

Presencia y persistencia de variantes moleculares del ORF E6 y ORF E7 del VPH 58 en mujeres con citología normal que pertenecen a la cohorte de Bogotá, Colombia

Presence and Persistence of HPV 58 Molecular Variations ORF E6 and ORF E7 Among Women With Normal Cytology in the Bogotá, Colombia Cohort

Óscar Buitrago¹, Nicolás Morales¹, Carolina Martín¹, Antonio Huertas¹, Pablo Moreno¹, Teresa Martínez², Mónica Molano¹, Grupo de Estudio VPH³

1. Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D. C., Colombia
2. Grupo de Investigación Epidemiológica, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D. C., Colombia
3. Grupo de Estudio VPH: Héctor Posso, Margarita Ronderos, Raúl Murillo, Joaquín Luna, Natasha Ortiz, Gilberto Martínez, Edmundo Mora, Gonzalo Pérez, José María Fuentes, Constanza Gómez, Eva Klaus, Constanza Camargo, Cecilia Tabón, Teodolinda Palacio, Carolina Suárez, Claudia Molina

Resumen

Objetivo: Analizar la presencia y persistencia de variantes en E6/E7/VPH 58 en muestras de mujeres con infecciones prevalentes por VPH 58, con citología normal, que pertenecen a la cohorte de Bogotá, Colombia. **Métodos:** Se utilizaron cepillados cervicales de 34 mujeres VPH 58, con citología normal, pertenecientes a la línea de base de la cohorte, con su respectivo seguimiento. Se amplificó la región E6/E7 del VPH 58 usando los iniciadores E6F1-E7R1 y los iniciadores E7P1-E7P2. Para el análisis de las variantes se utilizó la técnica de secuencia automática directa. La secuencia referencia del VPH 58 se utilizó para comparar las secuencias obtenidas. **Resultados:** En 27/34 muestras se lograron detectar variantes de E6/E7 de VPH 58. En total, se detectaron cinco variantes diferentes, dos de ellas nunca antes reportadas (A169/T307/A694/G744/A761 y T307/A694/G744/A761/G763). Los análisis de eliminación mostraron que el 75% de las variantes se habían eliminado antes de los dos años de seguimiento, y todas las variantes ya se habían eliminado a los seis años de seguimiento. **Conclusiones:** Dos nuevas variantes se reportaron a escala mundial de gran relevancia en los ámbitos filogenético y epidemiológico.

Palabras clave: virus del papiloma humano, estudios de seguimientos, variación estructural del genoma

Correspondencia

Mónica Molano, Instituto Nacional de Cancerología, Avenida 1° No. 9-85, Bogotá, Colombia. Teléfono (571) 334 1111 ext. 4205
Correo electrónico: mmolano@cancer.gov.co.

Fecha de recepción: 10 de octubre de 2011. Fecha de aprobación: 13 de marzo de 2012

Abstract

Objective: To analyze the presence and persistence of E6/E7 HPV58 variations in women with prevalent HPV 58 infection, with normal cytology, who belong to the Bogotá, Colombia cohort. **Methods:** Cervical cytobrush was used on 34 HPV58 women, with normal cytology, who are part of the cohort base line; respective follow was performed. The HPV58 E67/E7 region was broadened by using E6F1-E7R1 and E7P1-E7P2 indicators. Variation analysis was carried out with automatic direct sequencing. HPV58 sequence reference was used to compare the sequences that had been obtained. **Results:** In 27/34 samples, E6/E7 variations of HPV58 were successfully detected. A total of five different variations were detected, two of which had never been reported before (A169/T307/A694/G744/A761 and T307/A694/G744/A761/G763). Elimination analysis revealed that 75% of variations had been eliminated within two years of follow up, and that all variation had been eliminated at the end of six years of follow up. **Conclusions:** Two new variations of universal phylogenetic and epidemiologic noteworthiness were reported

Key words: Papilloma human virus, follow-up studies, genomic structural variants

Introducción

El cáncer de cuello uterino se ubica en el tercer lugar entre los cánceres de mayor incidencia a escala mundial. Para el 2008 se reportaron 529.000 casos nuevos y 275.000 muertes (1). En Colombia este tiene una incidencia de 26,1/100.000 y es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en la población colombiana (2). Dentro de los tipos de alto riesgo, el VPH 58 en Suramérica ocupa el segundo lugar en prevalencia (7%), después de VPH 16 (15%) en mujeres con citología normal (3). Así mismo, la información obtenida de estudios a escala mundial muestran una alta prevalencia de las infecciones por VPH 58 en lesiones de alto grado, y aunque se observa una menor prevalencia en cánceres invasivos, este virus está catalogado como uno de los ocho tipos más prevalentes en este tipo de cáncer.

