

Detección e integración del virus del papiloma humano de alto riesgo en lesiones pre-neoplásicas en mujeres del sur de Chile: un estudio transversal

High-risk human papillomavirus detection and integration in preneoplastic lesions among women in Southern Chile: a cross-sectional study

Carmen Illi¹, Jaime López¹, María Elena Reyes², Tamara Viscarra¹, Kurt Buchegger³, Louise Zanella^{4,5}, Francisco Aguayo⁶ y Priscilla Brevi¹

¹Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy, Laboratory of Integrative Biology (LIBi), Scientific and Technological Bioresource Nucleus-Center for Excellence in Translational Medicine (BI-OREN-CENT), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

²Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Chile, Temuco, Chile.

³Laboratory of Tumor Biology and Regenerative Medicine, Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy (IMII), Center for Studies in Biomedical and Morphofunctional Sciences (CEBIM), Department of Basic Sciences, School of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁴Doctorado en Ciencias Médicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

⁵Núcleo Milenio de Sociomedicina, Santiago, Chile.

⁶Departamento de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

Resumen

Introducción: El virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) es responsable del cáncer de cuello uterino y sus lesiones pre-neoplásicas. Los genotipos VPH16 y VPH18 son los más frecuentes en este cáncer. La integración del VPH-AR en el genoma de la célula hospedera es crucial en la carcinogénesis cervical, pero la etapa en que ocurre en la población chilena es incierta. **Objetivo:** Evaluar la integración de VPH16 y VPH18 en lesiones pre-neoplásicas de cuello uterino. **Métodos:** Se analizaron 108 muestras de raspados cervicales. El VPH se genotipificó mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC) e hibridación no radiactiva. La integración de VPH16 y VPH18 se determinó por presencia del gen E2 mediante RPC. **Resultados:** VPH16 y VPH18 se detectaron en 36,1% y 12,0% de las muestras, respectivamente. El VPH16 se integró en 23,1% de los casos de VPH16, mientras que VPH18 se integró en 100% de las muestras positivas para este genotipo. **Conclusiones:** La integración VPH-AR es un evento temprano en la carcinogénesis cervical que ocurre en casi la mitad de las lesiones pre-neoplásicas y es más frecuente en VPH18 que en VPH16. La evaluación de la integración VPH-AR puede ser una herramienta útil para detectar el virus en la población chilena.

Palabras clave: virus papiloma humano; lesiones cervicales; integración VPH.

Abstract

Background: High-risk Human Papillomaviruses (HR-HPVs) are the etiological agents of cervical cancer and its preneoplastic lesions. HPV16 and 18 are the most frequent HR-HPV genotypes detected in cervical cancer. HR-HPV genome integration into the host cell is an important event in the carcinogenic process. However, it remains uncertain which stage of cervical carcinogenesis HPV16 and 18 integration occurs in the Chilean population. **Aim:** The goal of this study was to evaluate HPV16 and HPV18 integration in preneoplastic lesions of the cervix. **Methods:** DNA was extracted from 108 cervical scrape samples with preneoplastic lesions. HPV was genotyped using PCR and non-radioactive hybridization. The integration status of HPV16 and HPV18 was determined by evaluating the E2 gene presence through PCR. **Results:** HPV16 and HPV18 tested positive in 36.1% and 12.0% of samples, respectively. HPV16 was found integrated in 23.1% of HPV 16 cases, while HPV 18 in 100% of samples positive for this viral genotype. **Conclusions:** HR-HPV integration is an early event in cervical carcinogenesis, occurring in nearly half of preneoplastic lesions and being more frequent in HPV18 than in HPV16. The evaluation of HR-HPV integration can be utilized as a complementary tool for detecting HPV in the Chilean population.

Keywords: human papillomavirus; cervical lesions; HPV integration.

