-melanoma skin cancer. *Lancet* 375: 673-685.
163. Diepgen TL, Mahler V (2002) The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 146 Suppl 61: 1-6.
164. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, et al. (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287: 2114-2119.
165. Manos M, Ting Y, Wright D, Lewis A, Broker T, et al. (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7: 209-214.
166. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, et al. (1991) Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 265: 472-477.
167. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.
168. Chouhy D, Gil LB, Nocito AL, Wojdyla D, Ornella L, et al. (2006) Development and evaluation of a colorimetric PCR system for the detection and typing of human papillomaviruses. *Int J Mol Med* 18: 995-1003.
169. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, et al. (1994) Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 169: 235-240.
170. Walsh EE, Falsey AR, Swinburne IA, Formica MA (2001) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults: use of a single-tube "hanging droplet" nested PCR. *J Med Virol* 63: 259-263.
171. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
172. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9: 772.
173. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29: 1969-1973.
174. Garcia-Vallve S, Alonso A, Bravo IG (2005) Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends Microbiol* 13: 514-521.

175. Garcia-Perez R, Ibanez C, Godinez JM, Arechiga N, Garin I, et al. (2014) Novel papillomaviruses in free-ranging Iberian bats: no virus-host co-evolution, no strict host specificity, and hints for recombination. *Genome Biol Evol* 6: 94-104.
176. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
177. Martin DM, B; Golden, M; Khoosal, A and Muhire, B. (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1: vev003
178. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-225.
179. Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C (2005) A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21: 98-102.
180. Smith JM (1992) Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34: 126-129.
181. Posada D, Crandall KA (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13757-13762.
182. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2000) Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16: 573-582.
183. Boni MF, Posada D, Feldman MW (2007) An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176: 1035-1047.
184. Sambrook J, Russell DW (2006) *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v, 800 p. p.
185. Mateos Lindemann ML, Sanchez Calvo JM, Chacon de Antonio J, Sanz I, Diaz E, et al. (2011) Prevalence and Distribution of High-Risk Genotypes of HPV in Women with Severe Cervical Lesions in Madrid, Spain: Importance of Detecting Genotype 16 and Other High-Risk Genotypes. *Advances in Preventive Medicine Volume 2011, Article ID 269468*, 4 pages.
186. Wheeler CM, Castellsague X, Garland SM, Szarewski A, Paavonen J, et al. (2012) Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol* 13: 100-110.
187. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, et al. (1999) Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 354: 20-25.
188. Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, et al. (2005) A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 191: 182-192.
189. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, et al. (2008) Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 168: 123-137.
190. Dubina M, Goldenberg G (2009) Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review. *Am J Dermatopathol* 31: 561-573.
191. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A (2000) Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 14: 3065-3073.
192. Forslund O (2007) Genetic diversity of cutaneous human papillomaviruses. *J Gen Virol* 88: 2662-2669.
193. Abarca JF, Casiccia CC (2002) Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18: 294-302.