En Colombia, este tipo viral es el segundo más prevalente (6,2%) e incidente (11,2%) después de las infecciones por VPH 16 en mujeres con citología normal (4-6). Adicionalmente, los resultados de la cohorte de Bogotá parecen mostrar que mujeres infectadas con VPH 16 o VPH 18 presentan un mayor riesgo de adquirir una subsiguiente infección con el VPH 58 que con otros tipos virales (7), por lo cual es necesario seguir profundizando en los aspectos moleculares de este virus para averiguar de qué manera pueden estar influyendo en la infección y en su asociación con la progresión o regresión de lesiones cervicales.

El estudio de variantes moleculares de algunos tipos de VPH ha demostrado que algunas de estas difieren en sus propiedades biológicas y patogénicas, y, por lo tanto, podrían representar un riesgo para el desarrollo del cáncer (8,9). Así mismo, el estudio de variantes en los marcos de lectura abierto u *open reading frames* (ORF) que codifican para las proteínas E6 y E7 revisten una importancia significativa, ya que estas proteínas se consideran cruciales en las propiedades oncogénicas del VPH (10). En Suramérica solo existen estudios de variantes moleculares de VPH 58 en Brasil, los cuales se han realizado sobre el ORF E6 y L1 de VPH 58 (11). A escala mundial hay pocos estudios sobre variantes moleculares de VPH 58, entre los cuales la mayoría se ha desarrollado en poblaciones asiáticas sobre los ORF de E6, E7 y L1; en ellos, algunas de las variantes han sido asociadas con un mayor riesgo para el desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical y cáncer (12-14).

En nuestro país no se han desarrollado estudios sobre variantes de VPH 58, y si tenemos en cuenta que este es el segundo tipo de mayor prevalencia e incidencia en el país y en el ámbito suramericano (3,4), es importante desarrollar estudios encaminados a la tipificación de las variantes moleculares presentes en la población colombiana. Por tanto, el estudio de las variantes de VPH 58 en mujeres con citología normal y su seguimiento constituye un estudio pionero en los ámbitos nacional y mundial. En este estudio se presentan resultados del

análisis de la presencia de variantes en E6 y E7 del VPH 58 en mujeres con infecciones prevalentes por VPH 58 con citología normal que pertenecen a la cohorte de Bogotá, Colombia, y se realiza un análisis de eliminación de las variantes durante el seguimiento, al analizar si existe diferencia en la probabilidad acumulada de aclaramiento entre estas variantes moleculares.

Métodos

A finales de 1993, el Instituto Nacional de Cancerología comenzó un estudio de seguimiento sobre la historia natural del virus del papiloma humano, su papel y el de otros cofactores en el desarrollo de cáncer de cuello uterino. A este estudio entraron 2.200 mujeres de la población general, en las que se analizó la presencia y persistencia del virus del papiloma humano, su asociación con diferentes factores de riesgo y con el desarrollo de lesiones cervicales durante un seguimiento de nueve años. Se obtuvo un consentimiento informado de todas las participantes en el estudio, y los comités éticos del Instituto Nacional de Cancerología y la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) en Lyon aprobaron el desarrollo del estudio inicial y del actual. La forma como se realizó el reclutamiento y la colección de los datos es descrito por Molano y colaboradores (4). Los análisis que se van a ejecutar en el desarrollo de este proyecto se basan en una muestra por conveniencia de 34 mujeres que pertenecen a la línea de base del estudio de la cohorte de Bogotá, con infecciones prevalentes por VPH 58 con citología normal, con su respectivo seguimiento.

