

Evaluación de la exactitud diagnóstica para detección de anticuerpos contra la proteína L1 de VPH para estratificar mujeres con lesiones en cuello uterino.

Laura Melissa Torrado García

Trabajo de Grado para Optar el título de Magister en Microbiología

Director

Bladimiro Rincón Orozco

PhD. En Ciencias Naturales

Codirector

Ruth Aralí Martínez Vega

PhD. En Ciencias de la Salud Pública Enfermedades Infecciosas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2020

Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede

Jacques Yves Cousteau-

Dedicatoria

Quiero dedicar este logro mi padre Luis por enseñarme que la paciencia es un fruto que acompaña el éxito, a mi madre Edith, por la inspiración con la que me levanta cada día a no detenernos en el tren de nuestros sueños, A mi hermano Duván por dejarme proyectar con él el mundo que anhelamos y que cerca estamos de conquistar.

Agradecimientos

El agradecimiento es una virtud presente en quienes reconocemos la mano brindada.

Agradezco a Dios su amor y su gracia cada mañana porque en él están todos mis sueños y sin el ninguno sería posible.

A mis padres, por ser mi ejemplo y el motor por el que emprendo nuevos proyectos cada día.

A mi hermano, porque su apoyo es un pilar fundamental en mi vida y me siento responsable de construir para él un mundo mejor.

A mi abuelo, porque se lo feliz que le haría ver otra meta cumplida en mi vida.

A mi abuela porque en ella encuentro la sabiduría cuando han venido momentos en crisis.

A mis tíos y primos, por mantenernos siempre tan unidos y tan convencidos de que el mundo es nuestro y juntos siempre lo vamos a conquistar.

Al Dr. Bladimiro Rincón por su acompañamiento, motivación paciencia y dedicación en estos años de trabajo.

A la Dra. Ruth Martínez, por su apoyo incondicional, abnegación y dedicación sin límite a nuestros proyectos. Por ser una verdadera maestra, pero también una amiga sin reparos.

A Nathalia Jones por su absoluto apoyo e incondicional amistad, clave para cumplir este sueño.

A Romel Villamizar, su amistad, apoyo y sus oraciones me fortalecieron en los momentos críticos de este proceso.

Al doctor Simón Orostegui por su apoyo en la captación de las participantes del estudio.

A todos los docentes, compañeros de maestría por ser un verdadero equipo.

Tabla de contenido

Introducción.....	14
1. Objetivos.....	16
1.1 Objetivo general:.....	16
1.2 Objetivos específicos.....	16
2. Cuerpo del trabajo.....	17
2.1 Marco conceptual.....	17
2.1.1. Generalidades:.....	17
2.1.2. Estructura viral y ciclo de infección de VPH.....	19
2.1.3. Oncoproteínas Virales E6 y E7.....	21
2.1.4. Epidemiología del cáncer de cuello uterino.....	23
2.1.5. Clasificación general de lesiones causadas por VPH en cuello uterino.....	24
2.1.6. Problemas asociados al diagnóstico de lesiones premalignas y cáncer de cuello uterino...25	
2.1.7. Respuesta inmune frente a la infección por VPH.....	26
2.1.8. Detección serológica utilizando péptidos sintéticos de la proteína L1 de VPH para clasificación de lesiones presentes en la progresión hacia cáncer de cuello uterino.	27
3. Método.....	30
3.1 Diseño del estudio:.....	30

3.2 Población blanco:	30
3.4 Criterios de inclusión.....	30
3.5 Criterios de exclusión	31
3.6 Muestreo y tamaño de la muestra.....	31
3.7 Materiales y equipos.....	31
3.8 Diseño de péptidos sintéticos de la proteína L1.....	32
3.9 Variables	34
3.9.1 Clasificación de las mujeres según el Sistema Bethesda:.....	34
3.9.2 Resultado de la prueba ELISA:.....	35
3.9.3 Variables sociodemográficas:	35
3.9.4 Antecedentes de relevancia para exposición al VPH y riesgo de CCU:	35
3.9.5 Pruebas de Laboratorio:.....	36
3.10 ELISA.....	36
3.10.1 Descripción del protocolo.....	36
3.10.2 Punto de corte:.....	37
3.10.3. Análisis de datos.....	37
4. Resultados.....	38
4.1 Descripción sociodemográfica y antecedentes de la población la población de estudio.	38
4.2 Genotipificación de las mujeres participantes en el estudio.	44

4.3 Relación entre los títulos de anticuerpos anti-VPH presentes en suero contra los péptidos sintéticos y el tipo de lesión presente en cuello uterino.	46
4.4 Sensibilidad y especificidad de los péptidos originales y sus modificaciones comparados con la clasificación del sistema de Bethesda.....	51
4.5 Discriminación de inmunidad natural vs Inmunidad adquirida.....	54
4.6 Estudio de títulos de anticuerpos contra los péptidos de la proteína L1 presentes en los diferentes grupos de estudio y su relación con la distribución de los genotipos identificados de VPH.....	56
4.7 Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína L1 del VPH-AR y VPH -BR con los péptidos sintetizados.	59
5. Discusión	68
Referencias Bibliográficas.....	75

Lista de tablas

Tabla 1. Asociación de los Alphapillomavirus con cáncer cervical	18
Tabla 2. Péptidos diseñados de la proteína L1 de VPH con modificaciones estructurales de Dimetil-tirosina.....	33
Tabla 3. Características sociodemográficas de la población de estudio.	40
Tabla 4. Descripción de factores de riesgo establecidos para CCU en la población de estudio. ..	41
Tabla 5. Descripción de los antecedentes ginecológicos en la población de estudio.	42
Tabla 6. Tipo de método de planificación familiar en la población de estudio.....	43
Tabla 7. Promedio y desviación estándar de las densidades ópticas de la prueba de ELISA de acuerdo con el estado de infección por VPH y tipo de lesión presente.	47
Tabla 8. Promedio y desviación estándar de las densidades ópticas de la prueba de ELISA por grupo de estudio.....	48
Tabla 9. Promedio y desviación estándar de las densidades ópticas de las pruebas de ELISA por estatus de la infección por VPH.....	51
Tabla 10. Sensibilidad, especificidad y AUC del ELISA utilizando el péptido 47.....	52
Tabla 11. Sensibilidad, especificidad y AUC del ELISA utilizando el péptido 49.....	53
Tabla 12. Sensibilidad, especificidad y AUC del ELISA utilizando el péptido 50.....	53
Tabla 13. Sensibilidad, especificidad y AUC del ELISA utilizando el péptido 51.....	53
Tabla 14. Promedio y desviación estándar de absorbancias de la ELISA en mujeres con inmunidad natural o inmunidad adquirida.....	54
Tabla 15. Promedio y desviación estándar de las absorbancias de pacientes sin infección por VPH vs vacunadas.	55

Tabla 16. Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de la proteína L1 de los genotipos VPH-AR identificados en nuestro estudio y las secuencias de los péptidos 47-49-50 y 51.....65

Tabla 17. Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de la proteína L1 de los genotipos VPH-BR identificados en nuestro estudio y las secuencias de los péptidos 47-49-50 y 51.....66

Lista de figuras

Figura 1. Estructura Viral de VPH: Proteínas de la cápside (L1, L2), proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), son sus respectivos marcos de lectura. Modificado de: The health professional's HPV HANDBOOK: Human papillomavirus and cervical cancer. 2004.	19
Figura 2. A) Proyección conformacional de la proteína capsomérica L1 de VPH. B) Hélice- α . C) loops B-C, D) F-G de la proteína capsomérica L1 los cuales se encuentran expuestos en la superficie del capsómero.	29
Figura 3. Frecuencia de infecciones únicas y múltiples por VPH.	45
Figura 4. Frecuencia de infección por VPH-AR en la población de estudio.	45
Figura 5. Frecuencia de infección por VPH-BR en la población de estudio.....	46
Figura 6. Densidad óptica de la prueba de ELISA utilizando péptido 47 por grupos de estudio..	49
Figura 7. Densidad óptica de la prueba de ELISA utilizando el péptido 49 por grupos de estudio.	49
Figura 8. Densidad óptica del péptido 50 por grupos de estudio.....	50
Figura 9. Densidad óptica del péptido 51 por grupos de estudio.....	50
Figura 10. Densidad óptica del péptido 47 de acuerdo con la distribución de los genotipos por grupo de estudio.....	56
Figura 11. Densidad óptica del péptido 49 de acuerdo con la distribución de los genotipos por grupo de estudio.....	57
Figura 12. Densidad óptica del péptido 50 de acuerdo con la distribución de los genotipos por grupo de estudio.....	58

Figura 13. Densidad óptica del péptido 51 de acuerdo con la distribución de los genotipos por grupo de estudio.....	58
Figura 14. Alineamiento múltiple del Péptido 47 vs VPH-AR.	59
Figura 15. Alineamiento múltiple del péptido 47 vs VPH-BR.....	60
Figura 16. Alineamiento múltiple del péptido 49 vs VPH-AR.	61
Figura 17. Alineamiento múltiple del péptido 49 vs VPH-BR.....	62
Figura 18. Alineamiento múltiple del péptido 50 vs VPH-AR	62
Figura 19. Alineamiento múltiple del péptido 50 vs VPH-BR.....	63
Figura 20. Alineamiento múltiple del péptido 51 vs VPH-AR.	63
Figura 21. Alineamiento múltiple del péptido 51 vs VPH-BR.....	64
Figura 22. Densidades ópticas de los péptidos originales y modificados de acuerdo con coinfecciones con dos o más VPHs a). Péptido original 50. b) péptido modificado 51. c) Péptido original 47. d) péptido modificado 49.....	67

Resumen

Título: Evaluación de la exactitud diagnóstica para detección de anticuerpos contra la proteína L1 de VPH para estratificar mujeres con lesiones en cuello uterino. *

Autor: Laura Melissa Torrado García**

Palabras Clave: VPH, péptido sintético, seroprevalencia, ELISA, cáncer de cuello uterino.

Descripción:

El Virus de Papiloma Humano (VPH) está frecuentemente asociado a infecciones del tracto reproductivo, causante del cáncer de cuello uterino (CCU). La respuesta de anticuerpos a la infección por VPH es heterogénea y podría ser una herramienta como biomarcador diagnóstico. **Objetivo:** Evaluar la exactitud diagnóstica para identificar mujeres con lesiones en cuello uterino y clasificar su grado de severidad, mediante la detección de anticuerpos presentes en suero utilizando péptidos sintéticos de la proteína L1 de VPH. **Método:** estudio de evaluación de tecnología diagnóstica para determinar el rendimiento de péptidos de la proteína L1 de VPH y su capacidad para discriminar lesiones premalignas y CCU mediante la técnica ELISA. Se recolectaron 62 muestras (citología normal, NIC I, NIC II NIC III y cáncer) y se determinó la relación entre los títulos de anticuerpos presentes contra VPH y la lesión presente en cuello uterino. **Resultados:** De las mujeres estudiadas, 35 tenían citología normal y de éstas el 54,3% presentaban infección por VPH. Dentro de las 25 mujeres con lesiones en cuello uterino, el 36% tenían NIC I, el 20% NIC II, 32% NIC III y 12% CCU. Para el péptido 50 el promedio de las densidades ópticas en el grupo de mujeres con citología normal VPH negativas fue significativamente menor que el grupo de mujeres con citología normal VPH positivas y que el grupo de pacientes con NIC III. Para el péptido 51 el promedio de las densidades ópticas del grupo de mujeres con citología normal VPH positivas fue de 1,03, este fue significativamente mayor que el del grupo de mujeres con citología normal (0,74) y que el del grupo de NIC I-II (0,77). Los péptidos 50 y 51 clasificaron correctamente a mayor porcentaje de mujeres. **Conclusión:** el péptido 50 podría ser un buen marcador para diferenciar la seropositividad en mujeres de acuerdo al estatus de infección por VPH y al grado de la lesión en cuello uterino.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: Bladimiro Rincón Orozco. PhD. Codirector: Ruth Aralí Martínez Vega. PhD.

Abstract

Title: Evaluation of the diagnostic accuracy for detection antibodies against HPV L1 protein to stratify women with cervical lesions. **

Author: Laura Melissa Torrado García*

Key Words: HPV, synthetic peptide, seroprevalence, ELISA, cervical cancer.

Description:

Human Papillomavirus (HPV) is frequently associated with reproductive tract infections, causing cervical cancer (CC). The antibody response to HPV infection is heterogeneous and could be used as a diagnostic biomarker tool. Objective: To evaluate the diagnostic accuracy to identify women with cervical lesions and classify their severity rated, by detecting antibodies in sera using synthetic peptides of the HPV L1 protein. Method: Diagnostic technology evaluation study to determine the yield of HPV L1 protein peptides and their ability to discriminate premalignant lesions and CC using the ELISA technique. 62 samples were collected (normal cytology, CIN I, CIN II CIN III, and cancer) and the relationship between antibody titers against HPV and the lesion present in the cervix was determined. Results: Of the groups of women studied, 35 had normal cytology and 54.3% of these had an HPV infection. Among the 25 women with cervical lesions, 36% had CIN I, 20% CIN II, 32% CIN III and 12% CCU. For peptide 50 the average optical densities in the group of women with normal cytology negative HPV was significantly lower than the group of women with normal cytology HPV positive and the group of patients with CIN III. For peptide 51 the average optical densities of the group of women with normal cytology HPV positive was 1.03, this was significantly higher than that of the group of women with normal cytology (0.74) and that of the CIN I-II group (0.77). Conclusion: Peptide 50 could be a good marker to differentiate seropositivity in women according to the status of HPV infection and the degree of the lesion in the cervix.

* Degree Work

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: Bladimiro Rincón Orozco. PhD. Codirector: Ruth Aralí Martínez Vega. PhD.

Introducción

El Virus de Papiloma Humano (VPH) es uno de los patógenos más frecuentemente asociado a infecciones del tracto reproductivo, causante del cáncer de cuello uterino (CCU) (M. Stanley, 2010, Organization, 2016). La Organización Mundial de la salud (OMS) determinó que del 5 al 10% de las mujeres, pueden desarrollar una infección persistente con genotipos de alto riesgo, siendo los genotipos VPH-16 y VPH-18, responsables del 70% de los casos de progresión hacia CCU (Ferlay et al., 2015). La citología es el método de elección al momento del control y diagnóstico de lesiones causadas por VPH. Sin embargo, no tiene una buena sensibilidad como método de tamización (Duraismy et al., 2011). Investigar en nuevas herramientas de diagnóstico temprano, constituye una necesidad en países en vía de desarrollo donde ocurren el 85% de las muertes atribuibles a CCU (Mishra et al., 2011). La respuesta de anticuerpos a la infección por VPH es heterogénea; sin embargo, estudios han demostrado que aproximadamente el 60% de las mujeres con infecciones persistentes por VPH realizan seroconversión entre 6 y 18 meses después de la detección del ADN viral, lo que no ocurre cuando una infección es transitoria (Carter et al., 2000). Por esta razón, el diseño de nuevos métodos diagnósticos basados en la respuesta de anticuerpos para detectar lesiones premalignas y CCU, y de ser posible utilizarlos como biomarcadores en la estratificación de estas lesiones, podría ser una nueva tecnología de bajo costo y amplia utilización para el diagnóstico temprano de esta enfermedad. Por tal motivo, el presente estudio pretende evaluar la exactitud diagnóstica de la detección de anticuerpos contra la proteína

L1 de VPH para identificar mujeres con lesiones en cuello uterino y clasificar su grado de severidad.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general:

Evaluar la exactitud diagnóstica para identificar mujeres con lesiones en cuello uterino y clasificar su grado de severidad, mediante la detección de anticuerpos presentes en suero utilizando péptidos sintéticos de la proteína L1 de VPH.

1.2 Objetivos específicos

Establecer la relación existente entre los títulos de anticuerpos anti-VPH presentes en suero contra los péptidos sintéticos y el tipo de lesión presente en el cuello del útero de las mujeres incluidas en el estudio

Determinar la sensibilidad y la especificidad de los anticuerpos detectados utilizando los péptidos de la proteína L1, para clasificar las mujeres utilizando como estándar de oro el Sistema Bethesda.

Evaluar la capacidad discriminatoria de la detección de anticuerpos contra los péptidos de la proteína L1 para distinguir entre inmunidad natural e inmunidad postvacunación.

2. Cuerpo del trabajo

2.1 Marco conceptual

2.1.1. Generalidades:

Los Papilomavirus (PVs) pertenecen a un amplio grupo de pequeños virus desnudos de la familia Papilloviridae, distribuidos a lo largo del mundo animal (Münger et al., 2004). Han sido encontrados en aves, reptiles y en más de 20 especies de mamíferos; a la fecha se conocen más de 210 tipos de PVs de los cuales al menos 160 infectan al humano (Bernard et al., 2010).

Los VPH afectan tejido mucoso y son responsables de causar lesiones epiteliales benignas (verrugas o condilomas) o malignas (cáncer escamoso epitelial o adenocarcinoma). Estos virus tienen gran afinidad por los queratinocitos presentes en el epitelio escamoso estratificado, generando mayor tropismo por la región ano-genital y tracto aero-digestivo (Nguyen et al., 2014).

No todos los VPH pueden generar lesiones malignas en el epitelio escamoso estratificado. Por esto, la OMS ha clasificado los VPH de importancia clínica en virus de alto y bajo riesgo según su capacidad de inducir cáncer mediante mecanismos biológicos claramente establecidos entre proteínas con capacidad oncogénica y reguladoras del ciclo celular. Los VPH que hacen parte del grupo de alto riesgo, causan lesiones que pueden progresar a carcinoma de células escamosas o

adenocarcinomas y a la fecha se asocian con CCU, ano, vagina, vulva, pene y orofaringe (Bosch et al., 2013). Hoy en día, la agencia internacional de investigación en cáncer define 13 tipos de VPH que hacen parte del grupo de alto riesgo (VPH-51, VPH-56, VPH-66, VPH-18, VPH-39, VPH-45, VPH-59, VPH-16, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-52, VPH-58) (Cogliano et al., 2005) y otros dos (VPH-68, VPH-73) como sospechosos de carcinogenicidad (Molijn et al., 2005; Muñoz et al., 2006; Schiffman et al., 2009) (Tabla 1).