194. Antonsson A, Waterboer T, Bouwes Bavinck JN, Abeni D, de Koning M, et al. (2013) Longitudinal study of seroprevalence and serostability of 34 human papillomavirus types in European organ transplant recipients. *Virology* 436: 91-99.
195. Gottschling M, Goker M, Kohler A, Lehmann MD, Stockfleth E, et al. (2009) Cutaneotropic human beta-/gamma-papillomaviruses are rarely shared between family members. *J Invest Dermatol* 129: 2427-2434.
196. Antonsson A, Hansson BG (2002) Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J Virol* 76: 12537-12542.
197. Bolatti E, Chouhy D, Casal PE, Pérez GR, Stella EJ, et al. (2015) Characterization of novel human papillomavirus types 157, 158 and 205 in healthy skin: clues for recombination in gamma-PV genus. *Virology* (enviado).
198. Fanning AS, Anderson JM (1999) PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103: 767-772.
199. Kohler A, Gottschling M, Manning K, Lehmann MD, Schulz E, et al. (2011) Genomic characterization of ten novel cutaneous human papillomaviruses from keratotic lesions of immunosuppressed patients. *J Gen Virol* 92: 1585-1594.
200. Titolo S, Pelletier A, Sauve F, Brault K, Wardrop E, et al. (1999) Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *J Virol* 73: 5282-5293.
201. Ullman CG, Haris PI, Galloway DA, Emery VC, Perkins SJ (1996) Predicted alpha-helix/beta-sheet secondary structures for the zinc-binding motifs of human papillomavirus E7 and E6 proteins by consensus prediction averaging and spectroscopic studies of E7. *Biochem J* 319 (Pt 1): 229-239.
202. Radulescu RT, Bellitti MR, Ruvo M, Cassani G, Fassina G (1995) Binding of the LXCXE insulin motif to a hexapeptide derived from retinoblastoma protein. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 97-102.
203. WHO (2015) Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014-Recommendations. *Vaccine* 33: 4383-4384.
204. Steinau M, Onyekwuluje JM, Scarbrough MZ, Unger ER, Dillner J, et al. (2012) Performance of commercial reverse line blot assays for human papillomavirus genotyping. *J Clin Microbiol* 50: 1539-1544.
205. Klug SJ, Molijn A, Schopp B, Holz B, Iftner A, et al. (2008) Comparison of the performance of different HPV genotyping methods for detecting genital HPV types. *J Med Virol* 80: 1264-1274.
206. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, et al. (2013) Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer* 108: 908-913.
207. Wilkinson DE, Baylis SA, Padley D, Heath AB, Ferguson M, et al. (2010) Establishment of the 1st World Health Organization international standards for human papillomavirus type 16 DNA and type 18 DNA. *Int J Cancer* 126: 2969-2983.
208. Kornegay JR, Shepard AP, Hankins C, Franco E, Lapointe N, et al. (2001) Nonisotopic detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens using a consensus PCR and a generic probe mix in an enzyme-linked immunosorbent assay format. *J Clin Microbiol* 39: 3530-3536.
209. Nelson JH, Hawkins GA, Edlund K, Evander M, Kjellberg L, et al. (2000) A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 38: 688-695.
210. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, et al. (1994) Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction

- amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170: 1077-1085.
211. Abba MC, Gomez MA, Golijow CD (2003) [Human papillomavirus genotype distribution in cervical infections among woman in La Plata, Argentina]. *Rev Argent Microbiol* 35: 74-79.
 212. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, et al. (2008) Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26 Suppl 10: K1-16.
 213. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, et al. (2010) Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 202: 1789-1799.
 214. Deluca GD, Basiletti J, Gonzalez JV, Diaz Vasquez N, Lucero RH, et al. (2012) Human papilloma virus risk factors for infection and genotype distribution in aboriginal women from Northern Argentina. *Medicina (B Aires)* 72: 461-466.
 215. Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Nardari W, Mampaey M, et al. (2004) Human papillomavirus cervical infection in Guarani Indians from the rainforest of Misiones, Argentina. *Int J Infect Dis* 8: 13-19.
 216. Meloni A, Pilia R, Campagna M, Usai A, Masia G, et al. (2014) Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus infection in italian women with cervical cytological abnormalities. *J Public Health Res* 3: 157.
 217. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, Garcia PJ, et al. (2008) Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine* 26 Suppl 11: L16-36.
 218. Baseman JG, Koutsky LA (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32 Suppl 1: S16-24.
 219. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL (2006) Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/42-51.
 220. Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Osler M, Iftner T (2010) Persistence of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women. *J Med Virol* 82: 616-623.
 221. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, et al. (2006) Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 354: 2645-2654.
 222. UICC (2006) International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 119: 1108-1124.
 223. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, et al. (2006) Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1274-1280.
 224. Quint W, Molijn A, Colau A ea (2009) One HPV Virus, one lesion as determined by LCM/PCR technology. Malmo , Sweden pp Abstract O-0604: 06.03.
 225. van der Marel J, Quint WG, Schiffman M, van de Sandt MM, Zuna RE, et al. (2012) Molecular mapping of high-grade cervical intraepithelial neoplasia shows etiological dominance of HPV16. *Int J Cancer* 131: E946-953.
 226. Kjaer SK, Munk C, Winther JF, Jorgensen HO, Meijer CJ, et al. (2005) Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1528-1533.
 227. Mendez F, Munoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, et al. (2005) Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis* 192: 1158-1165.