Correspondencia a:

Priscilla Brevi
brebimieville@gmail.com

Introducción

El cáncer de cuello uterino (CC) es el cuarto cáncer más frecuentemente diagnosticado y la cuarta causa de muerte por cáncer entre las mujeres, con más de 600.000 nuevos casos y 342.000 muertes en todo el mundo durante el año 2020¹. La mayoría de los casos se producen en países con desarrollo en transición, lo que constituye un importante problema de salud pública¹. El virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo en la patogénesis del CC, detectándose en 99,7% de los casos². Este virus, se puede encontrar, tanto en mujeres como hombres, y también ha sido asociado a otros tipos de cáncer como de vulva³, oral, anal y cáncer de pene⁴. Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*; las partículas virales contienen una cápside icosaédrica, sin envoltura, de 72 capsómeros y un ADN circular de doble hebra con tamaño de unos 8 kb⁵. El genoma del VPH está organizado en tres regiones: E (temprana), L (tardía) y LCR (sigla en inglés para región de control larga)⁶. Se han descrito más de 200 genotipos del VPH⁷, que pueden infectar las células epiteliales basales de la piel u otros tejidos mucosos⁸. El VPH se clasifica en VPH de bajo riesgo (VPH-BR), que causa verrugas genitales, y VPH de alto riesgo (VPH-AR), en función de su capacidad oncogénica⁶. De hecho, los tipos de VPH-AR se han asociado a una mayor probabilidad de desarrollar CC. Hasta la fecha, los genotipos VPH16 y VPH18 son los más frecuentemente encontrados en CC en todo el mundo⁹.

Las proteínas E6 y E7 del VPH-AR son responsables de inmortalizar las células infectadas y promover el proceso carcinogénico¹⁰. La proteína E6 impide la apoptosis celular induciendo la degradación de p53⁶. La proteína E7 se une al retinoblastoma y libera el factor de transcripción E2F-1 promoviendo la proliferación celular⁶. Las proteínas E1 y E2 son responsables de la replicación del ADN viral. Además, el ORF E2 codifica un represor transcripcional de la expresión E6/E7⁵. El potencial oncogénico de los VPH-AR, como VPH16 y 18, reside en la integración de su ADN en el genoma de la célula hospedera rompiendo su estatus episomal, normalmente en la región E2^{5,6,10}. Cuando el ORF E2 se fragmenta o elimina, se pierde el control sobre el promotor temprano del VPH, lo que conduce a la sobreexpresión del transcrito E6/E7, promoviendo a su vez la carcinogénesis cervical^{5,6,10}. Asimismo, la integración del VPH-AR causa inestabilidad del genoma y expresión génica anormal en las células epiteliales¹¹. Además, la infección por VPH-AR altera el epitelio escamoso cervical normal, con displasia o lesiones pre-neoplásicas en el epitelio cervical^{6,10}. Las lesiones escamosas cervicales suelen clasificarse como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), tipos 1, 2 y 3, y carcinoma *in situ* (CIS). Estas lesiones son precursoras del carcinoma escamoso invasor de cuello uterino^{6,10}. Se-

gún el Sistema Bethesda para la notificación de la citología cervical, las lesiones cervicales se clasifican en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG), que incluyen células con signos de infección por VPH y NIC I, y en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG), que incluyen NIC2, NIC3 y CIS¹².

Debido al papel del VPH-AR en la carcinogénesis cervical, sobre todo en mujeres que presentan lesiones intraepiteliales, la detección y el genotipado del VPH se han vuelto esenciales para tomar medidas profilácticas contra el CC¹³. Sin embargo, aunque la mayoría de las mujeres sexualmente activas han estado infectadas por el VPH-AR en algún momento de su vida, sólo un pequeño porcentaje desarrollará un cáncer invasor¹³. Por lo tanto, la detección de la integración del genoma del VPH-AR en el genoma del hospedero es un biomarcador potencial importante para predecir una posible progresión a CC. Es importante señalar, que muchas veces las enfermedades asociadas al VPH son asintomáticas¹⁴, tanto en hombres como en mujeres, por lo que se hace relevante una búsqueda y pesquisa temprana, siendo relevante la generación de estrategias de diagnóstico para identificar y genotipar el VPH, de manera de mejorar su eficacia, con la detección temprana de lesiones precancerosas, guiando su terapia y evitando el avance hacia el cáncer¹⁵.

En esta investigación, analizamos la asociación entre la frecuencia de integración, tanto del VPH16 como del VPH18 y las características clínico-patológicas de pacientes con lesiones cervicales pre-neoplásicas de pacientes chilenas.