Tabla 1.

Asociación de los Alphasillomavirus con cáncer cervical

Género y especie	Tipos de especie	Carcinoma de células escamosas en cuello uterino	Adenocarcinoma de cuello uterino (%)	Categoría
Alpha 5	VPH-26	0,22%		Alto riesgo
	VPH-51	0,75%	0,54%	Alto riesgo
	VPH-82	0,26%		Alto riesgo
Alpha 6	VPH-53	0,04%		Alto riesgo
	VPH-56	1,09%		Alto riesgo
	VPH-66	0,19%		Alto riesgo
Alpha 7	VPH-18	11,27%	37,3%	Alto riesgo
	VPH-45	5,21%	5,95%	Alto riesgo
	VPH-59	1,05%	2,16%	Alto riesgo
	VPH-39	0,82%	0,54%	Alto riesgo
	VPH-68	0,37%		Alto riesgo
Alpha 9	VPH-16	54,38%	41,62%	Alto riesgo
	VPH-31	3,82%	1,08%	Alto riesgo
	VPH-33	2,06%	0,54%	Alto riesgo
	VPH-35	1,27%	1,08%	Alto riesgo
	VPH-52	2,25%		Alto riesgo
	VPH-58	1,72%	0,54%	Alto riesgo
Alpha 11	VPH-73	0,49%		Alto riesgo

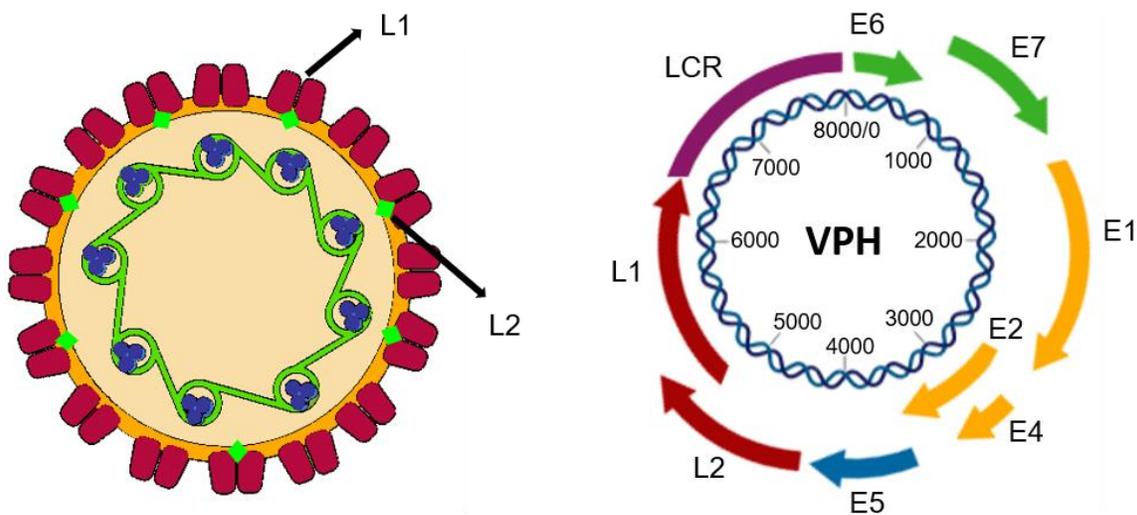
Nota: Adaptado de Doorbar 2006. Los VPH se dividen en tres grupos: Alto riesgo, bajo riesgo y cutáneos. Los genotipos de alto riesgo pertenecen al género alfa y especie 5, 6, 7, 9 y 11. En la tabla se muestra la frecuencia con que estos tipos de VPH se asocian a Carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma (John Doorbar, 2006; Muñoz et al., 2004).

2.1.2. Estructura viral y ciclo de infección de VPH

Los VPH son virus pequeños con un diámetro que varía entre 52 – 55 nm, con cápside icosaédrica y ADN de doble cadena circular; tienen aproximadamente 8.000 pares de bases (pb) (Münger et al., 2004). Todos los tipos de VPH contienen en su genoma entre 8 y 10 marcos de lectura abierta (ORF, del inglés, Open Reading Frame) (Münger & Howley, 2002). Estos ORFs se dividen en tres segmentos funcionales: Región temprana E, Región tardía L y una Región no codificante (LCR, del inglés Long Control Region). La región E codifica para proteínas no estructurales, la región L codifica para proteínas de la cápside viral y la región LCR contiene elementos de regulación de la replicación y transcripción viral (figura 1) (Münger et al., 2004).

Figura 1.

Estructura Viral de VPH: Proteínas de la cápside (L1, L2), proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), son sus respectivos marcos de lectura. Modificado de: The health professional's HPV HANDBOOK: Human papillomavirus and cervical cancer. 2004.



El ciclo de vida de VPH se encuentra estrechamente relacionado con el estado de diferenciación de las células siendo capaz de infectar la capa basal del epitelio que está activamente en división. Inicialmente, el número de copias es bajo; a medida que la célula se va diferenciando, aumentan los ciclos de replicación, realizando una infección productiva que origina nuevos viriones (Stubenrauch & Laimins, 1999). VPH no es un virus lítico, y para liberarse a infectar nuevas células, la proteína temprana E4 interactúa con los filamentos de queratina de la superficie celular liberando viriones hacia nuevas células (J. Doorbar et al., 1991). Así mismo, otras proteínas tempranas son importantes en el ciclo de vida viral. E1 y E2 regulan el proceso de replicación; adicionalmente, E2 participa como un factor de transcripción y unión al ADN en VPHs de alto riesgo (VPH-AR) e interactúa con motivos de la región LCR (Phelps & Howley, 1987). E2 también forma un complejo de unión con la helicasa viral E1. Esta unión es importante para el reconocimiento del origen de replicación viral y para la posterior segregación del genoma viral a los cromosomas celulares durante la mitosis mediante la interacción con el dominio proteico Brd4 (Chiang et al., 1992; Skiadopoulos & McBride, 1998; You et al., 2004).

Debido a que los VPHs no tienen más enzimas con funciones en su replicación, dependen estrechamente del estado de división de la célula hospedera, por tanto, los VPH-AR han evolucionado en el mantenimiento de condiciones óptimas que les permitan persistir en el queratinocito con la consecuencia del desarrollo de su potencial oncogénico.

Por otra parte, actualmente se conocen algunos de los eventos claves implicados en tumorigénesis cervical. La integración del genoma viral a los cromosomas humanos con el aumento de la expresión génica E6 y E7 son elementales para el desarrollo de lesiones malignas. Así mismo ocurre con la pérdida de segmentos de la expresión del genoma de la cápside (L1 y L2) y del regulador transcripcional E2 con lo cual, estudios han mostrado alteraciones en la célula hospedera tras la integración de E6 y E7 (Jeon & Lambert, 1995). La proteína temprana E5, así mismo, es importante en el mantenimiento del ciclo celular productivo, su función es transmembranal y se une a receptores de tirosina quinasa facilitando el reclutamiento de proteínas de señalización celular (DiMaio & Mattoon, 2001). En los genotipos VPH-AR, la pérdida de esta proteína afecta el ciclo de vida productivo y ha sido demostrado que, cuando ocurre el fenómeno de integración viral, E5-VPH no es necesario para el desarrollo de carcinogénesis cervical (Fehrmann et al., 2003).

2.1.3. Oncoproteínas Virales E6 y E7

La progresión de la infección por VPH-AR a CCU es un proceso lento que requiere del acúmulo de varios eventos para la transformación celular. La tasa de mutaciones en la célula

hospedera sin infección es muy baja en comparación cuando hay persistencia viral y expresión alta de las proteínas E6/E7 de VPH-AR (White et al., 1994). La expresión de E6/E7-VPH en las células basales y parabasales está asociada a funciones específicas en la desregulación del ciclo celular principalmente.

Las E7-VPH son proteínas de unos 100 aminoácidos, las cuales se asocian a complejos celulares y modifican las funciones de estas mismas. En este contexto, éstas tienen la capacidad de asociarse a las proteínas supresoras de tumores del retinoblastoma (pRB), las cuales pertenecen al grupo de proteínas de unión al ADN que en este caso regulan factores de transcripción en los puntos de control del ciclo celular (Cam & Dynlacht, 2003). La capacidad de E7-VPH para asociarse con pRB es esencial para mantener la replicación viral, puesto que facilita la reentrada en el ciclo celular de las células en las capas epiteliales superiores (Barrow-Laing et al., 2010), así como, causar inestabilidad genómica a través de la desregulación del ciclo del centrosoma en la mitosis (Duensing & Münger, 2002; McLaughlin-Drubin & Münger, 2009).

Las proteínas E6-VPH son un complejo multimérico con capacidad de interactuar con múltiples proteínas celulares relacionadas en las vías clave del ciclo celular (Zanier et al., 2012). Esto ocurre a través de múltiples mecanismos. Por ejemplo, E6-VPH-AR tiene motivos de unión a dominios de proteínas PDZ, las cuales están involucradas en procesos de señalización y proliferación celular regulando negativamente estas funciones en la célula (Kühne et al., 2000). Otra característica de las proteínas E6-VPH-AR es la capacidad de aumentar la actividad de las telomerasas y la degradación de P53; mecanismos claramente establecidos en la inmortalización de los queratinocitos (Fu et al., 2010; Galloway et al., 2005). Mediante la Ubiquitinación por medio

de la ubiquitina ligasa E6AP, VPH es capaz de inducir vía proteosoma la degradación de P53 (Tomaic et al., 2009). Por tanto, la expresión continua de E6 y E7, en las capas superiores del queratinocito, facilita el regreso a la fase S para continuar la replicación viral.

2.1.4. Epidemiología del cáncer de cuello uterino

El CCU es una de las enfermedades más frecuentes causada por la infección persistente con VPH (M. Stanley, 2010; Organization, 2016.) La OMS determinó que del 5% al 10% de las mujeres desarrollan una infección persistente con genotipos de alto riesgo, siendo los genotipos VPH-16 y VPH-18 responsables del 70% de los casos de progresión hacia carcinoma invasivo (Ferlay et al., 2015).

En el mundo para el año 2018 el CCU se clasificó como el cuarto cáncer más común con un número estimado de 569.000 casos nuevos y más de 300 mil muertes (GLOBOCAN, 2018). Así mismo, el 85% de estos cánceres ocurren en países en vía de desarrollo. En países desarrollados estas cifras han decrecido dramáticamente debido al uso de herramientas de biología molecular para el diagnóstico temprano y a los programas de vacunación (Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, Brotons M, Mena M & R, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S, 2016; Ferlay et al., 2015; Torre et al., 2015).

En Colombia, a pesar de que se ha instaurado el programa nacional de detección precoz de CCU, las cifras de este cáncer no han tenido una disminución significativa en los reportes nacionales. Según datos proporcionados por la Agencia Internacional para la Investigación en

Cáncer IARC (por su sigla en inglés International Agency for Cancer Research) para el año 2018 en el país se reportaron aproximadamente 3.853 casos nuevos y 1.775 muertes por este tipo de cáncer (GLOBOCAN, 2018).

2.1.5. Clasificación general de lesiones causadas por VPH en cuello uterino

Con el fin de poder clasificar las lesiones causadas por VPH, en el año de 1988 se realizó una reunión en el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, donde asistieron representantes de organismos internacionales, científicos y profesionales, y se llegó a un acuerdo en la nomenclatura para clasificar informes citológicos ginecológicos. En el 2001 se reevaluaron las categorías y se actualizaron, siendo así, el reporte se realiza de la siguiente manera con la clasificación de Bethesda (Broso & Buffetti, 1993).

- Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad
- En células escamosas analizadas por citología:
 - Células escamosas atípicas (ASC)
 - De significado indeterminado (ASC-US)
 - Lesiones intraepiteliales de bajo grado (L-SIL)
 - Lesiones intraepiteliales de alto grado (H-SIL)
- En células escamosas analizadas por biopsia:
 - NIC 1: Neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado
 - NIC 2: Neoplasia intraepitelial cervical de moderado grado
 - NIC 3: Neoplasia intraepitelial cervical de alto grado

- Características sugestivas de invasión

Con esta clasificación se consensó la nomenclatura de las lesiones generadas en el cuello uterino atribuidas a VPH, así como los algoritmos de seguimiento y tratamiento de esta enfermedad.

2.1.6. Problemas asociados al diagnóstico de lesiones premalignas y cáncer de cuello uterino

La citología convencional, a pesar de estar instaurada hace más de 40 años, tiene una sensibilidad que varía de un lugar a otro. Por ejemplo, en estudios realizados en Norte América y algunas regiones de Europa, donde se evaluó la sensibilidad de la prueba de Papanicolaou para detectar NIC I y II, ésta osciló entre 40 y 70%, contribuyendo mejor al diagnóstico a medida que la lesión premaligna avanza (Cuzick et al., 2006). En países Latinoamericanos como Brasil, Argentina y Colombia, el comportamiento de la prueba es similar manteniéndose entre un 50 y 60% para detectar lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado, dejando muchos casos sin detectar (Murillo et al., 2010; Sarian et al., 2005; Sigurdsson, 2013).

Así mismo, se ha reportado que existen diferencias significativas en el acceso a la citología dependiendo de ciertos factores como: personas provenientes del área rural o urbana, el estrato socioeconómico, el nivel de educación y el tipo de seguridad social. A esto se suma el bajo seguimiento que existe a mujeres con citología anormal. Todos estos factores ubican a Colombia como el país de América Latina con menos cobertura en el programa de prevención de CCU

(Castro-Jiménez et al., 2006; Lucumi Cuesta & Gomez Gutierrez, 2004; Pineros et al., 2007). Las dificultades en el diagnóstico y las limitaciones propias de esta prueba ponen de manifiesto la necesidad de buscar nuevas herramientas que impacten la incidencia de esta enfermedad, así como, su efectividad en la prevención.

2.1.7. Respuesta inmune frente a la infección por VPH

Los microorganismos con tropismo por la mucosa han logrado desarrollar mecanismos de evasión inmune, en cierta medida por que las células centinela no son tan eficientes cuando un microorganismo no realiza fase en sangre o viremia. Esta característica, supone una ventaja para el microorganismo ya que la liberación de sus partículas virales no se encuentra limitada por la respuesta inmune del hospedero (M. Stanley, 2008). Particularmente, la infección por VPH no induce un estado de inflamación local, por lo que la producción de citocinas proinflamatorias es mínima. Por lo anterior, es necesario activar la respuesta inmune innata, principalmente células dendríticas (CD), células de Langerhans, macrófagos y células asesinas naturales (NK, de inglés, Natural Killer), ya que promueven un proceso pro-inflamatorio y activan una respuesta celular citotóxica mediante la presentación antigénica a células T y B (Woo et al., 2010). Finalmente, la respuesta contra la infección viral se complementa con la generación de anticuerpos neutralizantes contra la proteína de la cápside L1, con el fin de detener la propagación viral (M. A. Stanley & Sterling, 2014).

La respuesta humoral frente a proteínas de VPH ha sido estudiada y considerada como posible biomarcador en cáncer atribuible a VPH en distintos sitios anatómicos (Van Doornum et

al., 2003). La presencia de anticuerpos anti-VPH y su cinética ha sido investigada por estudios epidemiológicos encontrando diversos antígenos virales implicados, donde hasta el momento, las respuestas contra las proteínas L1, E4, E6 y E7 son las que presentan asociaciones más fuertes con CCU (Achour et al., 2008; Van Doornum et al., 2003).

Los anticuerpos anti-VPH-L1 se asocian más comúnmente a CCU, cáncer anal, cáncer peneal, cáncer vulvar, entre otros; sin embargo, los resultados son controversiales. Algunos estudios de casos y controles encontraron prevalencias similares de respuesta anti-VPH-L1 en pacientes con distintos cánceres vulvares y peneanos, mientras que otros estudios sugieren que pueden ser un buen predictor de anormalidades y neoplasias (Kreimer et al., 2015; Van Doornum et al., 2003).

2.1.8. Detección serológica utilizando péptidos sintéticos de la proteína L1 de VPH para clasificación de lesiones presentes en la progresión hacia cáncer de cuello uterino.

Debido al alto impacto que tiene el CCU en el país y el continente, el diseño de nuevos métodos económicos para el diagnóstico masivo de esta enfermedad como la detección de anticuerpos anti-VPH parece ser prometedor. Diversos estudios han demostrado que entre el 70 y 90% de mujeres con infección persistente por VPH presentan seroconversión 6 a 18 meses después que el ADN viral ha sido detectado, y esto casi nunca ocurre en mujeres con infecciones transitorias (Carter et al., 1996, 2000; Nonnenmacher, N L Hubbert, R Kirnbauer, K V Shah, N Muñoz, F X Bosch, S de Sanjosé, R Viscidi, D R Lowy, 1995; Sanclemente & Gill, 2002).

La identificación de las regiones de interacción entre los anticuerpos monoclonales y sus epítomos principales ha sido motivo de estudio en investigadores que proponen la detección serológica como biomarcadores de detección temprana de lesiones premalignas. Así mismo, actualmente existe evidencia de que la presencia de anticuerpos anti-VPH podría ser un marcador de infecciones por VPH anteriores o actuales (Huang et al., 2017; Salazar-Piña et al., 2016).

Esta respuesta serológica contra las proteínas virales se puede detectar con la prueba ELISA y parece ser un buen indicador de presencia de carga viral, infecciones pasadas, infecciones activas, lesiones cervicales de bajo y alto riesgo y desarrollo de lesiones neoplásicas (Urquiza, Guevara, et al., 2008).

Se ha reportado que las pruebas ELISA cuentan con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 98,5% para discriminar entre sueros positivos y negativos para anticuerpos anti-VPH. La mayoría de estos anticuerpos reconocen epítomos de la proteína L1 (Karem et al., 2002). Se ha demostrado que las lupas B-C y F-G de la proteína L1 forman una región de unión de anticuerpos neutralizantes y a la fecha se han diseñado péptidos basados en la secuenciación de estas regiones, los cuales parecen ser específicamente reconocidos por sueros de mujeres que presentan lesiones cervicales asociadas a infección por tipos de VPH-AR (Urquiza et al., 2005; Urquiza, Guevara, et al., 2008; Urquiza, Sánchez, et al., 2008), (Figura 2).