Las muestras objeto del estudio son cepillados cervicales de mujeres con infecciones prevalentes por VPH 58 con su respectivo seguimiento, que pertenecen al estudio de cohorte "Historia natural de la infección por el virus del papiloma humano, su papel y el papel de otros cofactores en el desarrollo de cáncer de cérvix", quienes firmaron un consentimiento informado previo. Estas muestras se encuentran almacenadas en el banco de muestras existente en el Instituto Nacional de Cancerología, a -70 °C. La detección y tipificación del VPH presente en las muestras se realizó mediante PCR, utilizando los iniciadores Gp5+/6+,

seguido de hibridación Southern-blot y de ensayos inmunoenzimáticos o *enzyme immune assay* (EIA) y *reverse line blot* (4).

Procesamiento de la muestra

Las muestras se encuentran almacenadas a -70 °C en Buffer Tris HCl 10mM pH 8.3, de estas se tomó una alícuota de 100 µl, la cual se llevó a 95 °C por 10 minutos, se centrifugó por 1 minuto a 3.000 rpm y se puso en hielo, para posteriormente ser almacenada a -20 °C. Para el análisis de la región E6 y E7 del VPH 58 por PCR se tomó 10 µl del sobrenadante.

Amplificación por PCR del ORF E6 y ORF E7 del VPH 58

Para la identificación de las variantes moleculares del ORF E6 y ORF E7 del VPH 58 se realizó una amplificación del ORF E6 y ORF E7, mediante la técnica de PCR. Para el desarrollo de la PCR se utilizaron iniciadores que flanquean la región de ADN viral, comprendida entre nucleótidos 79 al 600 del ORF E6 de VPH 58, utilizando el iniciador sentido E6F1 (5'- CTG TGC AGT GTG TTG GAG A -3'), ubicado entre el nucleótido 79 al 99 y el nucleótido antisentido E7R1 (5'- TCTTAGCG-TTGGGTTGTT -3') ubicado entre los nucleótidos 583 al 600. También, se utilizaron dos iniciadores adicionales que se ubican aproximadamente en la mitad del ORF E6, el iniciador sentido E6F5 (5'- AAA GTG TGC TTA CGA TTG C -3'), ubicado entre el nucleótido 299 al 317, y el iniciador antisentido E6R4 (5'- AAT GTG TCT CCA TAT AGC G -3), ubicado entre el nucleótido 354 a 372. De igual forma, la totalidad del ORF E7 se abarcó desde el nucleótido 595 al 896, se utilizó el iniciador previamente reportado E7P1 (5'- CTG-TAACAACGCCATGAGAG -3'), ubicado entre el nucleótido 561 al 580, y el iniciador antisentido E7P2 (5'- TCAGGGTCATCCATTGCAGA -3'), ubicado entre el nucleótido 877 al 896. Así mismo, se utilizaron un par de iniciadores en la mitad de la secuencia del ORF E7, el iniciador sentido E7F10 (5'- AAA TAG GCT TGG ACG GG -3'), ubicado entre el nucleótido 680 al 696, y el iniciador antisentido E7R10 (5'- GAT ACA CAA ACG AAC CGT -3'), ubicado entre el nucleótido 766 al 783.

Estos iniciadores se seleccionaron de reportes previos y otros fueron diseñados en el laboratorio mediante el *software* Gene Runner 3.05. Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ L que contenía Tris HCl 10 mM, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada primer (IDT, EE. UU.), 1,25 U de Taq polimerasa (Amplitaq; Cetus, Perkin Elmer, EE. UU.), 10 μ L de muestra o control, y el volumen final se ajustó con agua. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MJ Research PTC 200, EE. UU., y las condiciones óptimas de amplificación fueron: un paso de denaturación por 4 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de amplificación; cada ciclo consistió de un minuto a 94 °C, 1:00 minuto a 50 °C y 1,30 minutos a 72 °C. El paso final de elongación se extendió por otros diez minutos. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1,5% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Se utilizaron los amplímeros inicialmente obtenidos de las diferentes PCR dirigidas hacia la región E6 y E7 del VPH 58, los cuales fueron purificados mediante el *kit* comercial GFX™ PCR (Amersham Biosciences). Se realizó secuenciación directa del ORF E6 y ORF E7, en un secuenciador personal Amersham Pharmacia Biothec (Seq 4 x 4), con el *kit* de secuencia 7-Deaza-dGTP marca Visible Genetics. Cada mezcla de secuencia contenía: 2,5 μ L de *buffer* de secuencia (Tris HCl 260 mM a pH 8,3, MgCl₂ 39 mM), 2,5 μ L de un iniciador marcado en 5' con Cy 5,5, a una concentración de 3 μ M, 2 μ L de DMSO (dimetil sulfoxido), 4 μ L de ADN purificado del producto amplificado, 4 μ L de enzima Thermosequenase TM diluida 1:10 en *buffer* Thermosequenase TM, 7 μ L de H₂O destilada y 1,5 μ L del ddNTP correspondiente (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, cada uno de estos contiene 750 μ M de cada dATP, dCTP, dTTP, 562.5 μ M de dGTP, 185.5 μ M de 7-deaza-dGTP, y 2,5 μ M del correspondiente ddNTP diluido en EDTA 0,1 mM, a pH 8,0).