Material y Métodos

Reclutamiento de pacientes y recolección de muestras

Estudio de tipo transversal. Se invitó a participar a todas las mujeres atendidas en el Policlínico de Patología Cervical del Hospital Dr. Hernán Henríquez Aravena de Temuco (HDHHA-T)-Chile, quienes firmaron consentimiento informado, previamente aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de La Frontera (Acta N° 017/2014). Se recolectaron 108 muestras de raspados cervicales (*cytobrush*) que fueron evaluados para infección por VPH. La mediana de edad de enrolamiento fue de 32 años. La edad de las participantes se dividió en dos grupos: ≤ 30 y > 30 años. Las lesiones preneoplásicas se separaron en grupos según los diagnósticos histológicos (The 1991 Bethesda System) como¹²: 60 LIEBG y 48 LIEAG. Estas muestras fueron recolectadas entre mayo y octubre de 2013, en el HDHHA-T, durante un examen ginecológico. Los diagnósticos de lesiones preneoplásicas fueron confirmados mediante biopsia guiada por colposcopia en la Unidad de Anatomía Patológica y Citología del HDHHA-T. El *cytobrush* se depositó en un

tubo con tampón Tris-EDTA pH 7,4 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) para su transporte y posterior análisis. Los análisis moleculares se realizaron en el Laboratorio de Biología Integrativa de la Universidad de La Frontera.

Extracción de ADN, detección del VPH y genotipado

La extracción de ADN se realizó con el *kit* E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se evaluó mediante un control de integridad, basado en la amplificación de un fragmento del gen de la beta-globina (268 pb), utilizando los cebadores GH20 y PCO4^{16,17}. La reacción de polimerasa en cadena (RPC) para el gen L1 del VPH se realizó utilizando los cebadores específicos GP5+ y GP6+ biotinilado¹⁸. El genotipado del VPH se realizó mediante RPC convencional seguida de hibridación no radiactiva, que permite la detección de 13 genotipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66) y 5 genotipos de VPH-BR (6, 11, 42, 53, 70). Para la genotipificación del VPH, se realizó un ensayo de *blotting* de línea inversa, como se informó anteriormente¹⁷. El producto de RPC GP5+/biotinilado GP6+ se desnaturalizó a 96°C y se enfrió en hielo antes de iniciar el paso de hibridación. A continuación, los productos de RPC se colocaron en una membrana Biotyne C pretratada (Pall Bio- Support West Chester, E.U.A.) que contenía oligosondas marcadas no radiactivas específicas para cada genotipo viral. Se utilizó una reacción colorimétrica utilizando anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina para detectar la presencia/ausencia de cada genotipo de VPH¹⁹. Por último, las membranas se revelaron utilizando una solución de sustrato NBT/BCIP (ThermoFisher), según el protocolo del fabricante. Como controles positivos se utilizó un panel de 18 tipos virales de VPH. Los VPH 16, 18, 31 y 33 correspondieron a clones de plásmidos comerciales (ATCC; Manassas, VA, EE.UU.), y los tipos de VPH restantes fueron proporcionados por el Dr. Peter Snijders (centro médico de la Universidad VU, Amsterdam, Países Bajos). Los controles negativos consistieron en ADN genómico comercial (Promega, Madison, WI, E.U.A.) y agua desionizada. Una infección única por VPH (IS) se definió como la detección de una sola señal positiva del genotipo de VPH en el *Reverse Line Blot*. Las infecciones múltiples por VPH (IM) se definieron como la presencia de una señal positiva para dos o más genotipos. En las infecciones múltiples, se registró el genotipo predominante, es decir, el tipo de VPH que presentaba la señal más fuerte.

Integración del VPH

La integridad del gen E2 se llevó a cabo utilizando cebadores específicos de secuencia descritos previamente

y diseñados para amplificar fragmentos solapados del gen E2 completo de VPH16 y 18, como describieron previamente Collins y cols.²⁰. Los productos de la RPC se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Los resultados de integración obtenidos de la RPC se clasificaron en dos categorías: Cuando en una muestra se detectaban todos los fragmentos evaluados para el gen E2, el VPH se consideraba en estado episomal o no integrado. Por otro lado, si alguno de los fragmentos del gen E2 no se amplificaba, se consideraba que el VPH estaba integrado en el genoma hospedero.