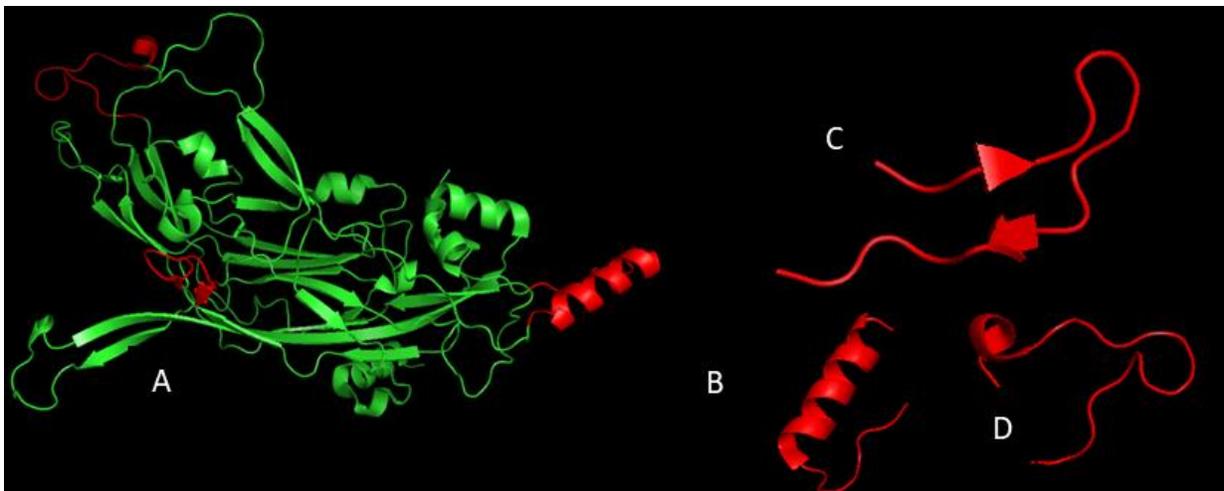
Sin embargo, estudios previos como los realizados en péptidos del virus Epstein Barr han demostrado que la estabilización de estructuras que contienen giros-beta disminuye la entropía configuracional del péptido, y produce cambios de aumento en la afinidad de unión al receptor, así

como, su actividad biológica. Esto se basa en la introducción o sustitución de aminoácidos modificados con dimetil-tyrosina en posiciones estratégicas del péptido para reducir el número de isómeros conformacionales de la cadena lateral, aumentando de esta manera la actividad biológica del mismo (Urquiza et al., 2012).

Por esto, la modificación de péptidos de la proteína capsomérica L1 de VPH utilizando el concepto de la disminución de la entropía configuracional para sintetizar nuevos péptidos con una actividad biológica deseada, podría ser una estrategia eficiente para desarrollar técnicas que permitan la detección de lesiones causadas por VPH y a su vez la clasificación de estas con base en los niveles serológicos de Ac anti-VPH.

Figura 2.

A) Proyección conformacional de la proteína capsomérica L1 de VPH. B) Hélice- α . C) loops B-C, D) F-G de la proteína capsomérica L1 los cuales se encuentran expuestos en la superficie del capsómero.



3. Método

3.1 Diseño del estudio:

Evaluación de tecnología diagnóstica.

3.2 Población blanco:

Mujeres sexualmente activas mayores de 18 años.

3.3 Población de estudio:

Mujeres mayores de 18 años del área metropolitana de Bucaramanga que tengan vida sexual activa.

3.4 Criterios de inclusión:

- Mujeres mayores de 18 años
- Vida sexual activa
- Que consulten a los centros de captación

3.5 Criterios de exclusión:

- Histerectomía
- Mujer en estado de embarazo
- Mujeres en estado de inmunosupresión por otra causa distinta a CCU.
- Imposibilidad de genotipificación de VPH en las mujeres con lesiones en el cuello uterino.

3.6 Muestreo y tamaño de la muestra

Las mujeres fueron incluidas por un muestreo transversal. Por conveniencia se tomaron muestras sanguíneas a pacientes diagnosticadas con lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado, así como CCU en estadio avanzado, que ingresaron a tratamiento y control en el consultorio del Médico ginecólogo oncólogo Simón Orostegui entre el mes de octubre de 2018 a noviembre de 2019. Por la especialidad del médico tratante no era posible recolectar en esta misma institución mujeres clasificadas como normales. Por tanto, se realizó una búsqueda por conveniencia en comunidad universitaria de la Universidad Industrial de Santander para incluir las mujeres con citología normal. Se representaron todas las edades, por esto, se incluyeron tanto estudiantes como personal administrativo.

3.7 Materiales y equipos

Recolección de muestra: se acudió al ginecólogo oncólogo anteriormente mencionado, quien facilitó el contacto con las pacientes que fueron diagnosticadas por colposcopia con una lesión pre-maligna (NIC I, II, III) o maligna en el útero. Las mujeres con citología normal se contactaron en la comunidad universitaria. La participación fue voluntaria; se informó a las pacientes del porqué del estudio y de los posibles riesgos por acceder a la toma, quienes aceptaron, firmando un consentimiento informado. Se realizó una encuesta que incluyó variables sociodemográficas y antecedentes de importancia para infección por VPH. Además, se tomó muestra de sangre por punción venosa (5ml de sangre) y un cepillado cervical.

Así mismo, para el desarrollo del tercer objetivo, del banco de sueros de estudios previos realizados por el grupo de investigación, se tomaron los controles postvacunación contra VPH de niñas menores de 12 años quienes no habían iniciado vida sexual.

3.8 Diseño de péptidos sintéticos de la proteína L1

Se evaluaron en total seis péptidos de la cápside de la proteína L1 de VPH sintetizados en fase sólida, con posterior purificación por HPLC y subsecuente análisis mediante la técnica MALDI TOF-TOF. Los primeros tres péptidos corresponden a construcciones previamente evaluadas, que han demostrado ser específicamente reconocidos por anticuerpos anti-VPH. Para este estudio se codificó como péptido 44 la siguiente secuencia: FPIKKPNNNKILVPKVS, péptido 47 GENVPDDLKYGSGSTANLASSN y péptido 50 PPGGTLEDTYRFVTSQAIACQKHT. Sin embargo, para aumentar el rendimiento de la prueba

se realizaron algunos cambios estructurales en estos tres péptidos anteriormente mencionados codificando la modificación del péptido 44 como 46, del péptido 47 como 49 y péptido 50 como 51 (Tabla 2). Estas sustituciones corresponden a aminoácidos modificados con Dimetil-tirosina en posiciones estratégicas del péptido para reducir el número de isómeros conformacionales de la cadena lateral, aumentando de esta manera, la estabilidad y preservación de epitopes antigénicos de los peptidos modificados. Estos tres diseños nuevos fueron realizados en colaboración con el profesor Mauricio Urquiza de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 2.

Péptidos diseñados de la proteína L1 de VPH con modificaciones estructurales de Dimetil-tirosina.

Péptido	Secuencia	Región
Péptido 44	FPIKKPNNNKILVPKVS	Original, Bucle B-C
Péptido 46	FCIKKPNNNKILVCKVS	Modificación, Bucle B-C
Péptido 47	GENVPDDLVIKSGSTANLASSN	Original, Bucle F-G
Péptido 49	GENCPDDLVIKSGSTANCASSN	Modificación, Bucle F-G
Péptido 50	PPGGTLEDTYRFVTSQAIACQKHT	Original, alfa hélice
Péptido 51	PPGGCLECTYRFVTSQAIACQKHT	Modificación, alfa hélice

Por otra parte, los residuos de la proteína L1 seleccionados corresponden en un 50% de su secuencia, a una región expuesta y son los identificados en la interacción con anticuerpos monoclonales. El péptido 47 y su modificación (llamado aquí 49), es el sitio de unión a diferentes

anticuerpos monoclonales descritos por Chen et al. y contiene residuos que interactúan con estos anticuerpos, así como, el 65% de esta secuencia está expuesta en la estructura de L1.

Las secuencias del bucle BC y del bucle FG se modificaron al cambiar por cisteínas dos de los aminoácidos que en su mayoría no estaban expuestos en la superficie y que están separados por menos de 5 Å en la estructura tridimensional de la proteína L1; estas dos cisteínas se agregaron a la secuencia para tratar de formar un enlace disulfuro intracatenario, reduciendo el número de estructuras que estos péptidos pueden adquirir.

La otra región seleccionada fue la hélice H4 ubicada en el extremo C de la proteína L1; la secuencia de esta región se conserva entre los diferentes VPH de alto riesgo, está expuesta en la superficie del pentámero y un péptido de esta región se une a los anticuerpos séricos que muestran diferente reactividad entre pacientes con cáncer cervical, pacientes infectados y mujeres con citología normal (Urquiza, Guevara, et al., 2008).

3.9 Variables

3.9.1 Clasificación de las mujeres según el Sistema Bethesda:

Se recolectaron muestras de sangre de las mujeres previamente clasificadas por biopsia según el sistema de Bethesda (NIC I, II, III y cáncer) con lesiones premalignas o cáncer. Además,

se colectaron muestras de sangre de mujeres con citologías normales menor a un año de la toma. Estas últimas fueron subclasificadas en mujeres con infección o sin infección por VPH.

3.9.2 Resultado de la prueba ELISA:

Se midieron las absorbancias por la técnica de ELISA de cada muestra de suero para cada uno de los péptidos seleccionados. Se realizó la estandarización de cada uno de los pasos del ELISA, probando distintas concentraciones de péptido, anticuerpo primario, secundario y lavados.

3.9.3 Variables sociodemográficas:

Se analizaron la edad, el estrato de la vivienda, nivel de educación, tipo de régimen de seguridad social, ocupación y estado civil.

3.9.4 Antecedentes de relevancia para exposición al VPH y riesgo de CCU:

Determinado por una encuesta epidemiológica estandarizada tales como, fumar, número de compañeros sexuales, edad de inicio de su vida sexual, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, entre otras.

3.9.5 Pruebas de Laboratorio:

Se identificó la presencia de VPH y el genotipo de VPH por diagnóstico molecular (Direct Flow CHIP) en las muestras de cepillado cervical de todas las mujeres que accedieron a la participación en el estudio. Esta tecnología identifica 36 genotipos diferenciando los clasificados por la OMS como alto riesgo y bajo riesgo. Aquellas muestras cuyo genotipo no fue posible determinar se excluyeron de esta investigación.

3.10 ELISA

3.10.1 Descripción del protocolo

Cada placa de 96 pozos se sensibilizó con 100 μ L de cada péptido de la proteína VPH-L1 (10 μ g/mL) diluido en PBS. La placa se dejó incubar durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Entre cada paso se lavó 5 veces con 250 μ L de buffer fosfato salino (PBS, del inglés, Phosphate Buffered Saline) más tween 20 (PBS-T) al 0,05%. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con 200 μ L de PBS-T más leche descremada 2% durante 2 horas a 37°C. A cada pozo se agregó 100 μ L de muestra de suero diluido 1 en 20 en una solución buffer de bloqueo y se incubó por 1 hora a 37°C para permitir la reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente, se añadió en cada pozo 100 μ L de Anti IgG diluido 1 en 10.000 en buffer de bloqueo y se dejó incubar por 1 hora a 37°C para permitir la reacción del conjugado con el anticuerpo de la muestra. Finalmente, a cada pozo se agregó 100 μ L de sustrato TMB diluido en buffer fosfato citrato que

contiene peróxido de hidrógeno. Se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz, para permitir la reacción del conjugado con el sustrato que origina una coloración amarilla y se paró la reacción con 100 μ L de H₂SO₄ 2N. Se leyó inmediatamente a una absorbancia de 450 nm en el espectrofotómetro Multiskan™ FC Microplate Photometer - Thermo Fisher Scientific. Se utilizaron sueros de niñas vacunadas como controles positivos y sueros de niñas que no hubiesen iniciado vida sexual como controles negativos.

3.10.2 Punto de corte

Se tomaron 10 sueros de niñas sin previo contacto sexual y por triplicado se determinaron las absorbancias emitidas al interactuar con los péptidos de L1 diseñados. Posteriormente, se estableció el punto de corte calculando el promedio más dos desviaciones estándar de las densidades ópticas obtenidas.

3.10.3. Análisis de datos

Las variables cuantitativas fueron descritas de acuerdo con si presentaban distribución normal (media y desviación estándar) o no normal (mediana y rango intercuartílico). Las variables cualitativas fueron descritas con frecuencias absolutas y frecuencias relativas.

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas de las densidades ópticas obtenidas de los péptidos correspondientes al antígeno de la cápside viral entre los diferentes grupos de acuerdo con la clasificación de la lesión de cuello uterino, utilizando las pruebas

ANOVA o Kruskal-Wallis, según tuvo o no distribución normal la absorbancia. También, se determinó el punto de corte utilizando el promedio de la absorbancia de los controles negativos más dos desviaciones estándar y se evaluó la sensibilidad, la especificidad y el área bajo la curva ROC de estos mismos péptidos para clasificar las mujeres con lesiones en cuello uterino utilizando como estándar de oro la histopatología de la biopsia/citología según el Sistema de Bethesda.

Finalmente, con este mismo procedimiento analítico, se compararon los grupos anteriormente mencionados con los resultados de los sueros de las niñas vacunadas con el fin evaluar la capacidad discriminadora de los péptidos del antígeno de la cápside viral para distinguir entre inmunidad natural y la inmunidad postvacunación.

El análisis se realizó con el paquete estadístico STATA 14.

4. Resultados

4.1 Descripción sociodemográfica y antecedentes de la población la población de estudio.

Durante el periodo de estudio se incluyeron 68 mujeres, de las cuales 8 mujeres que presentaban lesiones intraepiteliales entre alto y bajo grado fueron excluidas porque no fue posible

determinar el genotipo de VPH causante de la lesión. De las mujeres estudiadas, 35 tenían citología normal y de éstas el 54,3% presentaban infección por VPH. Dentro de las 25 mujeres con lesiones en cuello uterino, el 36% tenían NIC I, el 20% NIC II, 32% NIC III y 12% CCU.

La distribución de las características sociodemográficas se describió según los grupos de estudio. La mediana de edad fue muy similar para todos los grupos de mujeres y osciló entre 28 y 33 años. El 89,4% de las pacientes VPH positivas con citología normal y el 66,6% de las pacientes con cáncer no tenían pareja estable al momento de la toma de la muestra; al contrario de las pacientes NIC II donde el 80% describieron tener una sola pareja (Tabla 3).

Por otra parte, en las participantes con citología normal (grupo VPH positivas y negativas), el 55% son empleadas, el 50% tiene hasta 16 años de educación formal y son mujeres que en su mayoría viven en estratos 3 y 4 y pertenecen al sistema de salud contributivo (85%). En el grupo de pacientes NIC I, el 44% son trabajadoras independientes y el 33% estudiantes, el 50% ha cursado hasta 8 años de estudio y el 44% viven en estrato 2. En el grupo de pacientes con CCU dos pertenecen a estrato 2 y una a 3 y dos de ellas pertenece al régimen de seguridad social subsidiado (Tabla 3).

Se observaron diferencias significativas entre los grupos en las variables de estado civil, encontrándose mayor frecuencia de pareja estable en las pacientes con NIC II y NIC III. Así mismo, en la variable ocupación, hallándose mayor frecuencia de empleadas en los grupos de citología normal y NIC II, y de amas de casa en el grupo de CCU, y el tipo seguridad social, siendo

la mayoría del régimen contributivo, exceptuando en el grupo de NIC I y CCU donde la mayoría son del régimen subsidiado (Tabla 3).

Tabla 3.

Características sociodemográficas de la población de estudio.

Característica	Normal VPH - (n=16)	Normal VPH+ (n=19)	NIC I (n=9)	NIC II (n=5)	NIC III (n=8)	CCU (n=3)	valor de p
Edad mediana (RIQ)	31,5 (25-45,5)	28 (25-32)	31 (24-41)	33 (31-34)	32 (26,5-41)	33 (32-38)	0,72
Estado civil n (%)							
Pareja No estable	9 (56,2)	17 (89,4)	5 (55,5)	1 (20)	3 (37,5)	2 (66,6)	0,016
Pareja estable	7 (43,7)	2 (10,5)	4 (44,4)	4 (80)	5 (62,5)	1 (33,3)	
Estado reproductivo n (%)							
No embarazo	14 (87,5)	18 (94,7)	8 (88,9)	4 (80)	7 (87,5)	3 (100)	0,85
Menopáusica	2 (12,5)	1 (5,3)	1 (11,1)	1 (20)	1 (12,5)	0 (0)	
Ocupación n (%)							
Ama de casa	1 (6,25)	1 (5,26)	2 (22,2)	1 (20)	3 (37,5)	2 (66,6)	0,025
Empleada	9 (56,2)	10 (52,6)	0 (0)	3 (60)	1 (12,5)	1 (33,3)	
Estudiante	4 (25)	6 (31,6)	3 (33,3)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	
Independiente	2 (12,5)	2 (10,5)	4 (44,4)	1 (20)	2 (25,5)	0 (0)	
Años de estudio cursados mediana (RIQ)	(n= 15) 16 (14-16)	(n=16) 16 (14-17)	(n=8) 8 (13,5-16)	(n=4) 11 (10-13,5)	(n=5) 10 (9-14)	(n=3) 11 (8-17)	0,0011
Estrato de vivienda n (%)							
Estrato 1	1 (6,2)	1 (5,26)	2 (22,2)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0,15
Estrato 2	3 (18,7)	4 (21)	4 (44,4)	3 (60)	2 (25)	2 (66,6)	
Estrato 3	2 (12,5)	6 (31,6)	2 (22,2)	1 (20)	3 (37,5)	1 (33,3)	
Estrato 4	9 (56,2)	7 (36,8)	0 (0)	1 (20)	2 (25)	0 (0)	
Estrato 5	0 (0)	1 (5,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Estrato 6	1 (6,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Sin clasificación	0 (0)	0 (0)	1 (11,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Seguridad Social**n (%)**

Contributivo	14 (87,5)	16 (84,2)	3 (33,3)	3 (60)	7 (87,5)	1 (33,3)	
Subsidiado	2 (12,5)	1 (5,3)	6 (66,6)	2 (40)	1 (12,5)	2 (66,6)	0,005
No asegurado	0 (0)	2 (10,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

En cuanto al análisis de las características establecidas como factores de riesgo para desarrollar CCU, en casi todos los grupos de estudio, la mayoría de las pacientes nunca ha fumado, y han tenido más de tres compañeros sexuales. El promedio de la edad de la primera relación sexual osciló entre los 16, 8 y los 19 años. El único factor que mostró una diferencia estadísticamente significativa fue tener antecedente de infección de transmisión sexual, siendo poco frecuente en las mujeres con citología normal mientras que la mayoría de las mujeres con lesiones premalignas y cáncer lo refirieron (Tabla 4).