Para cada reacción de secuencia se realizaron dos fases de ciclado, uno de 18 ciclos y uno de 15 ciclos en un termociclador PTC 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). La fase iniciadora de ciclado incluyó una denaturación a 94 °C durante 15 segun-

dos, una hibridación a 50 °C durante 15 segundos y una extensión de 70 °C durante 60 segundos. La segunda fase de ciclado incluyó una denaturación de 94 °C durante 15 segundos y una extensión de 70 °C durante 60 segundos. La fase iniciadora de ciclado fue precedida por una denaturación a 94 °C durante dos minutos, y la segunda fase de ciclado fue seguida por una extensión de 72 °C durante 2 minutos.

Una vez terminadas las fases de ciclado se adicionó a cada reacción 6 μ L de formamida y se realizó una denaturación a 94 °C; posteriormente, se pusieron en hielo y se almacenaron a -20 °C, hasta que se realizó el corrido de la muestra a 1.500 W y 50 °C en geles de poliacrilamida al 6% (precorridos) (Visible Genetics), utilizando un secuenciador personal 4 x 4 Amersham Pharmacia Biotech.

Las secuencias obtenidas con el programa Seq 4 X 4 2.0 se confirmaron mediante BLAST, con el Genbank. Las variaciones encontradas tanto de nucleótidos como de aminoácidos se ubicaron y numeraron según la secuencia del genoma de referencia para el virus del papiloma humano 58 o VPH-58R (15).

Análisis de la carga viral

El método de ensayo inmunoenzimático o *enzyme immune assay* (EIA) puede ser utilizado como un método semicuantitativo para determinar la cantidad relativa de copias virales de ADN de VPH en los raspados cervicales; la razón de esto es que existe una relación de tipo lineal entre la cantidad de ADN viral y la densidad obtenida en la realización específica de la EIA. La realización de este análisis ha sido descrito previamente (16).

La carga viral se categorizó en tres categorías: baja, media y alta. Las muestras con carga viral baja fueron aquellas que presentaron densidades ópticas por encima del punto de corte hasta un valor de 0,59; muestras con carga viral media fueron aquellas que tuvieron densidades ópticas entre 0,6 y 1,5, y muestras con cargas virales altas fueron aquellas que presentaron valores por encima de 1,5.

Tabla 1. Variantes de los ORF E6 y E7 de VPH 58 de la línea de base obtenidas por el método de secuencia automática

MUESTRAS	E6								E7								CAMBIO DE A.A.	VARIANTE	REFERENCIA												
	n=27	%	HPV 58R	G	C	G	A	C	G	A	T	A	G	C	T	G				T	T	G	G	A	A	C	C	T	C	T	G
21	77,8%	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G41R/G63D	T307 / A694 / G744 / A761	Chan et al. 2002
3	11%	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T20I/G63S	T307 / T632 / G744 / A760	Chan et al. 2002, Wu et al. 2009
1	3,7%	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T307 / G744	T307 / G744	Chan et al. 2002
1	3,7%	a	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R9K / G41R / G63D	A169 / T307 / A599 / A694 / G744 / A761	No Reportada
1	3,7%	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G41R/G63D / T64A	T307 / A694 / G744 / A761 / G763	No Reportada

Nota: Las variantes moleculares de los ORF E6/E7 de VPH 58 fueron encontradas mediante la técnica de secuencia en la línea de base; se incluyen las diferentes posiciones donde se han reportado cambios de nucleótidos de estos ORF. HPV 58R: secuencia referencia, las letras en minúscula nos indican cambio de nucleótido que no llevan a cambio de aminoácido, las letras en mayúscula son cambios de nucleótidos que llevan a cambio de aminoácidos. En los cambios de aminoácidos, la primera letra indican el aminoácido de VPH 58R, la segunda letra indica el aminoácido del cambio, en referencia incluyen los reportes donde se han reportado las secuencias encontradas, N/A (no amplifica).