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 19.0 (IBM Corporation, NY, E.U.A.). Debido a la determinación de cuartiles, la edad se categorizó en dos grupos (≤ 30 y > 30 años). Se realizó una prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher para establecer la asociación entre el intervalo de edad, el grado de la lesión, la infección por VPH y la integración del VPH. Los valores $p < 0,05$ se consideraron significativos con un 95% de confianza.

Resultados

Detección del VPH

Un total de 108 mujeres participaron en este estudio; la edad oscilaba entre 17 y 55 años, y la mediana fue de 32 años. Se determinó el genotipo de VPH en las muestras de citología y se confirmó histológicamente el diagnóstico de las pacientes. Según el diagnóstico citológico, 55,6% ($n = 60/108$) de las lesiones cervicales eran LIEBG, y 44,4% ($n = 48/108$) eran LIEAG (Tabla I). No se encontró relación estadística entre la edad de las pacientes y el grado de la lesión.

La detección del VPH basada en los cebadores consenso L1 de la RPC identificó 83,3% ($n = 90/108$) de muestras positivas para el VPH y 16,7% ($n = 18/108$) de muestras negativas para el VPH. Entre las muestras VPH-positivas, 51,1% ($n = 46/90$) presentaban una lesión cervical LIEBG y 48,9% ($n = 44/90$) una LIEAG (Tabla 1).

Distribución de los tipos de VPH en las lesiones LIEBG

Se encontró VPH en 76,7% ($n = 46/60$) de las lesiones LIEBG. La infección única por VPH (IS) correspondió a 58,7% ($n = 27/46$) de las muestras positivas para el VPH, y las infecciones múltiples por VPH (IM) a 41,3% ($n = 19/46$) (Tabla 1). Considerando tanto la IS como la IM, el VPH16 fue el tipo más frecuente en 41,3% ($n = 19/46$) de las muestras positivas al VPH, seguido del VPH51, con una frecuencia de 21,7% (10/46), y de

VPH18, con 17,4% (n = 8/46). La IS por VPH-BR sólo se encontró en 4,3% (n = 2/46) de las muestras VPH-positivas (VPH11 y 70). IM por VPH-BR en solo 4,3% (n = 2/46) de las muestras VPH-positivas (VPH11 y 70) (Tabla 1).

Distribución de los tipos de VPH en las lesiones LIEAG

El VPH se encontró en 91,7% (n = 44/48) de las lesiones LIEAG. La IS correspondió a 75% (33/44) de las muestras positivas y la IM a 25% (11/44) (Tabla 1). Considerando, tanto las IS como las IM, el VPH 16 fue el tipo más frecuentemente encontrado en 43,1% (19/44) de las muestras VPH-positivas, seguido de VPH31 que tuvo una frecuencia de 20,4% (9/44), VPH58 con 18,1% (8/44), VPH18 y VPH52 con frecuencias de 11,4% (5/44) (Tabla 1).

Infección por múltiples genotipos del VPH

La IM más frecuente fue por el tipo dual 17,7% (16/90) o la infección por tres tipos virales 11,1% (10/90), en cambio, las IM menos frecuentes fueron la infección por cuatro tipos virales 1,1% (1/90) o cinco tipos virales 2,2% (2/90) al mismo tiempo (Tabla 1). Los genotipos VPH-BR encontrados 7,7% (7/90) estaban más asociados a IM 71,4% (5/7) que a IS 28,5% (2/7) (Tabla 1). Curiosamente, la mayoría de las IM encontradas se asociaron mayormente con LIEBG 62% (18/29) que con LIEAG 38% (11/29) (Tabla 1).

Asociación del VPH con las características clínico-patológicas

Se diseñaron tablas de contingencia para asociar la presencia del VPH con la edad y el grado de la lesión cervical. Los resultados del VPH se agruparon según los

Tabla 1. Frecuencia del virus papiloma humano (VPH) en infecciones únicas y múltiples en lesiones pre-neoplásicas de cuello uterino