Tabla 4.

Descripción de factores de riesgo establecidos para CCU en la población de estudio.

Característica	Normal VPH - (n=16)	Normal VPH+ (n=19)	NIC I (n=9)	NIC II (n=5)	NIC III (n=8)	CCU (n=3)	valor de p
Tabaquismo n(%)							
Nunca	13 (81,2)	19 (100)	7 (77,8)	3 (60)	7 (87,5)	3 (100)	
Fumaba, pero lo dejé	2 (12,5)	0 (0)	2 (22,2)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0,13
Si	1 (6,2)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	1 (12,5)	0 (0)	
No. de compañeros sexuales n (%)	(n=15)	(n=19)	(n=8)	(n=5)	(n=8)	(n=3)	
Uno	2 (13,3)	1 (5,3)	2 (22,2)	1 (20)	2 (25)	0 (0)	
Dos	2 (13,3)	3 (15,7)	1 (11,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,74
Tres o más	11 (73,4)	15 (78,9)	6 (66,6)	4 (80)	6 (75)	3 (100)	

Edad de primera relación sexual X(DS)	18,2 (2,7)	17,8 (3,2)	16,8 (2,3)	17,8 (2,6)	16,8 (3,2)	19 (2,6)	0,91
ETS n (%)	(n=12)	(n=17)	(n=9)	(n=4)	(n=8)	(n=3)	
Si	2 (16,6)	2 (11,8)	8 (88,8)	3 (75)	6 (75)	3 (100)	<0,00 1
No	9 (75)	13 (76,4)	0 (0)	1 (25)	2 (25,5)	0 (0)	
No recuerda	1 (8,3)	2 (11,8)	1 (11,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Tipo de relaciones sexuales que practica n (%)	(n=16)	(n=19)	(n=9)	(n=5)	(n=8)	(n=3)	
Vaginal	5 (31,2)	10 (52,6)	6 (66,6)	3 (60)	7 (87,5)	2 (66,6)	
Vaginal –oral	9 (56,2)	6 (31,6)	3 (33,3)	1 (20)	1 (12,5)	0 (0)	0,33
Vaginal -oral-anal	2 (12,5)	3 (15,7)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	1 (33,3)	

Respecto a los antecedentes ginecológicos, el 50% de las pacientes tuvieron su primera menstruación entre los 12 y 14 años. El promedio de edad a la que tuvieron su primer embarazo osciló entre los 18 y 22 años, siendo más jóvenes las mujeres con NIC I y de mayor edad las mujeres con citología normal sin infección por VPH ($p=0,0155$). En todos los grupos de estudio, la mediana de embarazos totales fue de dos excepto en las pacientes VPH negativas con citología normal, de igual forma que el número de hijos nacidos vivos (Tabla 5).

Tabla 5.

Descripción de los antecedentes ginecológicos en la población de estudio.

Característica	Normal VPH - (n=16)	Normal VPH+ (n=19)	NIC I (n=9)	NIC II (n=5)	NIC III (n=8)	CCU (n=3)	valor de p
Edad de la primera menarquia mediana (RIQ)	(n=16) 12 (12-13)	(n=18) 12 (11-13)	(n=9) 13 (9-13)	(n=5) 13 (12-14)	(n=8) 14 (13,5-15)	(n=3) 12 (12-15)	0,35
Edad del primer	(n=7) 22 (3,8)	(n=6) 20 (3,3)	(n=5) 18 (2,4)	(n=4) 21 (6,2)	(n=6) 20,5 (6,3)	(n=2)	0,0155

embarazo X(DS)						19,5 (3,5)	
Embarazos totales mediana (RIQ)	(n=7) 1 (1-3)	(n=6) 2 (1-2)	(n=5) 2(1-3)	(n=4) 2,5 (1,5- 5)	(n=7) 2(1-3)	(n=2) 2,5(2-3)	0,84
Número de hijos nacidos vivos mediana (RIQ)	(n=7) 1(1-3)	(n=6) 2 (1-2)	(n=5) 2 (1-3)	(n=4) 2 (1,5- 3,5)	(n=7) 2(1-2)	(n=2) 2,5(2-3)	0,76

Finalmente se describieron los datos de los diferentes métodos anticonceptivos empleados por las pacientes del estudio. En el grupo de las pacientes con citología normal (VPH positivas y negativas) más del 90% no se ha practicado ligadura de trompas, aproximadamente el 54% planifica actualmente y el método de planificación más usado es el condón para las mujeres VPH positivas (n=6, 54,5%) y el dispositivo intrauterino para las VPH negativas (n=2, 22%). En el grupo de pacientes NIC I, II y III, la mayoría de ellas no se ha practicado ligadura de trompas (77,8%, 80% y 100%, respectivamente), sólo cuatro pacientes con NIC I planifican actualmente, una con NIC II y cinco con NIC III, principalmente usan condón, pastillas o inyección. En el grupo de pacientes con CCU, las tres pacientes refirieron que no planifican (Tabla 6).

Tabla 6.

Tipo de método de planificación familiar en la población de estudio.

Característica	Normal VPH - (n=16)	Normal VPH+ (n=19)	NIC I (n=9)	NIC II (n=5)	NIC III (n=8)	CCU (n=3)	valor de <i>p</i>
Ligadura de trompas n (%)							
Si	1 (6,2)	1 (5,3)	2 (22,2)	1 (20)	0 (0)	1 (33,3)	0,28
No	15 (93,8)	18 (94,7)	7 (77,8)	4 (80)	8 (100)	2 (66,7)	

Planifica actualmente n (%)							
Si	9 (56,2)	10 (52,6)	4 (44,4)	1 (20)	5 (62,5)	0 (0)	0,41
No	7 (43,7)	9 (47,3)	5 (55,6)	4 (80)	3 (37,5)	3 (100)	
Tipo de anticonceptivos n (%)	(n=9)	(n=11)	(n=4)	(n=1)	(n=5)	(n=0)	
Condón	1 (11,1)	6 (54,5)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Condón + pastillas	0 (0)	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Pastillas	4 (44,4)	1 (9,1)	1 (25)	0 (0)	2 (40)	0 (0)	
Inyección	1 (11,1)	1 (9,1)	1 (25)	1 (100)	3 (60)	0 (0)	0,22
Implante en el brazo	1 (11,1)	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Dispositivo intrauterino	2 (22,2)	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

4.2 Genotipificación de las mujeres participantes en el estudio.

De un total de 44 mujeres positivas para infección por VPH (mujeres con citología normal VPH positivo y mujeres con lesión) el 52,3% presentaron infección por un único genotipo, el 36,4% presentaron coinfecciones con genotipos VPH-AR/BR seguido de infecciones por VPH-AR/AR (6,8%) y VPH-BR-BR (4,5%) (Figura 3).

La frecuencia por genotipos de alto y bajo riesgo también fue determinada. Se encontró que los genotipos más prevalentes en mujeres incluyendo infección con citología normal y lesión fueron VPH-16 (n=9), VPH-31 (n=7) y VPH-51 (n=5). Así mismo, los genotipos VPH-BR fueron VPH-62/81 y VPH-42 (n=7) (Figura 4 y 5).

Figura 3.

Frecuencia de infecciones únicas y múltiples por VPH.

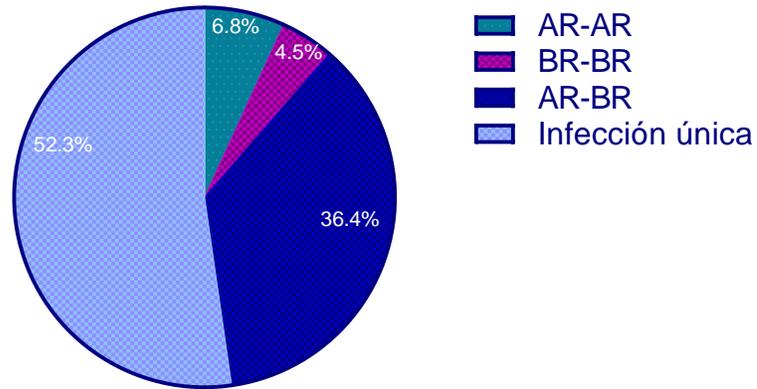


Figura 4.

Frecuencia de infección por VPH-AR en la población de estudio.

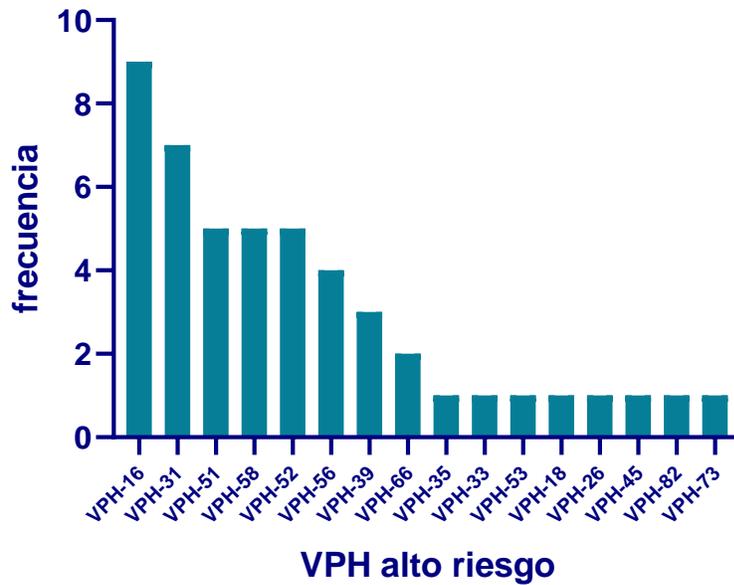
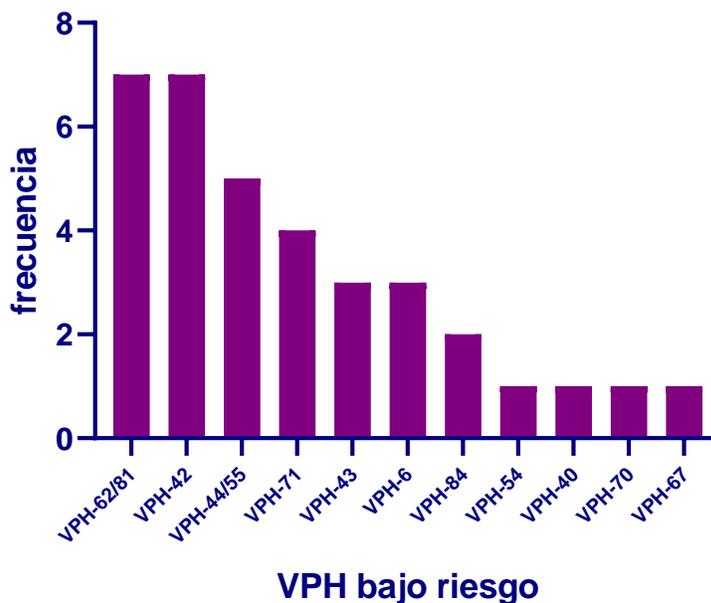


Figura 5.

Frecuencia de infección por VPH-BR en la población de estudio.



4.3 Relación entre los títulos de anticuerpos anti-VPH presentes en suero contra los péptidos sintéticos y el tipo de lesión presente en cuello uterino.

Inicialmente se tomaron los 6 péptidos sintetizados (tres originales y tres modificados) y se procuró estandarizar cada uno utilizando la técnica de ELISA. Para esto, como controles positivos se utilizaron sueros de niñas vacunadas con la vacuna tetravalente para VPH y como controles negativos sueros de niñas que no hubiesen iniciado vida sexual. Solo fue posible estandarizar las condiciones del ELISA para los péptidos 47 con su modificación 49 y 50 con su modificación 51.

Para el péptido 50 y su modificación 51 se observó una diferencia significativa en el promedio de la densidad óptica entre los grupos, siendo mayor en el grupo de las pacientes infectadas con VPH y menor en el grupo con CCU. Por otra parte, los grupos de lesión NIC I y NIC II presentaron un comportamiento similar en todos los péptidos y NIC III fue diferente respecto a los demás grupos de lesión. El grupo de pacientes con CCU presentó las densidades ópticas más bajas, respecto a todos los grupos de comparación. Esto pudo deberse al estado de inmunosupresión de las pacientes, resultante por el tratamiento por quimioterapia y radio terapia ya iniciado al momento de la toma de muestra (Tabla 7).

Tabla 7.

Promedio y desviación estándar de las densidades ópticas de la prueba de ELISA de acuerdo con el estado de infección por VPH y tipo de lesión presente.

Péptido	Normal VPH negativo (n=16)	Normal VPH positivo (n=19)	NIC I (n= 11)	NIC II (n=5)	NIC III (n=8)	Cáncer (n=3)	Valor de p*
47 X(DS)	0,71 (0,30)	0,82 (0,28)	0,66 (0,27)	0,62 (0,16)	0,84 (0,32)	0,51 (0,25)	0,27
49 X(DS)	0,79 (0,36)	0,91 (0,27)	0,68 (0,34)	0,67 (0,35)	0,76 (0,26)	0,54 (0,25)	0,26
50 X(DS)	0,69 (0,26)	1,00 (0,24)	0,69 (0,17)	0,68 (0,28)	0,93 (0,24)	0,61 (0,14)	0,0007
51 X(DS)	0,74 0,31	1,03 (0,23)	0,76 (0,27)	0,80 (0,28)	0,94 (0,28)	0,46 (0,15)	0,0041

*Prueba de ANOVA

Para los siguientes análisis se unificaron los grupos de lesión NIC I y II debido a la similitud del promedio de la densidad óptica. Además, el grupo de CCU no se tuvo en cuenta debido a que presentó densidades ópticas consistentemente más bajas que el resto de los grupos. Considerando

estos cuatro grupos se observó una diferencia estadística de las densidades ópticas para los péptidos 50 y 51 (Tabla 8).

Tabla 8.

Promedio y desviación estándar de las densidades ópticas de la prueba de ELISA por grupo de estudio.

Péptido	Normal VPH negativo (n=16)	Normal VPH positivo (n=19)	NIC I-II (n=16)	NIC III (n=8)	Valor de p*
47 X (DS)	0,71 (0,30)	0,82 (0,28)	0,64 (0,24)	0,84 (0,32)	0,22
49 X (DS)	0,79 (0,36)	0,91 (0,27)	0,68 (0,33)	0,76 (0,26)	0,20
50 X (DS)	0,69 (0,26)	1,00 (0,24)	0,68 (0,20)	0,93 (0,24)	0,0002
51 X (DS)	0,74 (0,31)	1,03 (0,23)	0,77 (0,26)	0,94 (0,28)	0,0091

*Prueba de ANOVA

Al comparar los grupos entre ellos no se observaron diferencias en las densidades ópticas para los péptidos 47 y 49 (Figura 6 y 7). Por otra parte, para el péptido 50 el grupo de mujeres con citología normal VPH negativas fue significativamente menor que el grupo de mujeres con citología normal VPH positivas y que el grupo de pacientes con NIC III. Así mismo, se observó que el grupo con NIC I-II presentó menores densidades ópticas que el grupo de mujeres con citología normal VPH positivas y que el grupo con NIC III (Figura 8). Para el péptido 51 el promedio de las densidades ópticas del grupo de mujeres con citología normal VPH positivas fue de 1,03, este fue significativamente mayor que el del grupo de mujeres con citología normal (0,74) y que el del grupo de NIC I-II (0,77) (Tabla 8, Figura 9).

Figura 6.

Densidad óptica de la prueba de ELISA utilizando péptido 47 por grupos de estudio.

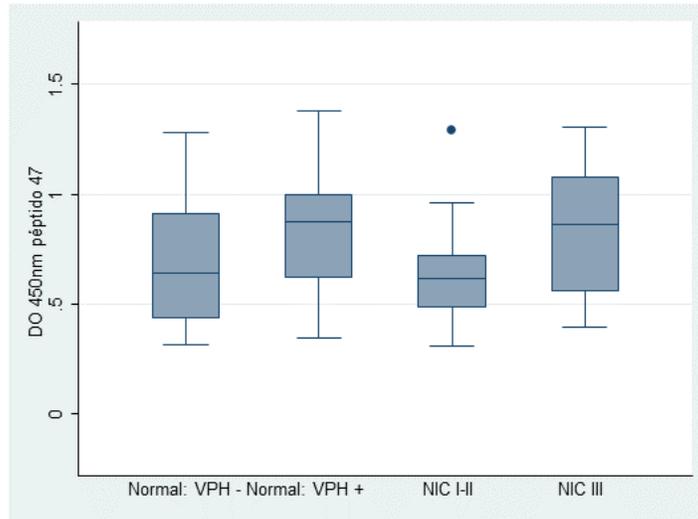


Figura 7.

Densidad óptica de la prueba de ELISA utilizando el péptido 49 por grupos de estudio.

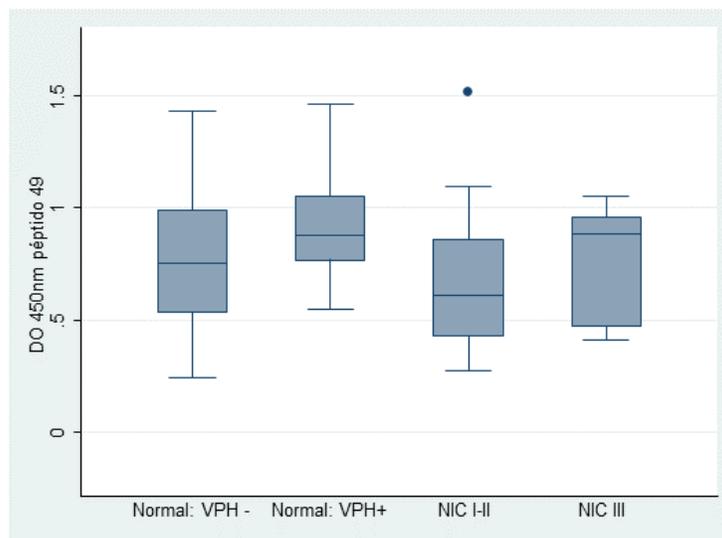


Figura 8.