228. Thomas KK, Hughes JP, Kuypers JM, Kiviat NB, Lee SK, et al. (2000) Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. *J Infect Dis* 182: 1097-1102.
229. Tota JE, Ramanakumar AV, Jiang M, Dillner J, Walter SD, et al. (2013) Epidemiologic approaches to evaluating the potential for human papillomavirus type replacement postvaccination. *Am J Epidemiol* 178: 625-634.
230. Stanley M, Lowy DR, Frazer I (2006) Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/106-113.
231. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, et al. (2002) Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 325: 572.
232. Gonzalez DI, Jr., Zahn CM, Retzlaff MG, Moore WF, Kost ER, et al. (2001) Recurrence of dysplasia after loop electrosurgical excision procedures with long-term follow-up. *Am J Obstet Gynecol* 184: 315-321.
233. Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, de Schipper FA, et al. (2004) HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv* 59: 543-553.
234. Kim YT, Lee JM, Hur SY, Cho CH, Kim YT, et al. (2010) Clearance of human papillomavirus infection after successful conization in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 126: 1903-1909.
235. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, et al. (2005) The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 337: 76-84.
236. Schiffman M, Glass AG, Wentzensen N, Rush BB, Castle PE, et al. (2011) A long-term prospective study of type-specific human papillomavirus infection and risk of cervical neoplasia among 20,000 women in the Portland Kaiser Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 1398-1409.
237. Wheeler CM, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, et al. (2009) The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in sexually active women aged 16-26 years. *J Infect Dis* 199: 936-944.
238. Ure AE, Forslund O (2014) Characterization of human papillomavirus type 154 and tissue tropism of gammapapillomaviruses. *PLoS One* 9: e89342.
239. Phan TG, Vo NP, Aronen M, Jartti L, Jartti T, et al. (2013) Novel human gammapapillomavirus species in a nasal swab. *Genome Announc* 1: e0002213.
240. Arroyo Muhr LS, Hultin E, Bzhalava D, Eklund C, Lagheden C, et al. (2015) Human papillomavirus type 197 is commonly present in skin tumors. *Int J Cancer* 136: 2546-2555.
241. Menzo S, Monchetti A, Trozzi C, Ciavattini A, Carloni G, et al. (2001) Identification of six putative novel human papillomaviruses (HPV) and characterization of candidate HPV type 87. *J Virol* 75: 11913-11919.
242. Delius H, Hofmann B (1994) Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 186: 13-31.
243. Terai M, Burk RD (2002) Identification and characterization of 3 novel genital human papillomaviruses by overlapping polymerase chain reaction: candHPV89, candHPV90, and candHPV91. *J Infect Dis* 185: 1794-1797.
244. Luccini E, Cede A., Piacentini R., Villanueva C., Canziani P (2006) Ultraviolet climatology over Argentina. *JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH* 111.
245. Forslund O, Iftner T, Andersson K, Lindelof B, Hradil E, et al. (2007) Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis* 196: 876-883.

246. Zakrzewska K, Regalbuto E, Pierucci F, Arvia R, Mazzoli S, et al. (2012) Pattern of HPV infection in basal cell carcinoma and in perilesional skin biopsies from immunocompetent patients. *Viol J* 9: 309.
247. Akgul B, Lemme W, Garcia-Escudero R, Storey A, Pfister HJ (2005) UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *Arch Virol* 150: 145-151.
248. Jackson S, Storey A (2000) E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 19: 592-598.
249. Struijk L, van der Meijden E, Kazem S, ter Schegget J, de Gruijl FR, et al. (2008) Specific betapapillomaviruses associated with squamous cell carcinoma of the skin inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes. *J Gen Virol* 89: 2303-2314.
250. Quint KD, Genders RE, de Koning MN, Borgogna C, Gariglio M, et al. (2015) Human Beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *J Pathol* 235: 342-354.
251. Bouwes Bavinck JN, Neale RE, Abeni D, Euvrard S, Green AC, et al. (2010) Multicenter study of the association between betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 70: 9777-9786.
252. Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, Stern JE, Argenyi ZB, et al. (2008) Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 128: 1409-1417.
253. van Doorn LJ, Molijn A, Kleter B, Quint W, Colau B (2006) Highly effective detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA by a testing algorithm combining broad-spectrum and type-specific PCR. *J Clin Microbiol* 44: 3292-3298.
254. Proby CM, Harwood CA, Neale RE, Green AC, Euvrard S, et al. (2011) A case-control study of betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in organ transplant recipients. *Am J Transplant* 11: 1498-1508.
255. Plasmeijer EI, Neale RE, de Koning MN, Quint WG, McBride P, et al. (2009) Persistence of betapapillomavirus infections as a risk factor for actinic keratoses, precursor to cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 69: 8926-8931.
256. Hsu JY, Chen AC, Keleher A, McMillan NA, Antonsson A (2009) Shared and persistent asymptomatic cutaneous human papillomavirus infections in healthy skin. *J Med Virol* 81: 1444-1449.
257. Pamphilon DH, Alnaqdy AA, Wallington TB (1991) Immunomodulation by ultraviolet light: clinical studies and biological effects. *Immunol Today* 12: 119-123.
258. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA (2009) The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol* 9: 57-62.
259. Forslund O, Antonsson A, Higgins G, Ly H, Delius H, et al. (2003) Nucleotide sequence and phylogenetic classification of candidate human papilloma virus type 92. *Virology* 312: 255-260.
260. Martin E, Dang J, Bzhalava D, Stern J, Edelstein ZR, et al. (2014) Characterization of three novel human papillomavirus types isolated from oral rinse samples of healthy individuals. *J Clin Virol* 59: 30-37.
261. Egawa K, Delius H, Matsukura T, Kawashima M, de Villiers EM (1993) Two novel types of human papillomavirus, HPV 63 and HPV 65: comparisons of their clinical and histological features and DNA sequences to other HPV types. *Virology* 194: 789-799.
262. Egawa K, Kimmel R, De Villiers EM (2005) A novel type of human papillomavirus (HPV 95): comparison with infections of closely related human papillomavirus types. *Br J Dermatol* 153: 688-689.
263. Kovanda A, Kocjan BJ, Luzar B, Bravo IG, Poljak M (2011) Characterization of novel cutaneous human papillomavirus genotypes HPV-150 and HPV-151. *PLoS One* 6: e22529.
264. Cavatorta AL, Fumero G, Chouhy D, Aguirre R, Nocito AL, et al. (2004) Differential expression of the human homologue of drosophila discs large oncosuppressor in histologic

- samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *Int J Cancer* 111: 373-380.
265. Holloway A, Storey A (2014) A conserved C-terminal sequence of high-risk cutaneous beta-human papillomavirus E6 proteins alters localization and signalling of beta1-integrin to promote cell migration. *J Gen Virol* 95: 123-134.
266. Vasiljevic N, Hazard K, Dillner J, Forslund O (2008) Four novel human betapapillomaviruses of species 2 preferentially found in actinic keratosis. *J Gen Virol* 89: 2467-2474.
267. Ma Y, Madupu R, Karaoz U, Nossa CW, Yang L, et al. (2014) Human papillomavirus community in healthy persons, defined by metagenomics analysis of human microbiome project shotgun sequencing data sets. *J Virol* 88: 4786-4797.
268. Martin D, Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B. (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1: 1-5.
269. Stamatakis A, Aberer AJ, Goll C, Smith SA, Berger SA, et al. (2012) RAXML-Light: a tool for computing terabyte phylogenies. *Bioinformatics* 28: 2064-2066.
270. Bravo IG, Alonso A (2007) Phylogeny and evolution of papillomaviruses based on the E1 and E2 proteins. *Virus Genes* 34: 249-262.

Anexo I

**Aprobaciones de los comités de ética,
consentimientos escritos e informados y
cuestionarios realizados por los
participantes**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACEUTICAS
Suipacha 531 - S2002LRK Rosario - Argentina
Teléfono Fax: 54 (0341) 480-4592/3



“2012 – AÑO DE HOMENAJE AL DR. MANUEL BELGRANO”

Expediente N° 6060/134
Rosario, 18 de junio de 2012.-

VISTO el presente Expediente, mediante el cual la Dra. Adriana Giri eleva su proyecto titulado: “Epidemiología molecular de las infecciones causadas por papillomavirus humanos en diferentes epitelios para la identificación y caracterización de nuevos virus”, y

CONSIDERANDO:

Que la Comisión de Bioética de esta Facultad luego de la evaluación del referido proyecto informa que cumple con los requerimientos de dicha Comisión, según el Acta cuya copia corre agregada a la presente.

Por ello,

**EL DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
RESUELVE:**

ARTICULO 1°.- Ratificar la aprobación en lo que respecta a los aspectos bioéticos del Proyecto presentado por la Dra. Adriana GIRI, titulado: “**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR PAPILOMAVIRUS HUMANOS EN DIFERENTES EPITELIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS VIRUS**”.

ARTICULO 2°.- Regístrese, comuníquese y archívese.