Análisis estadístico

Para este estudio se realizó un análisis de presencia de variantes de E6 y E7 de VPH 58, y su asociación con carga viral en mujeres con citología normal pertenecientes a la línea de base de la cohorte de Bogotá. Así mismo, se realizó un análisis de la eliminación de la infección por VPH 58 y sus variantes, y su asociación con carga viral durante los años de seguimiento. La persistencia de una infección o variante se midió desde la fecha de la infección en la primera visita hasta su eliminación, asumiendo que este evento ocurrió en el punto medio entre la última visita positiva y la siguiente visita negativa. El tiempo de eliminación de la infección por VPH 58 y las variantes se modeló usando el método de Kaplan-Meier, el cual estima la probabilidad de eliminación de la infección por VPH 58 como una función de tiempo desde el enrolamiento. Se utilizó el programa estadístico SPSS 17.

Resultados

De las 34 mujeres con infecciones prevalentes pertenecientes a la línea de base se logró obtener información completa de variantes para la región E6 y E7 en 27 mujeres (79,5%). Todas las muestras presentaron infección únicamente con una variante, ninguna presentó infección múltiple ni tampoco se observó en ninguna la secuencia referencia del E6/E7 VPH 58. Un total de cinco variantes diferentes se observaron en las muestras pertenecientes a la

línea de base; la variante de VPH 58 que presentó la mayor frecuencia fue la T307/A694/G744/A761, con una frecuencia de 77,8% (21 de 27), seguida por la variante T307/T632/G744/A760, con una frecuencia de 11,1% (3 de 27), y las variantes T307/G744, A169/T307/A694/G744/A761 y T307/A694/G744/A761/G763, con una frecuencia de 3,7% (1 de 27) cada una de ellas. En la tabla 1 se presenta la información de las diferentes variantes detectadas.

Análisis de eliminación de las variantes de E6/E7 VPH 58 en mujeres pertenecientes a la cohorte de Bogotá

Durante el seguimiento de las 34 mujeres positivas se obtuvo un total de 176 exfoliaciones cervicales, incluidas las pertenecientes a la línea de base. Estas muestras fueron sometidas a la prueba de tipificación de VPH, y se determinó que 54 muestras, que corresponden al 30,68% (54 de 176), fueron positivas para VPH 58; de estas se pudo obtener información sobre variantes de ambos ORF en 45 de las 54 (83,3%) muestras, en las restantes 9 (16,6%) no se pudieron determinar las variantes presentes, debido a la no amplificación de alguno o ambos ORF, por lo que se consideraron no informativas.

Los análisis de eliminación de la infección de las variantes E6/E7 VPH 58 en las mujeres con infecciones prevalentes se observan modelados en la gráfica de Kaplan Meier de la figura 1. Una mujer

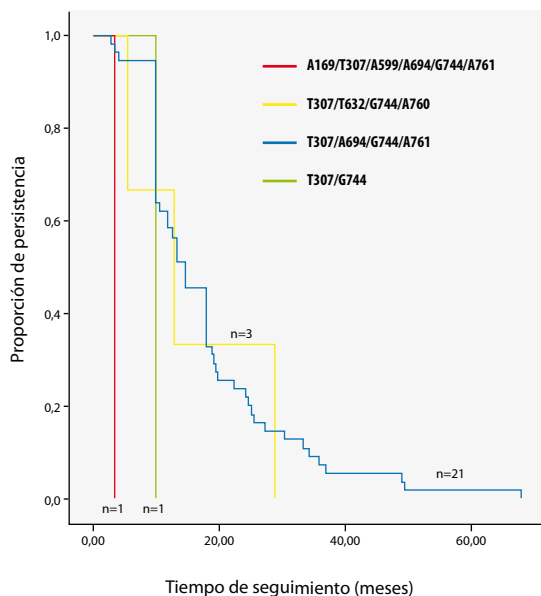


Figura 1. Persistencia de las variantes moleculares de E6/E7 VPH 58 de mujeres infectadas por VPH 58 pertenecientes a la cohorte de Bogotá