Densidad óptica del péptido 50 por grupos de estudio.

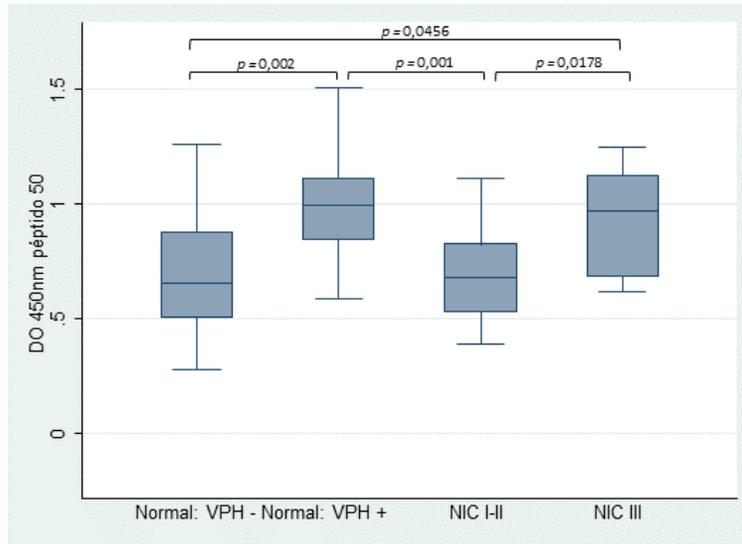
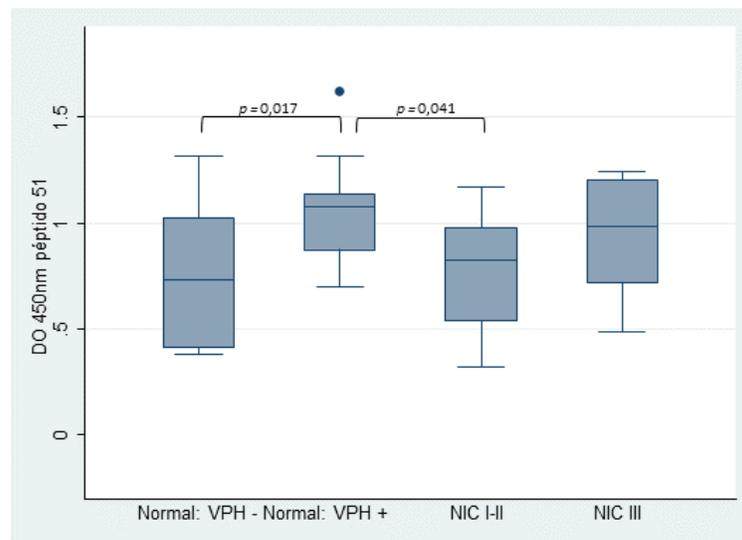


Figura 9.

Densidad óptica del péptido 51 por grupos de estudio.



Adicionalmente, se evaluó la relación entre los anticuerpos generados por la presencia de la infección y la capacidad de reconocimiento de los péptidos sintetizados. Se observó que el promedio de las densidades ópticas fue muy similar para los péptidos 47 y 49, y diferenciales en los péptidos 50 y 51, siendo significativamente mayor el promedio de las densidades ópticas para el grupo de pacientes infectadas que las no infectadas (Tabla 9).

Tabla 9.

Promedio y desviación estándar de las densidades ópticas de las pruebas de ELISA por estatus de la infección por VPH.

Péptido	VPH negativo (n=16)	VPH positivo (n=43)	Valor de <i>p</i> *
47 X(DS)	0,71 (0,30)	0,76 (0,28)	0,56
49 X(DS)	0,79 (0,36)	0,79 (0,30)	0,97
50 X(DS)	0,69 (0,26)	0,87 (0,26)	0,0243
51 X(DS)	0,74 (0,31)	0,93 (0,27)	0,0427

* Prueba t de Student

4.4 Sensibilidad y especificidad de los péptidos originales y sus modificaciones comparados con la clasificación del sistema de Bethesda.

Por otra parte, se evaluó la sensibilidad y especificidad de los péptidos sintetizados utilizando diferentes agrupaciones. Para esto, se determinaron puntos de corte de cada péptido utilizando 10 sueros de niñas sin previo contacto sexual y obteniendo las absorbancias al

interactuar con los diferentes péptidos sintetizados. Para el péptido 47 se determinó que esta interacción era positiva cuando superaba una absorbancia de 0,942, para el péptido 49 el punto de corte fue de 0,803, para el péptido 50 fue de 1,004 y para el péptido 51 fue de 1,159.

En general ninguno de los péptidos presentó una buena sensibilidad en los grupos estudiados. Tanto los péptidos originales como los modificados alcanzan a detectar un poco menos del 40% de las mujeres que tienen la lesión en todos los grupos de comparación (Tablas 10-13).

Además, aunque los porcentajes de especificidad se comportaron mejor comparados con la sensibilidad, la especificidad fue superior a 85% cuando se agruparon las mujeres en pacientes con NIC III (grupo con lesión severa) o mujeres con citología normal/NICI-II (Grupo con lesión de bajo y moderado grado de enfermedad). El porcentaje de correctamente clasificadas fue inferior al 80% en todos los péptidos y el área bajo la curva no superó el 0,6 (Tablas 12 y 13). Sin embargo, el péptido 51 fue el que tuvo mayor porcentaje de clasificación correcta (79,6) y área bajo la curva (0,599) cuando se agruparon las mujeres en pacientes con NIC III (grupo enfermo) o mujeres con citología normal/NICI-II (Grupo sin enfermedad) (Tabla 13).

Tabla 10.

Sensibilidad, especificidad y AUC del ELISA utilizando el péptido 47.

Clasificación por grupos de estudio	Sensibilidad %	Especificidad %	Correctamente clasificados %	Área bajo la curva (AUC)
NIC + Ca vs Normal	37,5	54,3	50,0	0,459
NICs vs Normal	37,5	58,1	52,5	0,478

NIC III vs normal-NICI-II	25,0	90,7	72,8	0,578
---------------------------	------	------	------	-------

Tabla 11.

Sensibilidad, especificidad y AUC del ELISA utilizando el péptido 49.

Clasificación por grupos de estudio	Sensibilidad %	Especificidad %	Correctamente clasificados %	Área bajo la curva (AUC)
NIC +Ca vs Normal	35	43,4	43,1	0,412
NICI-III vs Normal	35	51,4	45,4	0,432
NIC III vs normal-NICI-II	20	88,5	63,4	0,542

Tabla 12.

Sensibilidad, especificidad y AUC del ELISA utilizando el péptido 50.

Clasificación por grupos de estudio	Sensibilidad %	Especificidad %	Correctamente clasificados %	Área bajo la curva (AUC)
Lesión vs Normal	33,3	53,1	48,3	0,433
NICs vs Normal	33,3	56,8	50,8	0,450
NIC III vs normal-NICI-II	26,6	90,1	74,6	0,587

Tabla 13.

Sensibilidad, especificidad y AUC del ELISA utilizando el péptido 51.

Clasificación por grupos de estudio	Sensibilidad %	Especificidad %	Correctamente clasificados %	Área bajo la curva (AUC)
Lesión vs Normal	40,0	55,7	53,2	0,479
NICs vs Normal	40,0	59,2	55,9	0,495

NIC III vs normal-NICI-II	30,0	89,8	79,6	0,599
---------------------------	------	------	------	-------

4.5 Discriminación de inmunidad natural vs Inmunidad adquirida.

Así mismo, se evaluó si estos péptidos eran capaces de diferenciar inmunidad natural de inmunidad adquirida. Al principio se definió como inmunidad natural los grupos de individuos con citología normal VPH positivo, NIC I-II y III que se tuvo certeza de que son VPH positivas por la genotipificación y podrían haber desarrollado anticuerpos; no se consideraron las pacientes con cáncer dado los resultados obtenidos (densidad óptica baja) y se definió como inmunidad adquirida a todas las pacientes vacunadas con la vacuna tetravalente para VPH que fueron controles positivos en la estandarización de la técnica. En general las pacientes con inmunidad adquirida mostraron en promedio absorbancias más altas comparadas con la inmunidad natural en todos los péptidos, pero principalmente para los péptidos 50 y 51. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 14).

Tabla 14.

Promedio y desviación estándar de absorbancias de la ELISA en mujeres con inmunidad natural o inmunidad adquirida.

Péptido	Inmunidad adquirida (n=13)	Inmunidad natural (n=43)	Valor de p
47 X(DS)	0,88 (0,19)	0,76 (0,29)	0,1717
49 X(DS)	0,92 (0,33)	0,79 (0,30)	0,1938

50 X(DS)	1,00(0,26)	0,87 (0,26)	0,1088
51 X(DS)	1,10 (0,28)	0,93 (0,27)	0,1028

Por otra parte, se evaluó la diferencia que existe en los niveles de anticuerpos de mujeres sin infección al momento de la toma comparadas con pacientes vacunadas y la capacidad de reconocimiento de estos péptidos. Los péptidos 47 y 49 no discriminan las pacientes vacunadas de las no infectadas, mientras que el péptido 50 mostró diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos, siendo mayor las densidades ópticas para el grupo de pacientes de vacunadas que para las mujeres negativas en la genotipificación por VPH (Tabla 15). Así mismo la modificación 51 fue capaz de diferenciar pacientes sin infección por VPH de niñas vacunadas, y esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Tabla 15.

Promedio y desviación estándar de las absorbancias de pacientes sin infección por VPH vs vacunadas.

Péptido	Normal: VPH negativa (n=16)	Vacunadas (n=13)	Valor de p
47 X(DS)	0,71 (0,30)	0,79 (0,19)	0,09
49 X(DS)	0,79 (0,36)	0,92 (0,33)	0,32
50 X (DS)	0,69 (0,26)	1,00 (0,26)	0,0032
51 X (DS)	0,74 (0,31)	1,07 (0,28)	0,0092

4.6 Estudio de títulos de anticuerpos contra los péptidos de la proteína L1 presentes en los diferentes grupos de estudio y su relación con la distribución de los genotipos identificados de VPH.

Se determinaron las densidades ópticas por ELISA de los sueros retados de cada péptido de acuerdo con la distribución de los genotipos encontrados en los individuos por grupo de estudio. Se encontró que en pacientes infectados con VPH-BR, los sueros estudiados presentaron densidades ópticas altas contra todos péptidos analizados. (Figuras 10-13). Así mismo se observó que en las pacientes con NIC-I-II la presencia de coinfecciones VPH-BR-AR mostró un ligero aumento de las densidades ópticas para cada uno de los péptidos respecto a las infecciones solo con VPH-AR. En los péptidos 50 y 51 la presencia de VPH-AR mostró densidades ópticas más altas para las pacientes con lesiones con grado NIC III (Figuras 12 y 13).

Figura 10.

Densidad óptica del péptido 47 de acuerdo con la distribución de los genotipos por grupo de estudio.

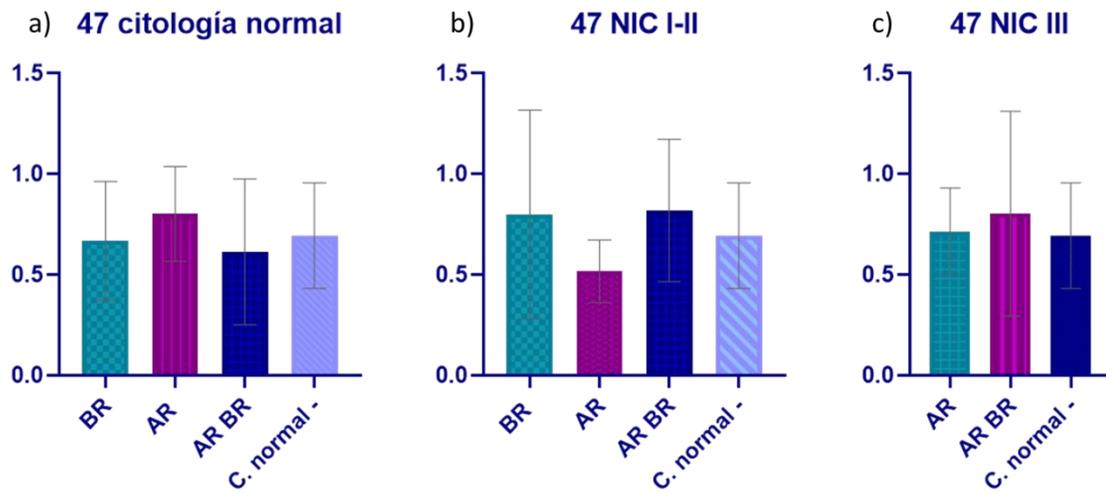


Figura 11.

Densidad óptica del péptido 49 de acuerdo con la distribución de los genotipos por grupo de estudio.

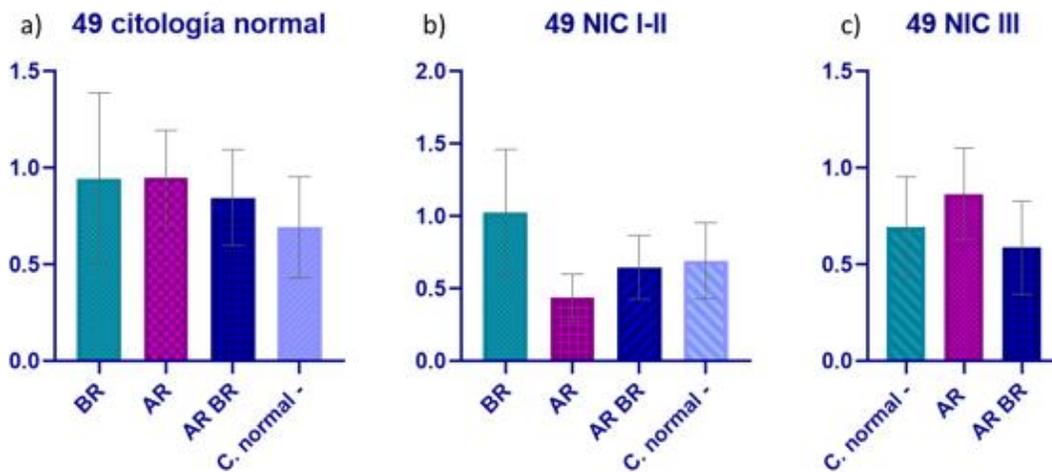
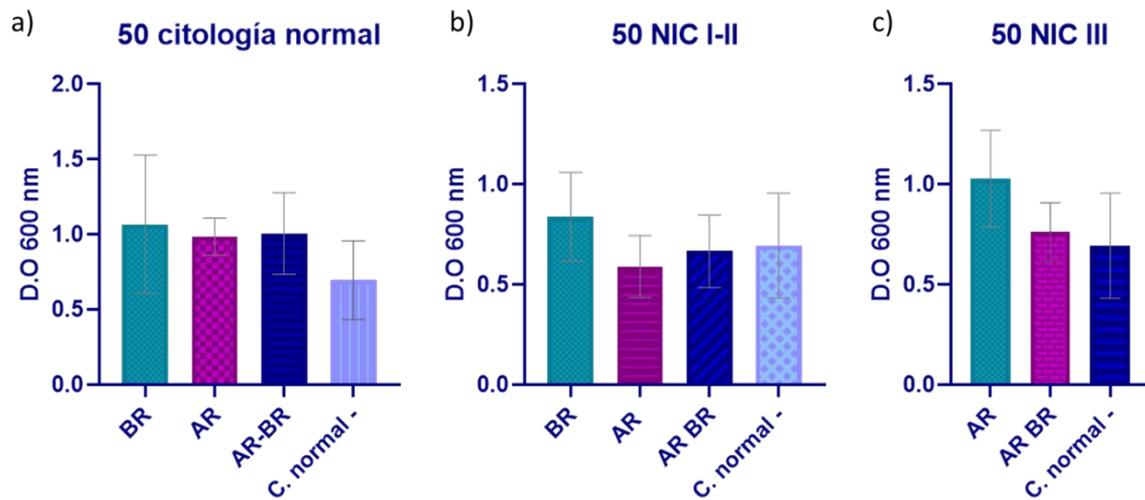
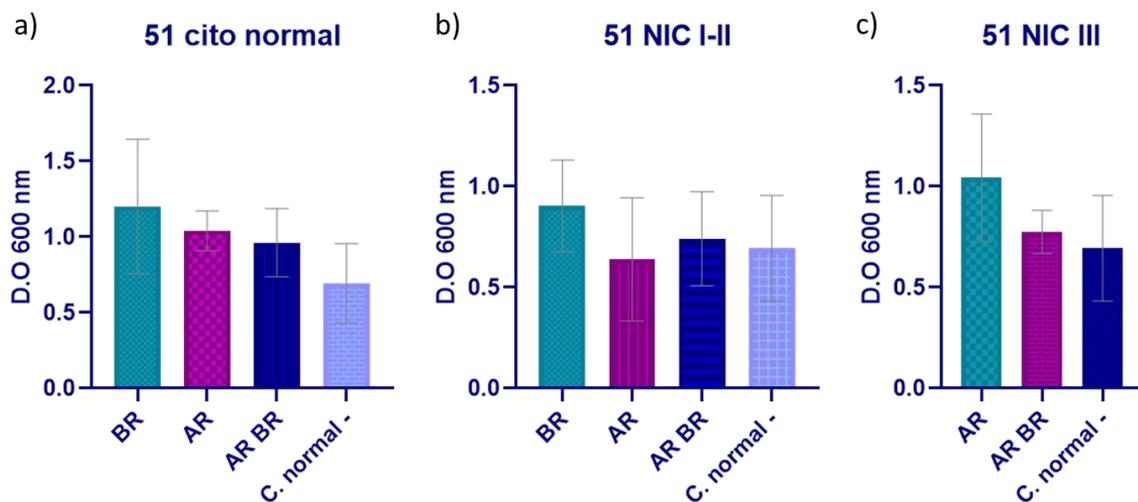


Figura 12.