RESOLUCION N° 324/2012.-

Fdo.) Dr. Esteban C. Serra-Decano

ES COPIA

DR. ESTEBAN C. SERRA-DECANO
Decano de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas



UNR

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Suipacha 531 - S2002LRK Rosario - Argentina | +54 (0) 341- 4804592/3 | www.fbioyf.unr.edu.ar

2013 - Año del Bicentenario de la Asamblea General Constituyente de 1813

Expediente N° 6060/134-A

Rosario, 22 de julio de 2013.-

VISTO el presente Expediente, mediante el cual la Dra. Adriana GIRI eleva el proyecto de Investigación titulado: "Epidemiología molecular de las infecciones causadas por papillomavirus humanos en diferentes epitelios para la identificación y caracterización de nuevos virus"; y

CONSIDERANDO:

Que la Comisión de Bioética de esta Facultad luego de la evaluación del referido proyecto informa que cumple con los requerimientos de dicha Comisión.

Por ello,

**EL DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
RESUELVE:**

ARTICULO 1°.- Ratificar la aprobación en lo que respecta a los aspectos bioéticos del Proyecto de Investigación presentado por la Dra. Adriana GIRI titulado: "EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR PAPILOMAVIRUS HUMANOS EN DIFERENTES EPITELIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS VIRUS".

ARTICULO 2°.- Regístrese, comuníquese y archívese.

RESOLUCION N° 418/2013.-

Fdo.) Dr. Esteban C. Serra- Decano

ES COPIA

GRACIELA CONTRERAS
Directora de Reg. Despacho



Comité de Bioética
 Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
 Suipacha 531 - S2002LRK Rosario - Argentina
 Teléfono/Fax: 54 (0341) 480-4599
 Correo electrónico: secyt@fbioyf.unr.edu.ar



Referencia : Expte. N° 6060/077

Rosario, 15 de mayo de 2009.-

En el día de la fecha se reúne el Comité de Bioética a fin de revisar el proyecto presentado por la Dra. Adriana Giri: "Importancia de las infecciones por papillomavirus humanos en los proceso de transformación maligna" Expte. 6060/077

Tras el análisis de la documentación la Comisión acuerda que la información remitida cumple con los requisitos para su desarrollo, por tanto se resuelve su aprobación por considerarlo éticamente aceptable.

Por lo anteriormente expuesto, notifíquese a la interesada.

Sin otro particular se imprimen dos copias a igual efecto y del mismo tenor


 LUQUE, A.



 E. Garcia


 E. S. Sánchez


 Gabriela Larrea



 M. Pires

Firma, Aclaración y fecha de notificación


 ADRIANA GIRI
 4/6/2009

Granadero Baigorria, 27 de Diciembre de 2005
Ref. Expte. N° 5661/26

Por Mesa de Entradas solicítese al Dr. MAMPRIN cumplimente lo solicitado por el Comité de Docencia e Investigación sobre el proyecto "Análisis del estado físico del ADN de papillomavirus humanos de alto riesgo como marcador de progresión maligna" en providencia fecha 01/12/05.-


Dr. José Carlos López
MAT. N° 7147
DIRECTOR
Hospital Escuela "Eva Perón"

HOSPITAL ESCUELA
"EVA PERÓN"
28 DIC 2005
MESA DE ENTRADA
--ENTRO--

HOSPITAL ESCUELA
"EVA PERÓN"
24 ABR 2006
MESA DE ENTRADA
Bocefulco for

3/5/6 Depregos men modelos antiech
-funda


SUSÉN MAMPRIN D'ANDREA
Médico Tocoginecólogo
M.P. 12677 - R.E. 50137

Ref. Expte.

Granadero Baigorria, 1 de diciembre de 2005

En reunión de Comité de Docencia e Investigación del 1/12/05 se toma conocimiento de nota presentada por el Dr. Rubén Mamprin D'Andrea, Tocoginecólogo, por la cual solicita se considere el proyecto de título "Análisis del estado físico del ADN de papillomavirus humanos de alto riesgo como marcador de progresión maligna". Se analiza el mismo y se aprueba. Se solicita al Investigador Principal que quede aclarado en el Consentimiento Informado la no afectación de los derechos previstos para el paciente y que el mismo por participar en el estudio no percibirá remuneración alguna.