que en la línea de base se le había detectado la variante T307/A694/G744/A761/G763 no tuvo visitas de seguimiento. De las 26 mujeres que tuvieron visitas de seguimiento, se observó un número promedio de visitas de 6,5, con un rango de entre 2-12 visitas. La variante T307/A694/G744/A761 obtuvo una media de eliminación de 17,59 meses; la variante T307/G744, de 16 meses; la variante T307/T632/G744/A760, de 15,78, y la variante A169/T307/A599/A694/G744/A761, de 3,46 meses. Globalmente, se observa en la gráfica que más del 75% de las variantes se habían eliminado antes de los dos años de seguimiento, y a los seis años de seguimiento todas las variantes ya habían sido eliminadas. Al realizar el test de Log Rank no se observó una diferencia significativa entre los grupos ($p = 7,25$).

El análisis de la carga viral de 54 muestras positivas para VPH 58 que se recolectaron de las mujeres con infecciones prevalentes (mujeres de línea base y seguimiento) mostró que el 20,37% (11 de 54) presentan carga viral baja, el 25,92% (14 de 54 muestras) presentan carga viral media y el 53,70% (29 de 54 muestras) presentan carga viral alta. En las nueve muestras en las que no se obtuvo información de la variante, debido a que no se pudo amplificar los ORF E6/E7, el 33,3% (3 de 9) presentó carga viral baja, el 11,11% (1 de 9) presentó carga viral media y el 55,55% (5 de 9) presentó carga viral alta. La tabla 2 muestra la relación entre las variantes detectadas y la carga viral en las 45 muestras, con información de variantes.

Discusión

Aunque en los últimos años se han comenzado a realizar estudios para identificar variantes del VPH 58 y algunas de ellas han mostrado asociación con un aumento en el riesgo para cáncer cervical, todavía la información acerca de su papel en los ámbitos biológico, inmunológico y epidemiológico es muy poco. Este es el primer reporte que se realiza a escala mundial en el que se hace un análisis sobre la presencia y persistencia de variantes de E6 y E7 de VPH 58 en mujeres con citología normal en un estudio de seguimiento.

En este trabajo se observó que un grupo de muestras VPH 58 positivas no presentaron amplificación para la región E6 y E7, y, por tanto, no se pudo determinar la variante infectante. Dentro de las razones que pudieron influir en este resultado encontramos el hecho de que la técnica de tipificación del VPH (PCR-EIA y RLB) utiliza un amplímero del ORF L1 de un tamaño de 145 pb, mientras que los fragmentos amplificados en las PCR en el trabajo

Tabla 2. Variantes en E6/E7 de VPH 58 y carga viral en las mujeres con infecciones prevalentes y su seguimiento

Variante	Carga Viral		
	Baja (%)	Media (%)	Alta (%)
T307/A694/G744/A761	8 (100)	11 (84,61)	20 (83,13)
T307/T632/G744/A760		1 (7,69)	2 (8,33)
T307/G744			1 (4,16)
A169/T307/A599/A694/G744/A761			1 (4,16)
T307/A694/G744/A761/G763		1 (7,69)	
Total	8 (100)	13 (100)	24 (100)

fueron de 521 pb para el ORF E6 y de 335 pb para el ORF E7, por lo cual la eficiencia de la PCR pudo ser mucho menor (17). Otra posible explicación se debe a que las muestras utilizadas pueden tener procesos de degradación o fragmentación del ADN viral como una consecuencia de la manipulación y los periodos de congelamiento y descongelamiento, debido a que previamente habían sido utilizadas para la determinación del VPH, PCR para β -globina y ensayos para la determinación de la carga viral.

Además, de acuerdo con los ensayos realizados para la determinación de la carga viral, se pudo observar que en algunas de las muestras en las que no se pudo realizar la amplificación presentan una carga viral baja, lo que concuerda con la observación del trabajo de Wu En-qi de 2009, el cual sugiere que en algunos casos la baja carga viral dificulta la detección de algunos fragmentos de su genoma (18). Finalmente, es posible que algunos fragmentos del ADN viral presenten integración o exista disrupción y pérdida de fragmentos del genoma viral (18).