Densidad óptica del péptido 50 de acuerdo con la distribución de los genotipos por grupo de estudio.

**Figura 13.**

Densidad óptica del péptido 51 de acuerdo con la distribución de los genotipos por grupo de estudio.



4.7 Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína L1 del VPH-AR y VPH -BR con los péptidos sintetizados.

Después de encontrar una alta reacción cruzada en los pacientes infectados con VPH-BR y los infectados con VPH-AR en los ensayos tipo ELISA utilizando los péptidos sintéticos, se realizó el alineamiento de las secuencias de los diferentes genotipos encontrados, respecto a los péptidos sintetizados. Al revisar la frecuencia de genotipos de acuerdo al grado de la lesión, se descargaron de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Center) las secuencias parciales de la proteína L1 de los genotipos de alto riesgo (18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) y bajo riesgo (6,11,40,42,43,44,54,61,62,67,70,72,81). Usando los softwares CLC Sequence Viewer y BLASTP, se realizó un alineamiento múltiple y se calculó el % de identidad entre las secuencias de aminoácidos de los genotipos de alto y bajo riesgo versus los péptidos sintetizados (Figuras 14 a 21).

Figura 14.

Alineamiento múltiple del Péptido 47 vs VPH-AR.

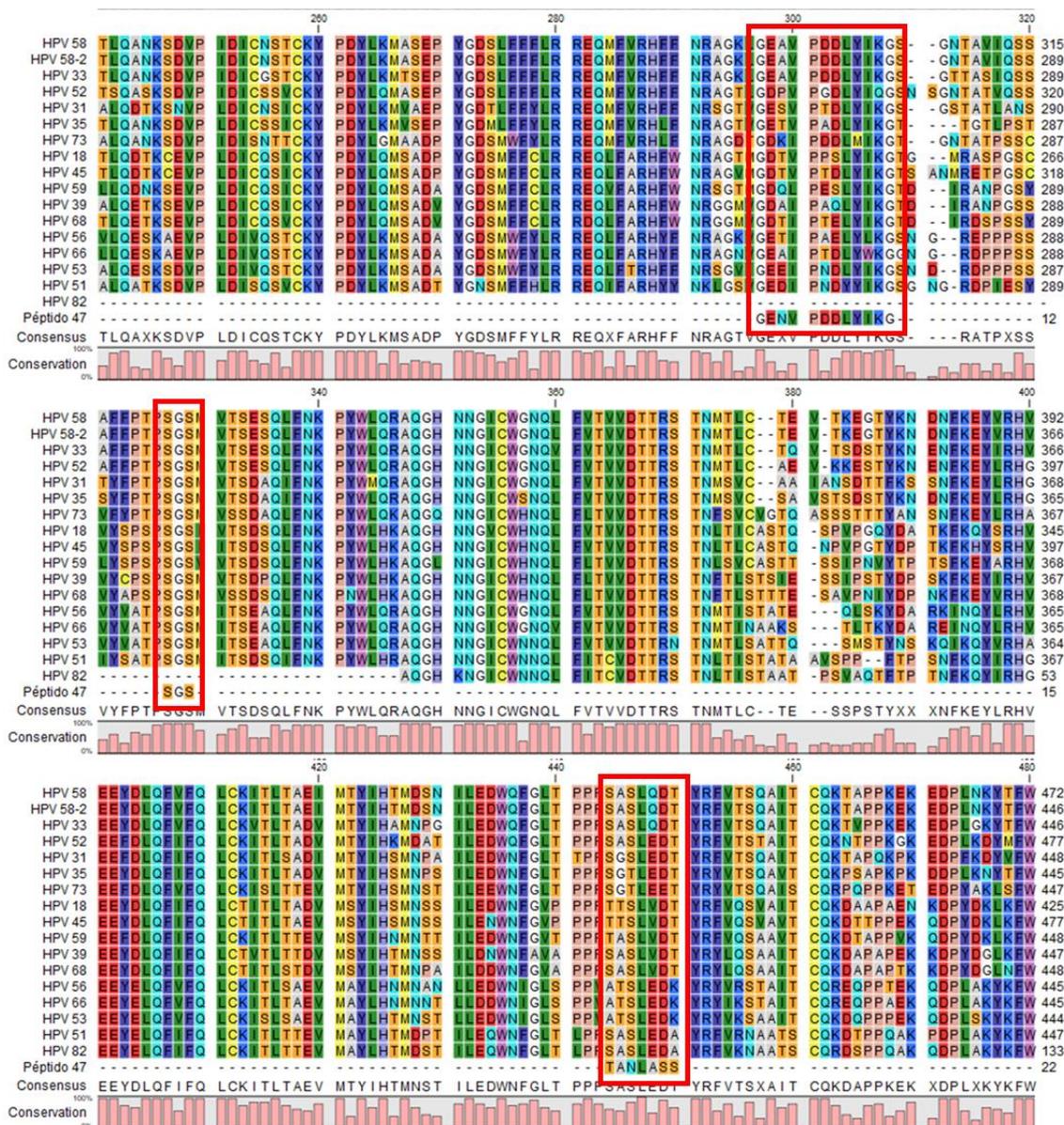


Figura 15.

Alineamiento múltiple del péptido 47 vs VPH-BR.

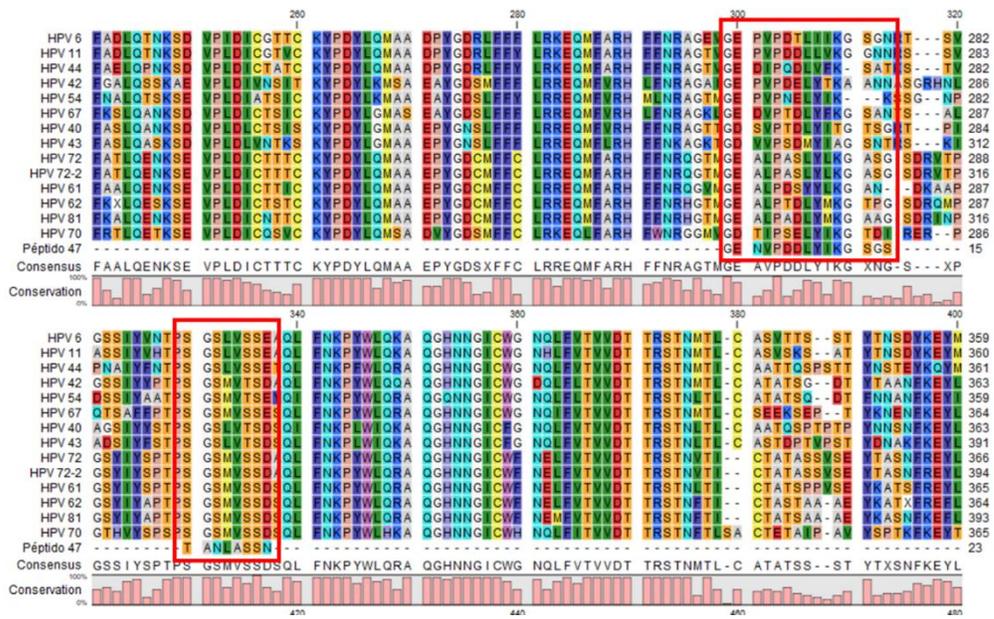


Figura 16.

Alineamiento múltiple del péptido 49 vs VPH-AR.

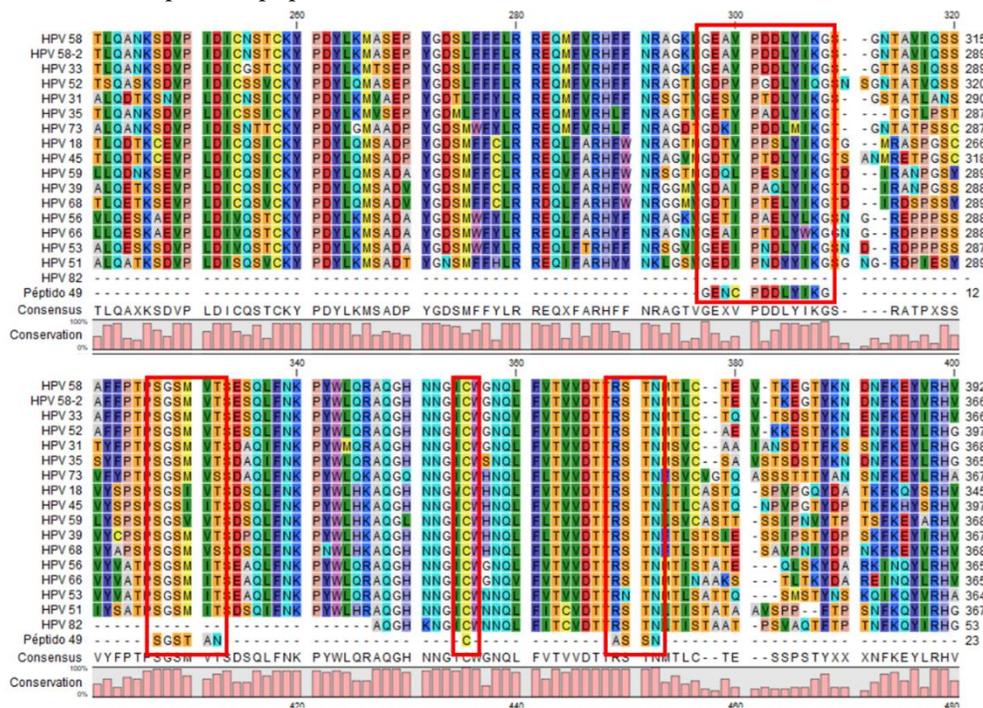


Figura 17.

Alineamiento múltiple del péptido 49 vs VPH-BR.

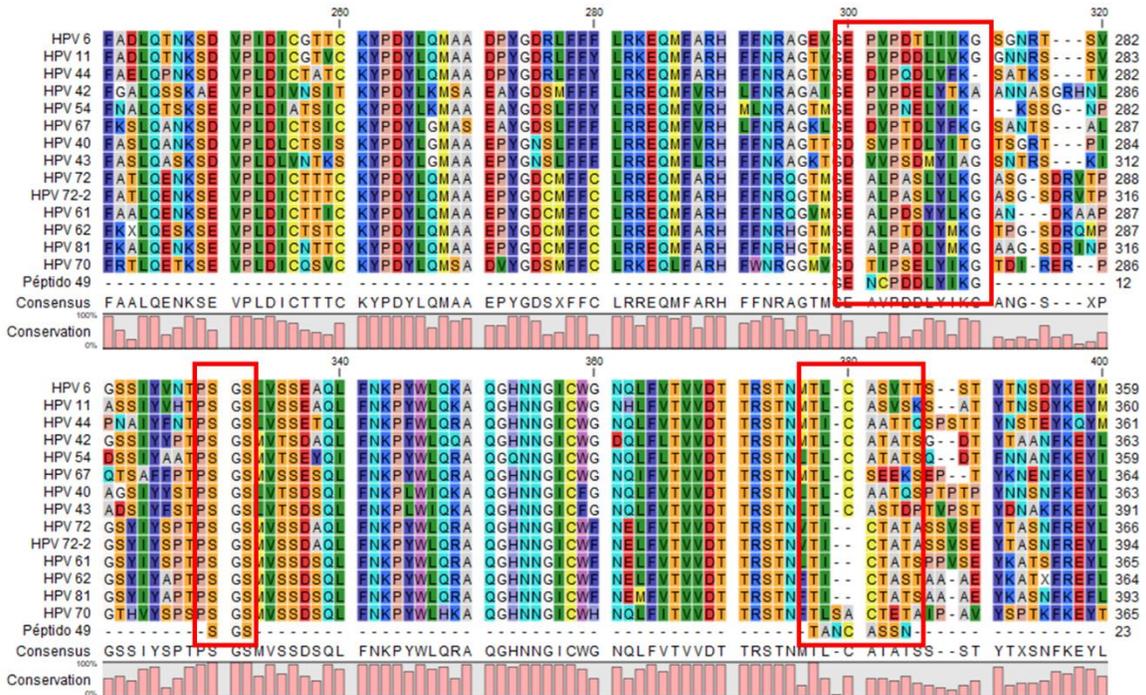


Figura 18.

Alineamiento múltiple del péptido 50 vs VPH-AR

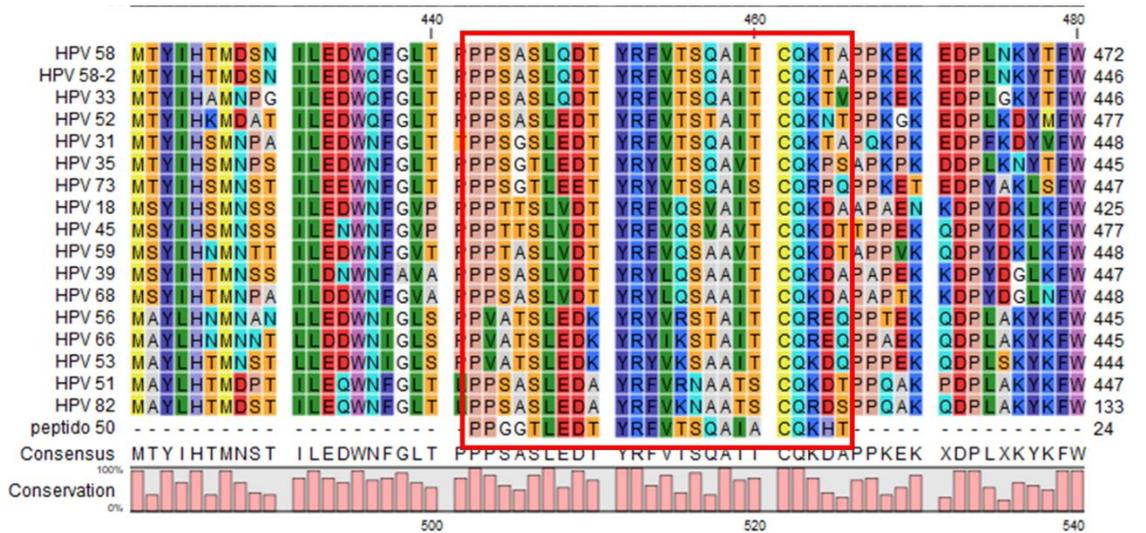


Figura 19.

Alineamiento múltiple del péptido 50 vs VPH-BR.

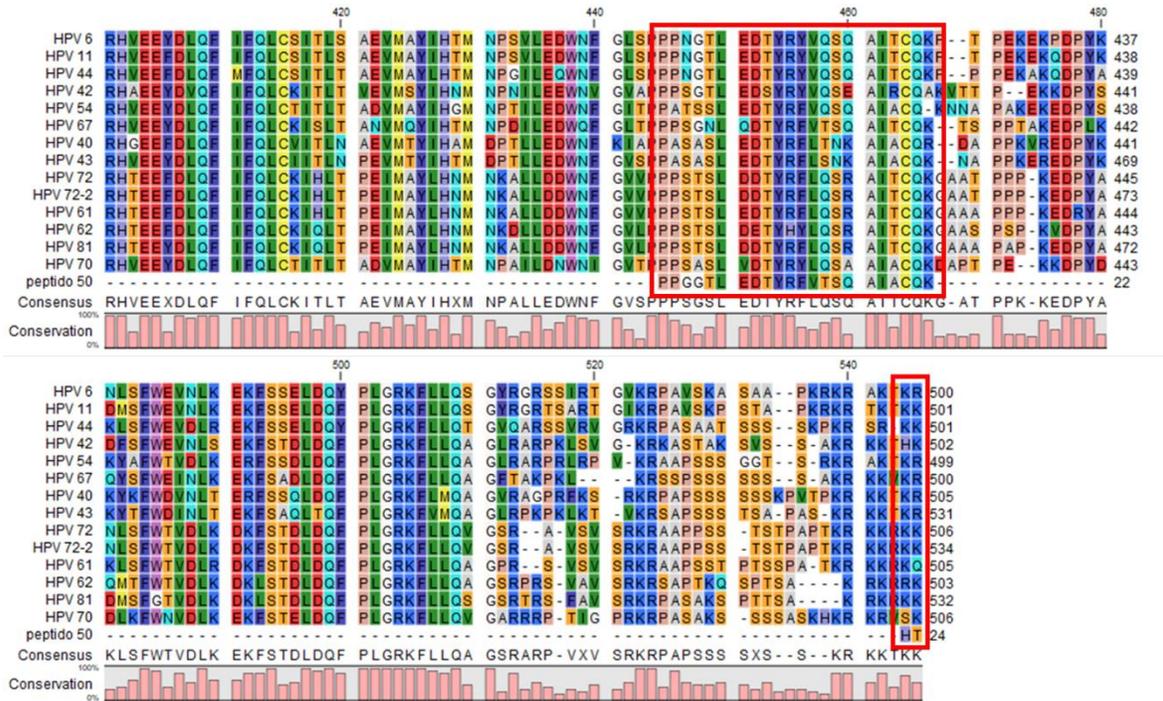


Figura 20.

Alineamiento múltiple del péptido 51 vs VPH-AR.