HOSPITAL ESCUELA
"EVA PERÓN"
- 5 DIC 2005
CASA DE ENTRADAS
Pasa a: *R. Mamprin*

J. Grueco
Dr. Juan Carlos A. Grueco
DIRECTOR ASOCIADO MEDICO
Hospital Escuela "Eva Perón"

*Para conocimiento
y análisis nuevo consentimiento
Según sugerencia*

HOSPITAL ESCUELA
"EVA PERÓN"
- 7 DIC 2005
CASA DE ENTRADAS
--ENTRO--

J. Grueco

**ESTUDIO DE PREVALENCIA DE INFECCION POR HPV
EN MUJERES DEL SUR DE LA PROVINCIA DE SANTA FE**

Hospital Escuela Eva Perón. G. B.
Departamento de Patología Cervical

Area Virología. Fac. Cs.Bqcas. y F.
I.B.R. Univ. Nac. de Rosario

Código Paciente:..... Domicilio:.....

Fecha Ingreso .../.../... HC.....

Edad..... Alfabeta S N Años de Escolaridad.....

Trabaja S N Dentro de la casa? S N Con Recibo S N

Gestas.....Partos.....Abortos.....Cesáreas..... Edad Gestacional semanas

Fecha de la última menstruación .../.../.....

Fecha del último parto .../.../.....

Menarcaaños Tabaquismo S N Tiempo

Inicio R. S.años N° de parejas sexuales en los últimos 3 años

Nueva pareja sexual en el último año S N

MAC mas usado..... Tiempo

MAC actual Tiempo.....

Antecedentes Quirúrgicos

Antecedentes Clínicos

Antecedentes de ITS

Retrovirus Positivo Negativo

Estado Vacunación HPV

N° de PAPs realizados Tiempo desde último PAP negativo

PAP ingreso al protocolo

Médico responsable de ingreso al protocolo:

CONSENTIMIENTO ESCRITO INFORMADO

(Expte. N° 6060/050 - Expte. N° 5858/1)

Se la invita a participar en un estudio encaminado a determinar la presencia de papillomavirus humanos en mucosa de cuello de útero.

Los papillomavirus humanos son virus que se transmiten por contacto sexual y producen lesiones (tipo verruga) en las mucosas que infectan. Si bien la mayoría de estos microbios no producen enfermedad, existen algunos tipos que sí lo hacen aumentando la probabilidad de desarrollar tumores. Por lo tanto es importante identificar el tipo de papillomavirus que afecta la lesión para aplicar tratamientos terapéuticos adecuados.

Usted ha sido seleccionada como candidata a participar de esta investigación en razón que Ud. ha presentado o presenta lesiones asociadas a papillomavirus. Si Ud. decide participar en este estudio, la muestra que se le tomará para el Papanicolaou o para análisis histológico será también utilizada para el análisis que permite determinar la presencia de papillomavirus humanos en mucosa de cuello de útero. Todos sus datos serán guardados en forma confidencial y su nombre no será revelado. Tanto su decisión de participar o no en este estudio como su renuncia al mismo en cualquier momento no afectarán su derechos como paciente a ser tratada y controlada.

Cabe aclarar que Ud. no recibirá remuneración alguna por participar en este estudio.

Yo,....., manifiesto que he sido informada de lo expresado más arriba y otorgo mi consentimiento de participar voluntariamente en la investigación titulada “Importancia de las infecciones por papillomavirus humanos en los procesos de transformación maligna”.

Fecha:

Firma y Aclaración del Paciente

Firma y Aclaración del Testigo

.....
Firma del Investigador Responsable

Dra. Adriana Giri

Profesora Adjunta

Area Virología

IBR-Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Suipacha 531, 2000 Rosario

TE: +54-0341-435 6369 Interno 134

Fax: +54-0341-439 0465

agiri@fbioyf.unr.edu.ar

.....
Firma del Ginecólogo Responsable

Dr. Rubén Mamprín D'Andrea

Ginecólogo

Servicio de Patología Cervical

Hospital Escuela “Eva Perón”

San Martín 2146

Granadero Baigorria

TE: +54-0341-471 0940

Fax: +54-0341-471 3815

rmamprin@yahoo.com.ar

Cuestionario

“Epidemiología molecular de las infecciones causadas por papillomavirus humanos en diferentes epitelios para la identificación y caracterización de nuevos virus”

Nombre del Voluntario:

Código del Voluntario:

Género:

Edad:

E-mail:

Lugar de Nacimiento:

¿Recibe tratamiento inmunosupresor?

SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	
Otro	<input type="checkbox"/>	Transplante Renal	<input type="checkbox"/>	Enfermedad Autoinmune <input type="checkbox"/>

Si respondió SI, indique la causa

Tiempo con tratamiento inmunosupresor

¿Se expone regularmente al sol o luz artificial?

¿Cuántas horas por semana?

¿Utiliza protector solar?

Sol	<input type="checkbox"/>	luz artificial	<input type="checkbox"/>	Ninguno	<input type="checkbox"/>
Hs	<input type="checkbox"/>	Primavera	<input type="checkbox"/>	Verano	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	Otoño	<input type="checkbox"/>	Invierno	<input type="checkbox"/>
SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	Factor?	<input type="checkbox"/>

CONSENTIMIENTO ESCRITO INFORMADO

Se invita a Ud. a participar en un estudio encaminado a determinar la presencia y permanencia de papillomavirus humanos en piel.

Los papillomavirus humanos que infectan la piel son virus altamente prevalentes en la piel sana, donde establecen infecciones que en su mayoría no producen enfermedad.

Si Ud. decide participar en este estudio, se le tomarán muestras con un hisopo húmedo de una zona de la piel expuesta al sol (frente). Para poder determinar la permanencia de los papillomavirus humanos se tomará una muestra cada 3 meses por un período de 1 año (4 muestras totales).

Todos sus datos serán guardados en forma confidencial y su nombre no será revelado en caso de inspección. Tanto su decisión de participar o no en este estudio como su renuncia en cualquier momento no afectarán sus derechos de confidencialidad.

Yo,....., manifiesto que he sido informado/a de lo expresado más arriba y otorgo mi consentimiento de participar voluntariamente en la investigación titulada “Epidemiología molecular de las infecciones causadas por papillomavirus humanos en diferentes epitelios para la identificación y caracterización de nuevos virus”.

Fecha:

Firma del participante

Aclaración del participante

.....
Firma del Investigador Responsable
Dra. Adriana Giri
Profesora Adjunta
Area Virología
IBR-Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario
Suipacha 531, 2000 Rosario
TE: +54-0341-435 0661 Interno 134
Fax: +54-0341-439 0465
giri@ibr-conicet.gov.ar

Anexo II

**Certificado de competencia del sistema
L1HPVPCR 16.4 otorgado por la WHO HPV
LabNet en los años 2013-2014**



**Karolinska
Institutet**

WHO HPV LabNet
International HPV Reference Center
Sweden



Professor Joakim Dillner

**WHO HPV Laboratory Network (LabNet)
HPV DNA Proficiency Study 2013**

Dr Adriana Giri
IBR-Conicet / School of Biochemistry and Pharmaceutical Sciences
Rosario National University, Suipacha 531
2000 Rosario
Argentina

We appreciate your participation in the WHO HPV LabNet Proficiency Study.

Herewith, we enclose the results of your laboratory in the testing of the 2013 WHO HPV LabNet HPV DNA proficiency panel.

A test is regarded as proficient in typing if it can detect 50 International Units (IU) / 5 µl of HPV 16 and HPV 18 DNA, and 500 genome equivalents (GE) / 5 µl of the other HPV types included in the panel both in samples with single and multiple plasmids.
In addition, the specificity of the reported types should be >97 % (i.e. at most 1 false positive result).

Accordingly, your data set using the L1HPVPCR 16.4 assay is proficient for detection of HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 66, 68b

Should you have any technical questions, please contact Dr Joakim Dillner at joakim.dillner@ki.se.

An overall summary report of this proficiency study will be prepared and sent to you in due course.

Sincerely Yours

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joakim Dillner', written over a horizontal line.

Joakim Dillner

**International HPV Reference Center, Karolinska Institutet, Department of Laboratory Medicine,
Karolinska University Hospital Huddinge, 141 86 Stockholm, Sweden**

Visiting address Division of Pathology, F56

Phone +46 8 58581168 Fax +46 8 58587730 E-mail Joakim.Dillner@ki.se

Reg. nr.: SE202100297301

Annex 1: Your results in relation to the contents of the proficiency panel.