		LIEBG					LIEAG						
		n Total de muestras	n Total de muestras (%)	IS	n Total de IS (%)	IM	n Total de IM (%)	n Total de muestras	n Total de muestras (%)	n Total de muestras (%)	IS	n Total de IS (%)	IM
VPH -		14	23,3	-	-	-	-	4	8,3	-	-	-	-
VPH +		46	76,7	27	100	19	100	44	91,7	33	100	11	100
Total		60											
	Tipo de VPH												
VPH-BR	VPH 6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,1	0	0,0	1	9,1
	VPH 11	2	3,3	1	3,7	1	5,3	1	2,1	0	0,0	1	9,1
	VPH 70	2	3,3	1	3,7	1	5,3	1	2,1	0	0,0	1	9,1
VPH-AR	VPH 16	19	31,7	8	29,6	11	57,9	20	41,7	17	51,5	3	27,3
	VPH 18	8	13,3	1	3,7	7	36,8	5	10,4	2	6,1	3	27,3
	VPH 31	6	10,0	5	18,5	1	5,3	9	18,8	6	18,2	3	27,3
	VPH 33	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	4,2	1	3,0	1	9,1
	VPH 35	1	1,7	0	0,0	1	5,3	2	4,2	0	0,0	2	18,2
	VPH 39	4	6,7	0	0,0	4	21,1	1	2,1	0	0,0	1	9,1
	VPH 45	8	13,3	2	7,4	6	31,6	1	2,1	0	0,0	1	9,1
	VPH 51	10	16,7	4	14,8	6	31,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	VPH 52	4	6,7	1	3,7	3	15,8	5	10,4	2	6,1	3	27,3
	VPH 53	2	3,3	1	3,7	1	5,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	VPH 56	1	1,7	0	0,0	1	5,3	2	4,2	0	0,0	2	18,2
	VPH 58	6	10,0	2	7,4	4	21,1	8	16,7	5	15,2	3	27,3
	VPH 59	3	5,0	1	3,7	2	10,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	VPH 66	1	1,7	0	0,0	1	5,3	2	4,2	0	0,0	2	18,2
	VPH 55	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,1	0	0,0	1	9,1

VPH: virus del papiloma humano; LIEBG: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado; LIEAG: lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado; IS: infección única por VPH; IM: infecciones múltiples por VPH; VPH-BR: VPH-bajo riesgo; VPH-AR: VPH-alto riesgo.

genotipos del VPH, IS y IM, y las infecciones por VPH16 y/o 18 (Tabla 2). Se encontró una asociación entre el grado de la lesión y la presencia de VPH ($p = 0,038$) debido a que el VPH se encontró con mayor frecuencia en LIEAG 91,7% (44/48) frente a LIEBG 76,7% (46/60). Por otra parte, la IM con genotipos duales o más de dos del VPH se asoció con una edad joven 43,1% ($p = 0,024$). Aunque la infección por VPH16 o 18, o una combinación de ambos, fue más frecuente en el grupo de edad ≤ 30 años (51,7% frente a 38,0%), no se encontraron diferencias estadísticas entre estos grupos de edad (Tabla 2).

Integración de VPH16 y VPH18

Se encontraron muestras positivas para VPH16 ($n = 39$) y VPH18 ($n = 13$), tanto en IS como en IM. Investigamos el estado de integración del VPH de estas muestras. Encontramos una media de 42,3% (22/52)

de VPH16 y VPH18 integrados. El gen E2 se encontró intacto en 76,9% (30/39) e integrado en 23,1% (9/39) de las infecciones por VPH16. En la LIEBG, 5,3% (1/19) de los VPH16 se encontraron con el gen E2 alterado o integrado, mientras que, en la LIEAG, 94,7% (18/19) de los VPH16 estaban integrados. Por otro lado, todos los VPH18 ($n = 13$) se encontraron integrados (LIEBG = 8 y LIEAG = 5) (Tabla 3). No se encontraron diferencias estadísticas entre el estado del gen E2 de VPH16 y/o 18 y las características clínico-patológicas de las pacientes.

Discusión

El año 2020, la incidencia de CC en Chile ocupó el cuarto lugar después del cáncer de mama, colorrectal y pulmón y el séptimo lugar en muerte por cáncer en

Tabla 2. Estado del VPH y su relación con las características clínico-patológicas

	Casos		VPH+		IM			VPH 16/18		
	n	n	%	P	n	%	P	n	%	P
Total de casos	108	90	83,3	-	30	27,8	-	49	45,3	-
Edad				0,167			0,024*			0,153
≤ 30 años	58	51	87,9		22	43,1		30	51,7	
> 30 años	50	39	78,0		8	20,5		19	38,0	
Diagnóstico histológico				0,038*			0,101			0,387
LIEBG	60	46	76,7		19	41,3		25	41,7	
LIEAG	48	44	91,7		11	25,0		24	50,0	

VPH+: virus papiloma humano positivo; IM: infecciones múltiples; VPH16/18: infección por VPH 16 y/o VPH 18; LIEBG: lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado; LIEAG: lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado. Prueba de chi cuadrado. * $P < 0,05$.