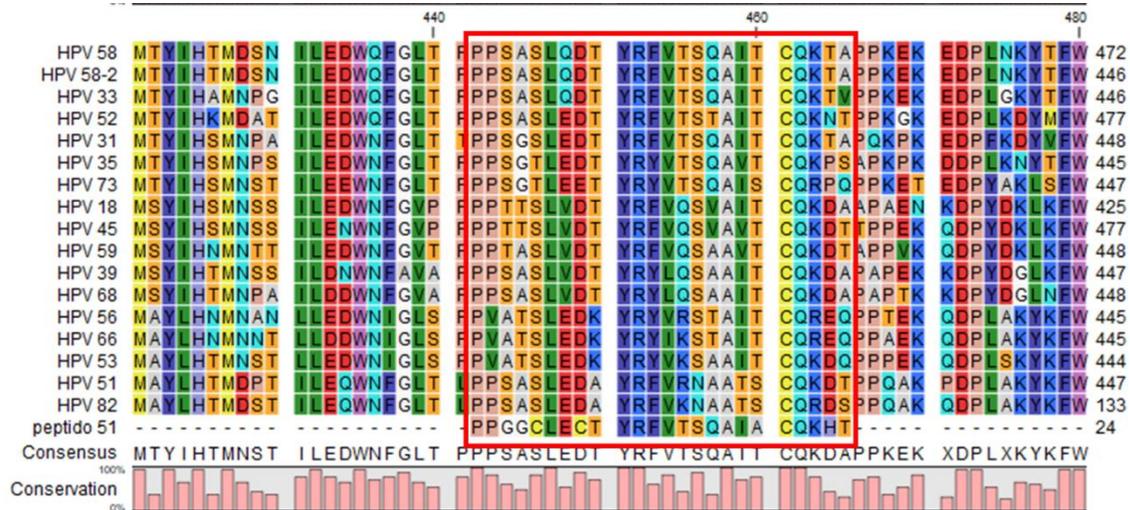
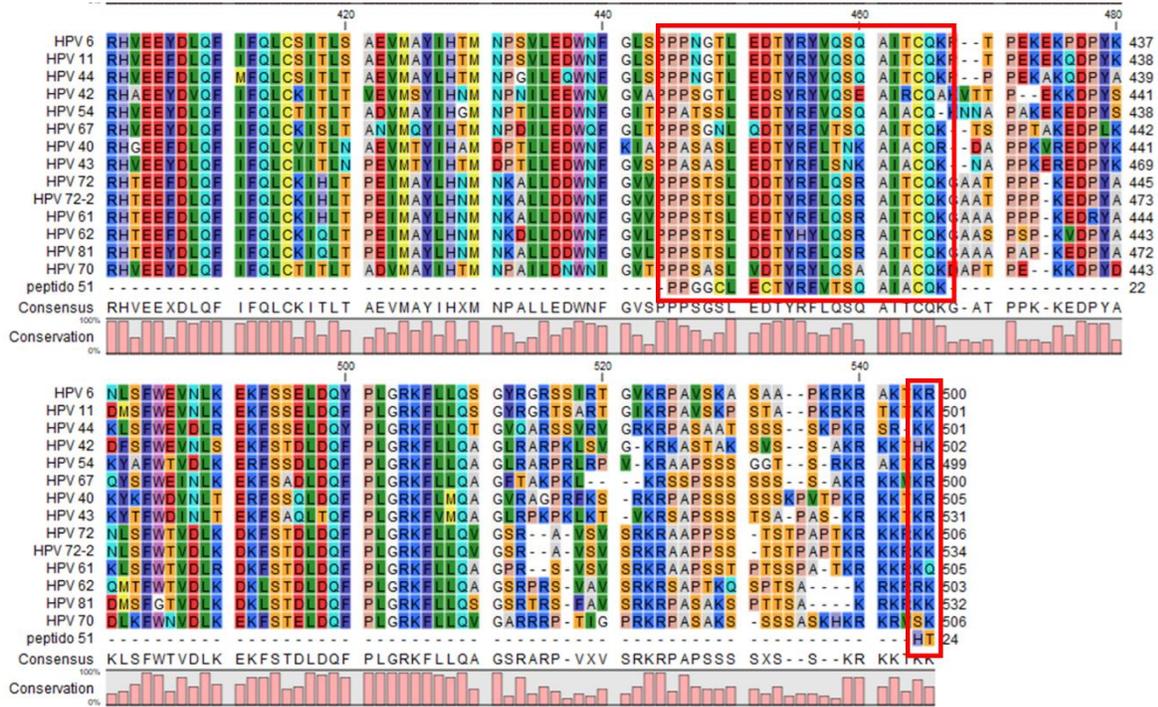


Figura 21.

Alineamiento múltiple del péptido 51 vs VPH-BR.



El porcentaje de identidad de las secuencias encontradas en el NCBI con respecto a los péptidos sintetizados de la proteína L1, varía de acuerdo con las secuencias peptídicas diseñadas. El péptido 50 tiene un porcentaje de identidad mayor que el péptido 47 en los genotipos de alto riesgo encontrados en este estudio con mayor frecuencia (VPH-16, VPH-31, VPH-52, VPH-56 y VPH-39), (Tabla 16). Así mismo los genotipos de bajo riesgo más prevalentes presentaron mayor porcentaje de identidad en las secuencias del péptido 50 respecto al péptido 47 (excepto en VPH-62). El porcentaje de identidad de las secuencias con sus genotipos correspondientes para las modificaciones de los péptidos presentó alta variabilidad. En general para algunos genotipos, la

modificación fue favorable en los péptidos 50-51(VPH-18-53-56-58) y en los péptidos 47-49 (VPH-35-45-52), (Tabla 17).

Tabla 16.

Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de la proteína L1 de los genotipos VPH-AR identificados en nuestro estudio y las secuencias de los péptidos 47-49-50 y 51.

GENOTIPOS ALTO RIESGO	% identidad Péptido 47	% identidad Péptido 49	% identidad Péptido 50	%identidad Péptido 51
HPV 18	64.29	85.71	68.18	78.57
HPV 16	100	91.30	100	91.67
HPV 31	81.82	82.35	86.36	81.82
HPV 33	77.27	72.73	77.27	72.73
HPV 35	61.90	75	81.82	72.73
HPV 39	50	43.48	59.09	64.29
HPV 45	57.89	64.29	62.50	68.75
HPV 51	71.43	71.43	58.33	54.17
HPV 52	58.33	66.67	75.00	70.83
HPV 53	76.92	76.92	65.22	69.23
HPV 56	61.54	61.64	63.64	66.67
HPV 58	88.24	82.83	77.27	72.73
HPV 58-2	88.24	82.83	77.27	72.73
HPV 66	66.67	66.67	59.09	58.33

HPV 73	64.71	64.71	80.95	76.19
HPV 82	0	0	57.14	52.38

Nota: En rojo se evidencian los péptidos que tuvieron mayor porcentaje de identidad al momento de realizar el alineamiento con la proteína L1 de los genotipos de VPH-AR

Tabla 17.

Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de la proteína L1 de los genotipos VPH-BR identificados en nuestro estudio y las secuencias de los péptidos 47-49-50 y 51.

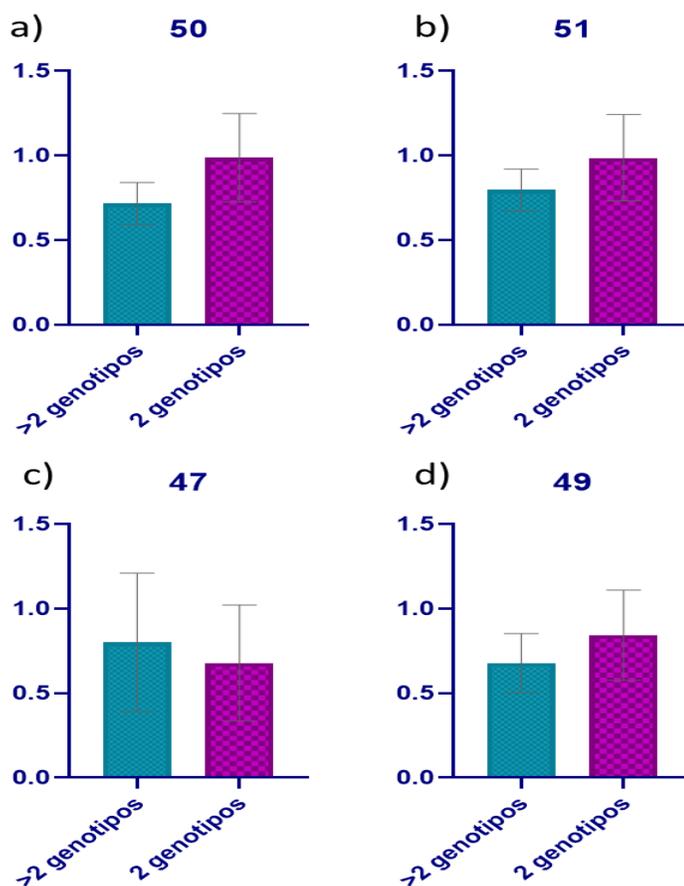
GENOTIPOS BAJO RIESGO	% identidad Péptido 47	% identidad Péptido 49	% identidad Péptido 50	% identidad Péptido 51
HPV 6	59.09	71.43	70.83	70.83
HPV 40	64.71	58.82	75	75
HPV 42	48	52.38	71.43	71.43
HPV 43	70	66.67	70.59	70.59
HPV 44	62.50	62.50	72.73	72.73
HPV 54	72.73	63.54	88.24	88.24
HPV 62	62.50	66.67	57.14	57.14
HPV 67	59.09	62.50	77.27	77.27
HPV 70	58.33	75	71.43	71.43
HPV 81	62.50	66.67	71.43	71.43

Nota: En rojo se evidencian los péptidos que tuvieron mayor porcentaje de identidad al momento de realizar el alineamiento con la proteína L1 de los genotipos de VPH-BR

Dada la alta prevalencia de coinfecciones, la presencia de dos o más genotipos respecto a las densidades ópticas obtenidas, también fue estudiada. Se observó que cuando había coinfecciones por más de dos genotipos de alto o bajo riesgo las densidades ópticas disminuyeron en 3 de los 4 péptidos estudiados (49, 50 y 51) (Figura 22).

Figura 22.

Densidades ópticas de los péptidos originales y modificados de acuerdo con coinfecciones con dos o más VPHs a). Péptido original 50. b) péptido modificado 51. c) Péptido original 47. d) péptido modificado 49.



5. Discusión

Este es el primer estudio en población santandereana que evalúa los anticuerpos generados de acuerdo con el estatus de infección por VPH y al tipo de lesión presente en cuello uterino, para poder usarlo como biomarcador diagnóstico. Se evaluó su exactitud diagnóstica y si al realizar modificaciones químicas en los péptidos utilizados, es posible aumentar el rendimiento de reconocimiento de péptidos sintéticos de la proteína capsomérica L1 con los respectivos anticuerpos naturales generados contra esta proteína.

La población estudiada en general son mujeres jóvenes, con una mediana de edad entre los 28 y 33 años. Los años de estudio cursados, en general superan los 8 años continuos y su estrato socioeconómico fue muy variado (de uno a seis) (Tabla 3). Entre los factores de riesgo para desarrollar CCU en los grupos de estudio, se observó que más del 60% de las mujeres participantes han tenido más de tres compañeros sexuales, la edad de la primera relación sexual en promedio fue entre los 16 y 19 años, y en los grupos de estudio con citología normal, NIC II y cáncer al menos el 12% practica relaciones sexuales, por vía vaginal, oral y anal (Tabla 4).

Evaluar las características socio demográficas de la población es importante ya que los estudios en Colombia muestran que existen diferencias estadísticamente significativas respecto al acceso de la atención en salud, su estrato socioeconómico y grado de alfabetismo. Aunque en la población estudiada en general, la mayoría de las participantes son del régimen contributivo,

particularmente para el grupo de las pacientes con cáncer invasivo dos de las tres mujeres pertenecen al régimen subsidiado. La realización de la prueba de Papanicolaou en Colombia es la herramienta principal para la prevención de CCU. Se ha estudiado que, según el área de residencia, el nivel de escolaridad y el tipo de seguridad social, es más difícil acceder a programas de prevención de CCU y que personas con un régimen de seguridad social subsidiado tienen un 40% menos de atención en salud comparados con el contributivo. La educación también es un factor primordial a la hora de realizar la citología, ya que se ha documentado que en las mujeres de escolaridad baja o nula el acceso a la prueba es menor, principalmente en zonas rurales y mujeres que no tienen conocimiento acerca del CCU, lo que limita su derecho a los programas de salud, quedando de manifiesto que tienen mayor riesgo de presentar CCU en algún momento de su vida (Bermedo-Carrasco et al., 2015; Calderón et al., 2011; Castro-Jiménez et al., 2006; Lucumi Cuesta & Gomez Gutierrez, 2004).

Por otra parte, se determinaron los genotipos presentes en las mujeres participantes del estudio. De las 44 mujeres que estaban infectadas con VPH el 52,3% tenían infección única y el 47,7% coinfecciones entre genotipos de alto y bajo riesgo, alto y alto riesgo y bajo y bajo riesgo. Un estudio recientemente realizado por nuestro grupo de investigación en 1.111 mujeres que se practicaron autotoma para la detección de la infección por VPH, encontró una prevalencia de infección general en mujeres del 35,1 % (n= 389), encontrando VPH-AR con un 16,3% y VPH-BR 18,8%. (datos no publicados aun). En ese estudio los genotipos de alto riesgo más frecuentes fueron VPH-31, VPH-52 y en tercer lugar VPH-16. Para las participantes de este estudio, el genotipo más frecuente fue VPH-16 (n=9) seguido de VPH-31 (n=7) y VPH-51 (n=5) lo que muestra que la población santandereana presenta una alta variabilidad de genotipos circulantes y

el genotipo VPH-16 a pesar de ser frecuente, no es el único presente en la aparición de lesiones premalignas y cáncer en esta población. La variedad de genotipos circulantes es muy similar a un estudio realizado en la República del Congo en 1.870 mujeres de 25 a 82 años donde la prevalencia de infección general fue del 28,1%. Sin embargo, en ese estudio el genotipo más prevalente fue el VPH-68 (Mutombo et al., 2019).

La relación entre los títulos de anticuerpos anti-VPH presentes en sueros de mujeres no infectadas, con lesiones premalignas y cáncer fue evaluado. En general en las 3 participantes con cáncer, los niveles de anticuerpos fueron muy bajos incluso por debajo de mujeres sin infección (Tabla 7). Esto podría deberse a que estas pacientes estuvieron sometidas a ciclos extensos de quimio radioterapia que pueden haber comprometido el estado de salud y afectado la inmunidad al momento de la toma de muestra sanguínea.

Aunque algunos estudios, como el de Urquiza, et al., (2008), encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con CCU y con citología normal en mujeres de la ciudad de Bogotá con DO de 0,85 y 0,22 para estos grupos, respectivamente, estos resultados no se relacionan con los encontrados en este estudio, posiblemente porque las pacientes que ingresaron al presente estudio, presentaron CCU invasivo y su estado general de salud estaba afectado al momento de la toma.

Un estudio realizado en Colombia en 147 mujeres con CCU, y 147 mujeres con citología normal VPH negativo, para detectar la respuesta serológica por ELISA utilizando como antígenos las VLP, mostró respuestas de anticuerpos en el 82% de las mujeres con CCU y 56% en mujeres

sanas. A pesar que en este estudio se encontró asociación a una mayor supervivencia en pacientes con títulos altos de anticuerpos, en nuestro estudio, el tamaño de muestra de las pacientes con cáncer y su estado serológico no permitió encontrar ninguna asociación. Sin embargo, las mujeres con NIC III si mostraron esta tendencia de anticuerpos más altos respecto a los individuos con otros estadios de lesiones y respecto a las mujeres sanas y sin infección (Combata et al., 2002).

Dado que las muestras de las pacientes con NIC I y NIC II presentaron densidades ópticas muy similares, éstas fueron agrupadas. Por otra parte, el grupo de pacientes con cáncer no fue tenido en cuenta para los demás análisis por las razones explicadas anteriormente. Teniendo en cuenta esta reclasificación, se encontró que el promedio de la densidad óptica para el péptido 50 fue significativamente diferente entre los grupos. Al ver esta diferencia por separado se observa que el promedio de la densidad óptica del grupo NIC III fue estadísticamente mayor que el del grupo NIC I-II y que el de las pacientes con citología normal VPH negativas. Esto concuerda con lo estudiado por Urquiza, 2008 y colaboradores donde este péptido (416-EDTYRFVTQAIACQKHTPPA-436) con algunas modificaciones del nuestro (410-PPGGTLEDTYRFVTSQAIACQKHT-434), mostró que es capaz de discriminar sueros con lesiones cervicales de sueros de mujeres con citología normal (Urquiza, Guevara, et al., 2008), sugiriendo que podría ser un buen biomarcador de diferenciación por estado de infección y por estado de lesión.

Al revisar esta misma diferencia por los grupos de estudio para la modificación del péptido 50 (es decir, el péptido 51 como ha sido nombrado en este estudio), se encontró que solo puede discriminar los sueros de pacientes NIC I-II respecto a las mujeres VPH positivas. A pesar que los

péptidos 50 y 51 solo se diferencian en dos cisteínas insertadas en este último para mejorar la estabilidad del péptido, los resultados sugieren que este cambio no favorece la interacción antígeno-anticuerpo; contrastando la hipótesis de Urquiza y colaboradores en el 2012, donde encontraron que este tipo de modificaciones en péptidos derivados de virus de EBV reconocidos por anticuerpos naturales en la infecciones, aumentan su actividad biológica cuando se insertan cisteínas que disminuyen la entropía configuracional de los péptidos y generan mayor estabilidad en la unión antígeno-anticuerpo (Urquiza et al., 2012).

Los alineamientos múltiples realizados, demostraron que estos péptidos reconocen diferentes genotipos de alto y bajo riesgo, con porcentajes de identidad superiores al 50%. Específicamente para el péptido 50, se reconocen todos los genotipos de bajo riesgo encontrados en este estudio y la mayoría de los VPH-AR. Esto explica que el péptido 50 por ser diseñado de una región conservada de la proteína L1 del VPH y dada la prevalencia de genotipos en Santander, podría ser un mejor biomarcador ya que es capaz de unirse a la mayoría de los genotipos circulantes y con mayor efectividad que el péptido 47.

La alta presencia de coinfecciones en las mujeres de estudio mostró un comportamiento diverso. En mujeres con más de dos genotipos se observó que las densidades ópticas eran menores que cuando había infección única. Esto concuerda con lo reportado por Carter y colaboradores, donde se determinó que la presencia de más de un genotipo dificulta la especificidad de los epítopes reconocidos y esta seroprevalencia es transitoria respecto a infecciones persistentes por un único genotipo (Carter et al., 2000).