Panel ID	HPV type(s) in the panel	Content (IU or GE per 5 µl)	Your results L1HPVPCR 16.4 5 µl input volume
1	58	50	58
2	18	50	18
3	39, 45, 52, 56, 68b	500	39, 45, 52, 56, 68
4	33	50	33
5	52	500	52
6	68b	500	68
7	6	500	6
8	39	50	Negative
9	66	500	66
10	35, 59, 66, 68a	500	35, 66
11	16	50	16
12	31	50	31
13	52	50	52
14	68a	500	Negative
15	negative	0	Negative
16	51	500	Negative
17	31	500	31
18	11, 31, 33, 58	500	11, 31, 33, 58
19	56	50	56
20	68b	50	68
21	35, 59, 66, 68a	50	35, 66
22	6	50	6
23	45	50	45
24	59	50	Negative
25	39, 45, 52, 56, 68b	50	39, 45, 52, 56, 68
26	18	50	18
27	35	50	35
28	59	500	Negative
29	6, 16, 18, 51	500	6, 16, 18
30	16	5	16
31	35	500	35
32	58	500	58
33	11, 31, 33, 58	50	11, 31, 33, 58
34	11	50	11
35	45	500	45
36	66	50	66
37	6, 16, 18, 51	50	6, 16, 18
38	11	500	11
39	33	500	33
40	39	500	39
41	56	500	56
42	68a	50	Negative
43	51	50	Negative
A	none	0	Negative
B	16	2500	16
C	16	25	Negative



**Karolinska
Institutet**

WHO HPV LabNet
International HPV Reference Center
Sweden



Professor Joakim Dillner

**WHO HPV Laboratory Network (LabNet)
HPV DNA Proficiency Study 2014**

ADRIANA A. GIRI
VIROLOGY AREA/MICROBIOLOGY
SUIPACHA 590
2000 ROSARIO
ARGENTINA

We appreciate your participation in the WHO HPV LabNet Proficiency Study.

Herewith, we enclose the results of your laboratory in the testing of the 2014 HPV LabNet HPV DNA proficiency panel.

A test is regarded as proficient in typing if it can detect 50 International Units (IU) / 5 µl of HPV 16 and HPV 18 DNA, and 500 genome equivalents (GE) / 5 µl of the other HPV types included in the panel both in samples with single and multiple plasmids.
In addition, the specificity of the reported types should be >97 % (i.e. at most 1 false positive result).

Accordingly, your data set using the L1.HPV PCR 16.4 assay is proficient for detection of HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66, and 68b.

Should you have any technical questions, please contact Dr Joakim Dillner at joakim.dillner@ki.se.

An overall summary report of this proficiency study will be prepared and sent to you in due course.

Sincerely Yours

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joakim Dillner', written over a horizontal line.

Joakim Dillner

International HPV Reference Center, Karolinska Institutet, Department of Laboratory Medicine,
Karolinska University Hospital Huddinge, 141 86 Stockholm, Sweden
Visiting address Division of Pathology, F56
Phone +46 8 58581168 Fax +46 8 58587730 E-mail Joakim.Dillner@ki.se
Reg. nr.: SE202100297301

Annex 1: Your results in relation to the contents of the proficiency panel.

Panel ID	HPV type(s) in the panel	Content (IU or GE per 5 µl)	Your results L1 HPV PCR 16.4 5 µl input volume
1	16, 33, 45, 51	500	16-33-45
2	negative	0	Negative
3	51	50	Negative
4	16	50	16
5	39	500	39
6	58	500	58
7	35, 39, 59, 66, 68b	500	35-39-59-66-68
8	68a	500	Negative
9	51	500	Negative
10	31	500	31
11	16	5	16
12	35	50	35
13	66	50	66
14	6, 56, 58, 68a	50	56-58-6
15	11	50	11
16	45	50	45
17	58	50	58
18	68b	50	Negative
19	6	500	6
20	39	50	39
21	66	500	66
22	11, 18, 31, 52	50	11-18-31-52
23	31	50	31
24	56	500	56
25	68b	500	68
26	33	50	33
27	6, 56, 58, 68a	500	6-56-58
28	11	500	11
29	52	500	52
30	11, 18, 31, 52	500	11-18-31-52
31	18	5	Negative
33	59	50	Negative
34	35, 39, 59, 66, 68b	50	35-39-66-68
35	18	50	18
36	56	50	56
37	68a	50	Negative
38	6	50	6
39	59	500	59
41	16, 33, 45, 51	50	16-33-45
42	33	500	33
43	35	500	35
A	16	2500	16
B	16	25	16
C	none	0	NEGATIVE