Tabla 3. Integración del VPH y su relación con las características clínico-patológicas

	Casos n	VPH 16 episomal		VPH 16 inte- grado		P	VPH 18 inte- grado		P	VPH 16 y/o 18 episomal		VPH 16 y/o 18 integrado		P
		n	%	n	%		n	%		n	%	n	%	
Total de casos	49	30	76,9	9	23,1		13	100		27	55,1	22	44,9	
Edad						1,000			*					1,000
≤ 30 años	25	19	76,0	6	24,0		7	100		17	56,7	13	43,3	
> 30 años	14	11	78,6	3	21,4		6	100		10	52,6	9	47,4	
Citología						0,716			*					0,393
LIEBG	19	14	73,7	5	26,3		8	100		12	48,0	13	52,0	
LIEAG	20	16	80,0	4	20,0		5	100		15	62,5	9	37,5	

LIEBG: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado; LIEAG: lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado. Prueba exacta de Fisher; *: P no puede calcularse.

mujeres²¹. Los VPH 16 y 18 son los tipos más frecuentes encontrados en los carcinomas cervicales, responsables de 70% de todos los cánceres cervicales invasores en el mundo²². En consecuencia, la implementación del cribado del tipo VPH, es decir la determinación molecular del virus, ha dado lugar a una reducción significativa de la incidencia del cáncer de cuello uterino en comparación con el cribado basado únicamente en la citología²³. En nuestro país, durante el año 2014, comenzó como medida de prevención, además del cribado, la vacunación contra VPH, la que se efectúa con la vacuna tetravalente, para los serotipos 6, 11, 16 y 18, administrada a niñas entre 9 y 13 años²⁴. Luego, en el 2019 se incluyeron a niños del mismo rango etario²⁵. Lo anterior, se torna relevante debido a que VPH en el hombre es igualmente importante, ya que estos pueden actuar como reservorio y vector del virus, además de estar relacionado con cánceres como anal o de pene²⁶.

Las vacunas contra VPH, que tienen aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) se encuentran en formatos *bivalente* (Cervarix[®]), que previene infección por genotipos 16 y 18 del virus, *tetravalente* (Gardasil[®]), que previene infección por genotipos 16,18,6,11 y finalmente, la versión *nonavalente* (Gardasil9[®]) que previene genotipos virales 16, 18, 6, 11, 31, 33, 45, 52 y 58²⁷. Dentro de las principales ventajas de la vacunación, se encuentra la posibilidad de prevención de CC en las mujeres, los que sin la prevención o detección adecuadas pueden ser mortales.

Por otra parte, en el caso de los hombres, se pudo observar una disminución en lesiones genitales, y por lo tanto su transmisión a parejas sexuales. Además, puede ayudar en la prevención de cáncer de pene, así como los cánceres orofaríngeos y anogenitales²⁸.

Entre los efectos secundarios de la vacunación se describen algunos como desmayo, reacciones alérgicas locales, mareos, náuseas, cefalea; sin embargo, en 92% de los casos solo se refieren molestias menores. En los reportes de efectos adversos mayores se encontró casos de síncope y embolia pulmonar y enfermedad neurológica inusual variantes de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) que causaron la muerte de dos mujeres jóvenes^{28,29}. Finalmente señalar, que las limitaciones económicas se encuentran también dentro de las limitaciones de esta prevención²⁸.

Es importante señalar que no todas las mujeres infectadas por el VPH-AR desarrollarán cáncer de cuello uterino, pues en algunos casos la infección se resuelve gracias al sistema inmune, sin llegar a presentarse algún síntoma o afección².

En el presente estudio, se analizaron muestras de raspado cervical de mujeres con lesiones pre-neoplásicas cervicales de bajo y alto grado para detectar la presencia del VPH, genotipificarlas y evaluar integración de VPH16/18.