Para el virus del papiloma humano tipo 58, los estudios sobre variantes son pocos y se centran principalmente en poblaciones asiáticas, donde se ha reportado una alta frecuencia de infecciones por este tipo viral. Actualmente, existen muy pocos estudios publicados en los que se analicen variantes de los ORF E6 y E7 del VPH 58, y fueron realizados en poblaciones asiáticas. En términos generales, incluyen análisis de mujeres con algún grado de lesión o cáncer de cuello uterino; sin embargo, únicamente los trabajos de Chan en 2002, Wu En-qi en 2009 y Chang en 2011 reportan variantes para ambos ORF (13,18,19). En otros estudios, como el de Xin y colaboradores en 2001 y Calleja-Macias y colaboradores en 2005, se reportan variantes únicamente para el ORF E6.

En Latinoamérica, solamente existen dos reportes en muestras de Brasil, uno de los cuales analizó el ORF L1 en una muestra proveniente de una neoplasia (11) y en el otro se analizó la región LCR, L1 y E6 en ocho muestras, en el que se observó para E6 una muy baja variabilidad, y solo se determinó una variación en la posición 307 (C a T) (20). Tomando en cuenta que este tipo

viral es considerado de alto riesgo para la progresión a cáncer de cuello uterino, la poca información existente a escala mundial y la ausencia de estudios para Suramérica, donde este tipo viral ocupa una alta frecuencia en mujeres positivas para VPH, los resultados presentados en este trabajo confieren un gran valor para el conocimiento de las variantes moleculares. Todo ello, debido a su importancia como posibles agentes relacionados con la expresión de las oncoproteínas E6 y E7.

Al analizar la frecuencia de las variantes observadas en las mujeres con infecciones prevalentes, se pudo determinar que la variante T307/A694/G744/A761 fue la de mayor frecuencia en el 77,8% de las muestras, la cual se correlaciona con el estudio de Chan y colaboradores en 2002, donde esta misma variante presenta la mayor frecuencia. La variante T307/T632/G744/A760 se encuentra como la segunda variante más frecuente, y de acuerdo con Chan y colaboradores y Wu y colaboradores, puede ser asociada con el riesgo de progresión hacia cáncer de cuello uterino, por lo cual reviste gran importancia su detección dentro de la población (13,18).

Aunque este trabajo se realizó en mujeres con citología normal, se resalta la presencia de esta variante, ya que puede llegar a ser un factor de riesgo en nuestra población, por lo cual se necesita analizar su frecuencia en lesiones cervicales de alto grado y cáncer en esta población. Al comparar las frecuencias obtenidas en las mujeres con infecciones prevalentes con los resultados obtenidos en el trabajo de Chan y colaboradores, las dos variantes de mayor frecuencia en infecciones prevalentes corresponde también a las de mayor frecuencia reportadas por el estudio; así, podemos establecer que el comportamiento que presentan las variantes de los ORF E6/E7 VPH 58 en la población china (provincia de Cantón) y colombiana (Bogotá) responden a un patrón muy similar. Es importante señalar que en ninguna de las muestras analizadas se obtuvo la secuencia del VPH 58 que se utiliza como referencia (GenBank D90400), lo que se correlaciona con la baja frecuencia del VPH 58 referencia, encontrada en estudios desarrollados en algunas poblaciones asiáticas (12-14,18) y, en general, a escala mundial (21).

Es importante resaltar que, de acuerdo con los trabajos existentes a escala mundial sobre variantes del VPH 58 en los marcos abiertos de lectura de E6/E7, las variantes T307/A694/G744/A761/G763 y A169/T307/A599/A694/G744/A761 no han sido reportadas con anterioridad, lo cual da gran relevancia al trabajo, pues se establece la presencia de dos nuevas variantes en el ámbito mundial para estas regiones del VPH 58; adicionalmente, el cambio de nucleótido A763G genera cambio en la secuencia de aminoácidos T64A de E7.

Algunos autores consideran que la presencia del mismo tipo viral a lo largo del tiempo no significa un fenómeno de persistencia de la infección, sino que se puede tratar de una nueva infección con el mismo tipo viral (22), por lo cual la determinación de la variante constituye la única manera de realizar la evaluación de persistencia. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron corroborar que todas las infecciones con el VPH 58 persistentes realmente lo eran al poseer la misma variante molecular a lo largo de la infección, y no se observaron diferencias en el tiempo de eliminación de las variantes. Adicionalmente, se observó que más del 75% de las variantes se eliminan antes de los dos años de seguimiento, información de gran importancia en el conocimiento de la historia natural de las infecciones por VPH 58.