Para los péptidos 47 y 49 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estatus de infección y los diferentes grupos de lesiones. Esto puede ser debido a que estos péptidos sintetizados corresponden a secuencias de VPH-16, el genotipo más prevalente a nivel mundial, sin embargo en la población Santandereana en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación se encontraron todos los genotipos carcinogénicos con importancia clínica circulando en distintas frecuencias (datos aun no publicados), por tanto, los anticuerpos presentes en el grupo de estudio pueden podrían reconocer distintos epítomos correspondientes a secuencias diferentes a las diseñadas para estos péptidos (Tabla 8).

La sensibilidad y especificidad de los péptidos sintetizados en general no fue la esperada. Esto podría deberse al tamaño muestral, el cual no fue posible aumentar dadas las circunstancias actuales en el país, aunque se realizaron varias estrategias para la captación de mujeres con lesiones y CCU. Este estudio difiere de los resultados encontrados por Urquiza 2005, donde encontró una sensibilidad de 92-97% para estos péptidos y una especificidad del 89-95 %. Sin embargo, estos resultados no son comparables por las diferencias en el tamaño muestral (Urquiza et al., 2005).

Por otra parte, actualmente no se realizan ensayos para verificar el control de la vacunación en la población objeto. Los resultados encontrados sugieren que el péptido 50 podría ser un marcador que diferencia las mujeres con inmunidad post vacunación de mujeres que no cursan con infección. Sin embargo, los estudios hasta el momento solo se centran en la evaluación de las respuestas de células T específicas mediante ensayos costosos como ELISPOT (Yokomine et al., 2017). En el país esta tecnología no es posible como control de rutina por lo que un ensayo como el ELISA utilizando como antígeno el péptido 50 podría ser una propuesta que valdría la pena

ampliar en estudios poblacionales, dado estos resultados preliminares y teniendo en cuenta la necesidad de mejorar la prevención primaria en el país.

La principal limitación encontrada en este estudio es el tamaño de muestra para cada uno de los grupos de estudio. En general esto no permitió evaluar correctamente el rendimiento de los péptidos en cuanto a la sensibilidad y especificidad. El área bajo la curva obtenida indicó que las pacientes correctamente clasificadas están por debajo del 60% y esto no muestra un buen desempeño. Sin embargo, considerando las diferencias observadas entre las pacientes cuando se utilizó el péptido 50, se plantea la necesidad de continuar captando mujeres con lesiones premalignas y CCU para determinar el verdadero rendimiento de este péptido derivado de la proteína L1 del VPH.

Finalmente, se encontró que el péptido 50 podría ser un buen marcador para diferenciar la seropositividad en mujeres de acuerdo con el estatus de infección por VPH y el grado de la lesión (NIC I-II y III). El ensayo ELISA al ser de bajo costo puede ayudar en la tamización de mujeres con riesgo de CCU y así mismo, podría servir como un marcador de seguimiento en la generación de anticuerpos en niñas y mujeres vacunadas.

Referencias Bibliográficas

- Achour, M., Zeghal, D., Kochbati, L., Kahla, S., Zouari, F., Maâlej, M., & Oueslati, R. (2008). Antibody response for L1, E6 and E7 HPV 16 and HPV 18 antigens in Tunisian women with cervical cancer and controls. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, *29*(3), 266–280. <https://doi.org/10.1080/15321810802119638>
- Barrow-Laing, L., Chen, W., & Roman, A. (2010). Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. *Virology*, *400*(2), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.034>
- Bermedo-Carrasco, S., Peña-Sánchez, J. N., Lepnurm, R., Szafron, M., & Waldner, C. (2015). Inequities in cervical cancer screening among Colombian women: A multilevel analysis of a nationwide survey. *Cancer Epidemiology*, *39*(2), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.01.011>
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. zur, & de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, *401*(1), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>
- Bosch, F. X., Broker, T. R., Forman, D., Moscicki, A.-B., Gillison, M. L., Doorbar, J., Stern, P.

L., Stanley, M., Arbyn, M., Poljak, M., Cuzick, J., Castle, P. E., Schiller, J. T., Markowitz, L. E., Fisher, W. A., Canfell, K., Denny, L. A., Franco, E. L., Steben, M., ... Sanjosé, S. de. (2013). Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. *Vaccine*, 31, H1–H31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>

Broso, P. R., & Buffetti, G. (1993). The Papanicolaou classification in the Bethesda system (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland). *Minerva Ginecologica*, 45(11), 557–563.

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, Brotons M, Mena M, C., & R, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S, C. (2016). *Human Papillomavirus and Related Diseases in the World*. <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>

Calderón, C. A. A., Botero, J. C., Bolaños, J. O., & Martínez, R. R. (2011). Sistema de salud en Colombia: 20 años de logros y problemas. *Ciencia e Saude Coletiva*, 16(6), 2817–2828. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000600020>

Cam, H., & Dynlacht, B. D. (2003). Emerging roles for E2F: Beyond the G1/S transition and DNA replication. In *Cancer Cell* (Vol. 3, Issue 4, pp. 311–316). Cancer Cell. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00080-1)

Carter, J. J., Koutsky, L. A., Hughes, J. P., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N., & Galloway, D. A. (2000). Comparison of Human Papillomavirus Types 16, 18, and 6 Capsid Antibody Responses Following Incident Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(6), 1911–

1919. <https://doi.org/10.1086/315498>

Carter, J. J., Koutsky, L. A., Wipf, G. C., Christensen, N. D., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N., & Galloway, D. A. (1996). The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *Journal of Infectious Diseases*, *174*(5), 927–936. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.5.927>

Castro-Jiménez, M. a, Londoño-Cuellar, P. a, & Vera-Cala, L. M. (2006). Use and determinants of Pap smear in a rural Colombian municipality 1998-1999. *Revista de Salud Publica (Bogota, Colombia)*, *8*(3), 248–257.

Chiang, C. M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T. F., Broker, T. R., & Chow, L. T. (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(13), 5799–5803. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5799>

Cogliano, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., & El Ghissassi, F. (2005). Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncology*, *6*(4), 204. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70086-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70086-3)

Combata, A. L., Bravo, M. M., Touzé, A., Orozco, O., & Coursaget, P. (2002). Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in Colombian women with invasive cervical cancer. *International Journal of*

Cancer, 97(6), 796–803. <https://doi.org/10.1002/ijc.10153>

Cuzick, J., Clavel, C., Petry, K. U., Meijer, C. J. L. M., Hoyer, H., Ratnam, S., Szarewski, A., Birembaut, P., Kulasingam, S., Sasieni, P., & Iftner, T. (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening.

International Journal of Cancer, 119(5), 1095–1101. <https://doi.org/10.1002/ijc.21955>

DiMaio, D., & Mattoon, D. (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, 20, 7866–7873. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204915>

Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., & Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352(6338), 824–827.

<https://doi.org/10.1038/352824a0>

Doorbar, John. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525–541. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>

Duensing, S., & Münger, K. (2002). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Research*, 62(23), 7075–7082.

Duraisamy, K., Jaganathan, K. S., & Chandra, J. (2011). Methods of Detecting Cervical Cancer. *Advan. Biol. Res.*, 5(4), 226–232.

- Fehrmann, F., Klumpp, D. J., & Laimins, L. A. (2003). Human Papillomavirus Type 31 E5 Protein Supports Cell Cycle Progression and Activates Late Viral Functions upon Epithelial Differentiation. *Journal of Virology*, *77*(5), 2819–2831.
<https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.2819-2831.2003>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fu, L., van Doorslaer, K., Chen, Z., Ristriani, T., Masson, M., Travé, G., & Burk, R. D. (2010). Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *PLoS ONE*, *5*(9), e12816.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012816>
- Galloway, D. A., Gewin, L. C., Myers, H., Luo, W., Grandori, C., Katzenellenbogen, R. A., & McDougall, J. K. (2005). Regulation of telomerase by human papillomaviruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *70*, 209–215.
<https://doi.org/10.1101/sqb.2005.70.041>
- GLOBOCAN. (2018). Globocan 2018 - Home. In *Globocan 2018*. <https://doi.org/NO:11>
- Huang, S. H., Waldron, J., Bratman, S. V., Su, J., Kim, J., Bayley, A., Cho, J., Giuliani, M.,

- Hope, A., Ringash, J., Hansen, A., de Almeida, J. R., Goldstein, D., Perez-Ordóñez, B., Weinreb, I., Tong, L., Xu, W., & O'Sullivan, B. (2017). Re-evaluation of Ipsilateral Radiation for T1-T2N0-N2b Tonsil Carcinoma at the Princess Margaret Hospital in the Human Papillomavirus Era, 25 Years Later. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 98(1), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.01.018>
- Jeon, S., & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1654–1658. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1654>
- Karem, K. L., Poon, A. C., Bierl, C., Nisenbaum, R., & Unger, E. (2002). Optimization of a human papillomavirus-specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(3), 577–582. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.577-582.2002>
- Kreimer, A. R., Brennan, P., Lang Kuhs, K. A., Waterboer, T., Clifford, G., Franceschi, S., Michel, A., Willhauck-Fleckenstein, M., Riboli, E., Castellsagué, X., Hildesheim, A., Fortner, R. T., Kaaks, R., Palli, D., Ljuslinder, I., Panico, S., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. C., Mesrine, S., ... Johansson, M. (2015). Human papillomavirus antibodies and future risk of anogenital cancer: A nested case-control study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Journal of Clinical Oncology*, 33(8), 877–884. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.8435>

- Kühne, C., Gardiol, D., Guarnaccia, C., Amenitsch, H., & Banks, L. (2000). Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: Conditional degradation of human discs large protein by oncogenic E6. *Oncogene*, *19*(51), 5884–5891.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203988>
- Lucumi Cuesta, D. I., & Gomez Gutierrez, L. F. (2004). [Accessibility to healthcare services in the recent cervical cytology performed in an urban area in Colombia]. *Rev.Esp.Salud Publica*, *78*(1135-5727 (Print)), 367–377.
- McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, *384*(2), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.006>
- Mishra, G. A., Pimple, S. A., & Shastri, S. S. (2011). An overview of prevention and early detection of cervical cancers. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, *32*(3), 125–132. <https://doi.org/10.4103/0971-5851.92808>
- Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., & Van Doorn, L. J. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, *32*(suppl 1), S43–S51.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.004>
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., & Huh, K. (2004). MINIREVIEW Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *JOURNAL OF VIROLOGY*, *78*(21), 11451–11460.

<https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004>

Münger, K., & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*, 89(2), 213–228. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00190-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00190-9)

Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24(Suppl 3), S3/1–S3/10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>

Muñoz, N., Méndez, F., Posso, H., Molano, M., van den Brule, A. J. C., Ronderos, M., Meijer, C., & Muñoz, Á. (2004). Incidence, Duration, and Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Colombian Women with Normal Cytological Results. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(12), 2077–2087. <https://doi.org/10.1086/425907>

Murillo, R., Luna, J., Gamboa, O., Osorio, E., Bonilla, J., & Cendales, R. (2010). Cervical cancer screening with naked-eye visual inspection in Colombia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 109(3), 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2010.01.019>

Mutombo, A. B., Benoy, I., Tozin, R., Bogers, J., Van geertruyden, J.-P., & Jacquemyn, Y. (2019). Prevalence and Distribution of Human Papillomavirus Genotypes Among Women in Kinshasa, The Democratic Republic of the Congo. *Journal of Global Oncology*, 5(5), 1–

9. <https://doi.org/10.1200/jgo.19.00110>

Nguyen, H. P., Ramírez-Fort, M. K., & Rady, P. L. (2014). *The Biology of Human Papillomaviruses* (pp. 19–32). <https://doi.org/10.1159/000355959>

Nonnenmacher, N L Hubbert, R Kirnbauer, K V Shah, N Muñoz, F X Bosch, S de Sanjosé, R Viscidi, D R Lowy, J. T. S. (1995). Serologic Response to Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Virus-Like Particles in HPV-16 DNA-positive Invasive Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade III Patients and Controls From Colombia and Spain - PubMed. *Journal of Infectious Diseases*, 172(1), 19–24. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7797910/>

Phelps, W. C., & Howley, P. M. (1987). Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *Journal of Virology*, 61(5), 1630–1638. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.5.1630-1638.1987>

Pineros, M., Cendales, R., Murillo, R., Wiesner, C., & Tovar, S. (2007). [Pap test coverage and related factors in Colombia, 2005]. *Revista de Salud Publica (Bogota, Colombia)*, 9(3), 327–341. <https://doi.org/S0124-00642007000300002> [pii]

Salazar-Piña, D. A., Pedroza-Saavedra, A., Cruz-Valdez, A., Ortiz-Panozo, E., Maldonado-Gama, M., Chihu-Amparan, L., Rodriguez-Ocampo, A. N., Orozco-Fararoni, E., Esquivel-Guadarrama, F., & Gutierrez-Xicotencatl, L. (2016). Validation of Serological Antibody

Profiles Against Human Papillomavirus Type 16 Antigens as Markers for Early Detection of Cervical Cancer. *Medicine (United States)*, 95(6).

<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002769>

Sanclemente, G., & Gill, D. K. (2002). Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. In *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (Vol. 16, Issue 3, pp. 231–240). J Eur Acad Dermatol Venereol. <https://doi.org/10.1046/j.1473-2165.2002.00419.x>

Sarian, L. O., Derchain, S. F., Naud, P., Roteli-Martins, C., Longatto-Filho, A., Tatti, S., Branca, M., Eržen, M., Serpa-Hammes, L., Matos, J., Gontijo, R. C., Bragança, J. F., Lima, T. P., Maeda, M. Y. S., Lörincz, A., Dores, G. B., Costa, S., Syrjänen, S., & Syrjänen, K. (2005). Evaluation of visual inspection with acetic acid (VIA), Lugol's iodine (VILI), cervical cytology and HPV testing as cervical screening tools in Latin America: This report refers to partial results from the LAMS (Latin AMerican Screening) study. *Journal of Medical Screening*, 12(3), 42–49. <https://doi.org/10.1258/0969141054855328>

Schiffman, M., Clifford, G., & Buonaguro, F. M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: Addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer*, 4(8). <https://doi.org/10.1186/1750-9378-4-8>

Sigurdsson, K. (2013). Is a liquid-based cytology more sensitive than a conventional pap smear? *Cytopathology*, 24(4), 254–263. <https://doi.org/10.1111/cyt.12037>

- Skiadopoulos, M. H., & McBride, A. A. (1998). Bovine Papillomavirus Type 1 Genomes and the E2 Transactivator Protein Are Closely Associated with Mitotic Chromatin. *Journal of Virology*, 72(3), 2079–2088. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.3.2079-2088.1998>
- Stanley, M. (2008). Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic Oncology*, 109((2 Suppl)), S15-21. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.02.003>
- Stanley, M. (2010). HPV - immune response to infection and vaccination. *Infectious Agents and Cancer*, 5, 19.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3161350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stanley, M. A., & Sterling, J. C. (2014). Host responses to infection with human papillomavirus. *Current Problems in Dermatology (Switzerland)*, 45, 58–74.
<https://doi.org/10.1159/000355964>
- Stubenrauch, F., & Laimins, L. A. (1999). Human papillomavirus life cycle: Active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology*, 9(6), 379–386. <https://doi.org/10.1006/scbi.1999.0141>
- Tomaić, V., Pim, D., & Banks, L. (2009). The stability of the human papillomavirus E6 oncoprotein is E6AP dependent. *Virology*, 393(1), 7–10.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.029>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global

cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108.

<https://doi.org/10.3322/caac.21262>

Urquiza, M., Guevara, T., Espejo, F., Bravo, M. M., Rivera, Z., & Patarroyo, M. E. (2005). Two L1-peptides are excellent tools for serological detection of HPV-associated cervical carcinoma lesions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1), 224–232.

Urquiza, M., Guevara, T., Rodriguez, C., Melo-Cardenas, J., Vanegas, M., & Patarroyo, M. E. (2012). Decreasing the configurational entropy and the hydrophobicity of EBV-derived peptide 11389 increased its antigenicity, immunogenicity and its ability of inducing IL-6. *Amino Acids*, 42(6), 2165–2175. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0954-7>

Urquiza, M., Guevara, T., Sanchez, R., Vanegas, M., & Patarroyo, M. E. (2008). A non-variable L1-peptide displays high sensitivity and specificity for detecting women having human papillomavirus-associated cervical lesions. *Peptides*, 29(6), 957–962.

Urquiza, M., Sánchez, R., Amaya, J., León, S., Acosta, J., Patarroyo, M. A., Camargo, M., & Patarroyo, M. E. (2008). Specificity of L1 peptides versus virus-like particles for detection of human papillomavirus-positive cervical lesions in females attending Engativa Hospital, Bogota, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), 3714–3720.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00551-08>

- Van Doornum, G. J. J., Korse, C. M., Buning-Kager, J. C. G. M., Bonfrer, J. M. G., Horenblas, S., Taal, B. G., & Dillner, J. (2003). Reactivity to human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles in sera from patients with genital cancer and patients with carcinomas at five different extragenital sites. *British Journal of Cancer*, *88*(7), 1095–1100.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600870>
- White, A. E., Livanos, E. M., & Tlsty, T. D. (1994). Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes and Development*, *8*(6), 666–677. <https://doi.org/10.1101/gad.8.6.666>
- Woo, Y. L., Van Den Hende, M., Sterling, J. C., Coleman, N., Crawford, R. A. F., Kwappenberg, K. M. C., Stanley, M. A., & Van Der Burg, S. H. (2010). A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- And E7-specific T-cell responses. *International Journal of Cancer*, *126*(1), 133–141. <https://doi.org/10.1002/ijc.24804>
- Yokomine, M., Matsueda, S., Kawano, K., Sasada, T., Fukui, A., Yamashita, T., Komatsu, N., Shichijo, S., Tasaki, K., Matsukuma, K., Itoh, K., Kamura, T., & Ushijima, K. (2017). Enhancement of humoral and cell mediated immune response to HPV16 L1-derived peptides subsequent to vaccination with prophylactic bivalent HPV L1 virus-like particle vaccine in healthy females. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *13*(4), 1500–1505.
<https://doi.org/10.3892/etm.2017.4150>

You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K., & Howley, P. M. (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*, *117*(3), 349–360. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00402-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00402-7)

Zanier, K., M'Hamed Ould Sidi, A. O., Boulade-Ladame, C., Rybin, V., Chappelle, A., Atkinson, A., Kieffer, B., & Travé, G. (2012). Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure*, *20*(4), 604–617. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.02.001>