La frecuencia de VPH en LIEBG y LIEAG de mujeres chilenas se correlacionó con lo reportado previamente, donde los rangos fluctúan entre 61,2 y 83,5% en LIEBG y superan el 78,2% en LIEAG^{16,17,30}.

La mayoría de las lesiones pre-neoplásicas infectadas por VPH correspondieron a VPH-AR, que se encontraron en más de 90% de los casos VPH positivos, como se había descrito previamente en esta región¹⁷. La presencia de VPH se asoció con el diagnóstico histológico, como se informó previamente¹⁷.

Un hallazgo interesante, que últimamente se ha notificado cada vez más, es la alta frecuencia de IM¹⁷. Además, en este estudio, encontramos una relación entre la mayor frecuencia de IM y la edad joven (≤ 30 años). Este hallazgo podría explicarse porque los adultos jóvenes suelen tener más parejas sexuales, lo que aumenta la posibilidad de infectarse por varios tipos de VPH³¹. En un estudio realizado en Guadalupe (isla del Mar Caribe), entre los casos estudiados, 94% tenía IM y una distribución de los VPH oncogénicos con relación de los genotipos con 31 mayor a 33 y este a su vez, mayor a 16³².

Tanto en la LIEBG como en la LIEAG, el VPH16 fue el genotipo vírico detectado con mayor frecuencia, en consonancia con los informes publicados en todo el mundo^{16,17,22,33,34}. El VPH18 resultó ser el cuarto genotipo más frecuente en las lesiones pre-neoplásicas. La frecuencia de este genotipo del VPH varía según los factores sociodemográficos y el período del análisis, dado que la frecuencia varía incluso entre la misma población^{16,17,22,33,34}.

Es importante señalar, que a pesar de que los genotipos de alto riesgo VPH 16 y 18 son de los más frecuentes, también hay casos en los que se han estudiado muestras en las que se encuentra la ausencia de estos genotipos principales y que, sin embargo, tienen otros tipos de VPH. Estos estudios relevaron, que en muestras de mujeres que fueron negativas para citología y para VPH 16 y 18, se encontró presencia de genotipos como 31, 33, 51, entre otros^{36,37}. La infección con genotipos de VPH de alto riesgo que no fueron VPH16/18, ha sido sugerido como predictor de la persistencia y progresión de la enfermedad cervical permitiendo detectar pacientes con lesiones de bajo grado que evolucionan a lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, lo que se debería tener en cuenta al momento de la pesquisa³⁸. Dependiendo de la situación de cada localidad, lo anterior podría ser considerado controversial, en el aspecto de decidir el incluir o no otros genotipos de alto riesgo, diferentes a VPH 16 o 18. Por ejemplo, en un estudio realizado en Taiwán, se llegó a la conclusión de que el riesgo de desarrollar neoplasia cervical intraepitelial entre los casos VPH de alto riesgo que no fueron genotipos 16 o 18 con citología negativa es bajo, y que llevar a cabo una colposcopia podría ser un enfoque más accesible en regiones con recursos limitados y bajos ingresos, como Taiwán³⁹.

En el presente estudio, se ha encontrado que la integración de VPH16 y 18 es un evento que ocurre en las etapas tempranas de la infección, como se demostró previamente²⁰. No se encontraron diferencias estadísticas entre la frecuencia de integración de VPH16 o VPH18 y el diagnóstico histológico, lo que confirma la disrupción temprana en E2 de ambos genotipos de VPH-AR. Otro estudio, realizado en Suiza, encontró resultados similares⁴⁰. En las lesiones pre-neoplásicas, encontramos una frecuencia de integración del VPH de 55,6 y de 65% en LIEBG y LIEAG, respectivamente. Un estudio realizado en Brasil informó de una integración de 25% en LIEBG y de 65% en LIEAG, aunque el tamaño de la muestra utilizada en esta investigación fue pequeño (n = 14) y analizó la integración del VPH mediante FISH⁴¹. En la población china, se han notificado niveles de integración del VPH de 50% (n = 5) y de 56,6% (n = 9) de LIEBG y LIEAG, respectivamente⁴². Sin embargo, se ha informado de que el estado de integración del VPH varía según la metodología y la población en estudio⁴⁰.