Así mismo, en el estudio no se observó ningún caso de coinfección con variantes del VPH 58, lo cual se correlaciona con los trabajos de las poblaciones asiáticas y en los trabajos sobre variantes del VPH 16 en los que se reporta una baja frecuencia en las coinfecciones con variantes de VPH 16, lo que permite sugerir que las coinfecciones entre variantes en el ámbito mundial es muy baja (9,23,24).

En cuanto al análisis de carga viral, la mayoría de las muestras mostraron una carga viral alta, y al realizar la comparación entre la carga viral con una variante específica no se observan asociaciones significativas. En conclusión, cinco diferentes variantes de E6/E7/VPH 58 fueron identificadas en este estudio, dentro de las cuales se tiene la descripción de dos nuevas variantes. Esta información es de gran relevancia para análisis filogenéticos, epidemiológicos y biológicos. El análisis de persistencia muestra

que todas las variantes se eliminan antes de los seis años de seguimiento y no se observa una clara asociación entre la presencia de algunas variantes y la persistencia de la infección.

Dentro de las limitaciones de este estudio se tienen el bajo número de muestras analizadas y que los análisis se realizaron con infecciones prevalentes, por lo que no es posible conocer el tiempo exacto de persistencia de una infección, información que con el análisis de casos incidentes sería mucho más pura. Sin embargo, el presente estudio tiene la ventaja de tener un largo tiempo de seguimiento, en el que se perdieron muy pocos casos; además, es el único que hasta el momento ha analizado variantes de E6 y E7 del VPH 58 en un estudio de seguimiento.

Agradecimientos

Agradecimientos especiales a las participantes del estudio, ginecólogos, enfermeras y trabajadores sociales que colaboraron en el trabajo de campo. Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia, CDP 1200800208 del 2008.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia CDP 1200800208 del 2008.

Referencias

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-917.
2. Pardo C, Cendales R. Incidencia estimada y mortalidad por cáncer en Colombia 2002-2006. Bogotá: Instituto Nacional de Cancerología; 2010.
3. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005;366:991-8.
4. Molano M, Posso H, Weiderpass E, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*. 2002;87:324-33.

5. Molano M, Van den Brule AJ, Plummer M, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003;158:486-94.
6. Munoz N, Méndez F, Posso H, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis.* 2004;190:2077-87.
7. Méndez F, Muñoz N, Posso H, et al. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis.* 2005;192:1158-65.
8. Almonte M, Albero G, Molano M, et al. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine.* 2008;26:L16-36.
9. Villa L, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2000;81:2959-68.
10. zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology.* 1991;184:9-13.
11. Veras VS, Cerqueira DM, Martins CR. L1 sequence of a new human papillomavirus type-58 variant associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:1-4.
12. Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, et al. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2005;79:13630-40.
13. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, et al. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1249-53.
14. Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, et al. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett.* 2001;170:19-24.
15. Kirii Y, Iwamoto S, Matsukura T. Human papillomavirus type 58 ADN sequence. *Virology.* 1991;185:424-7.
16. Jacobs MV, van den Brule AJ, Snijders PJ, et al. A non-radioactive PCR enzyme-immunoassay enables a rapid identification of HPV 16 and 18 in cervical scrapes after GP5+/6+ PCR. *J Med Virol.* 1996;49:223-9.
17. van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, et al. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2739-43.
18. Wu EQ, Zha X, Yu XH, et al. Profile of physical status and gene variation of human papillomavirus 58 genome in cervical cancer. *J Gen Virol.* 2009;90:1229-37.
19. Chang YJ, Chen HC, Lee BH, et al. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. *Int J Cancer.* 2011;129:965-73.
20. Raiol T, Wyant PS, de Amorim RM, et al. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. *J Med Virol.* 2009;81:685-92.
21. Chan PK, Luk AC, Park JS, et al. Identification of human papillomavirus type 58 lineages and the distribution worldwide. *Infect Dis.* 2011;203:1565-73.
22. Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 ADN in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3388-93.
23. Schlecht NF, Burk RD, Palefsky JM, et al. Variants of human papillomaviruses 16 and 18 and their natural history in human immunodeficiency virus-positive women. *J Gen Virol.* 2005;86:2709-20.
24. Da Costa MM, Hogeboom CJ, Holly EA, et al. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J Infect Dis.* 2002;185:1229-37.