En cuanto al grado de integración del VPH16, los resultados son similares a los observados en Portugal en muestras pre-neoplásicas cervicales (40% LIEBG; 50% LIEAG)⁴³. Otro estudio realizado en España mostró la integración de VPH16 en 59,8% de las lesiones pre-neoplásicas⁴⁴. En la población china con lesiones pre-neoplásicas se encontró una frecuencia de integración de VPH16 de 50%⁴⁵.

Por otro lado, el VPH18 se encontró integrado en 100% de los casos de LIEBG y LIEAG. Estos datos son iguales a los obtenidos en cáncer de cuello uterino⁴⁶, sugiriendo que el VPH18 es más susceptible de integrarse en el genoma del hospedero en comparación con el VPH16, convirtiéndose en un genotipo más agresivo, como se ha descrito anteriormente⁴⁷. Otro estudio informó de una frecuencia de integración del VPH18 de 86,2%,

siendo más preciso debido al mayor tamaño de la muestra (n = 248)⁴⁴. Se desconocen los mecanismos implicados en una mayor capacidad del VPH18 para integrarse en el genoma del hospedero.

Se ha encontrado que la integración del ADN viral en el genoma del hospedero causa alteraciones genéticas amplificando oncogenes e inactivando genes supresores de tumores, además de generar inestabilidad genética. Dentro de los sitios de integración frecuentes relacionados con el proceso carcinogénico, se ha encontrado en el oncogén *MYC* que favorece la proliferación celular⁴⁸. Otros genes relevantes para el proceso tumorigénico y que se ven influenciados por la integración de VPH son *TMEM49*, *FANC*, *POU5F1B*, *FHIT*, *KLF12*, *KLF5*, *HMG2*, *LRP1B*, *LEPREL1*, *DLG2* y *SEMA3D*, los que se relacionan con vías de reparación, crecimiento y proliferación celular⁴⁹.

A pesar de que este estudio no es capaz de diferenciar estados episomales o integrados de aquellas muestras que podrían presentar ADN viral en ambos estados físicos, el mero hecho de que ya se encuentre un genoma viral integrado en las lesiones pre-neoplásicas es un factor crucial para la carcinogénesis cervical^{26,50}.

En conclusión, la determinación del grado de integración del VPH en LIEBG, mediante RPC, técnica específica y económica, podría ser una herramienta complementaria a la genotipificación del VPH y a la prueba de Papanicolau para establecer si existe un mayor riesgo de progresión a cáncer cervicouterino en mujeres con lesiones pre-neoplásicas en la población chilena.

Agradecimientos. Los autores agradecen el apoyo en el procesamiento de muestras a las estudiantes de pregrado de Tecnología Médica de la Universidad de La Frontera: Katherine Sandoval, Katherine Cornejo y Guiselle Aguirre.

Referencias bibliográficas

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 2021; 71: 209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
- Walboomers J M M, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999; 189: 12-9 doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
- Morrison, J. Baldwin P, Hanna L, Andreou A, Buckley L, Durrant L, et al. British Gynaecological Cancer Society (BGCS) vulval cancer guidelines: An update on recommendations for practice 2023. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2024; 292: 210-38. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38043220/#:~:text=doi%3A%2010.1016/j.ejogrb.2023.11.013>.
- Rengifo-Rodríguez J E, Osorio J C. Human papillomavirus: microbiology, association with penile cancer, and characteristics of the vaccine. *Rev Mex Urol* 2020; 80: 1-10. <https://doi.org/10.48193/revistamexicanadeurologia.v80i4.536>.
- Harden M E, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat. Res.* 2017; 772: 3-12 doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002.
- Burd E. M, Dean, C. L. Human papillomavirus. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4: 1-17 doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0001-2015.
- Bzhalava D, Eklund, C, Dillner, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* 2015; 476: 341-4 doi: 10.1016/j.virol.2014.12.028.
- Groves I J, Coleman, N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J. Pathol.* 2015; 235: 527-38 doi: 10.1002/path.4496.
- WHO. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/> (2015).
- Doorbar J, Egawa, N, Griffin, H, Kranjec C, Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* 2015; 25: 2-23. doi: 10.1002/rmv.1822.

- 11.- Li W, Tian S, Wang P, Zang Y, Chen X, Yao Y, et al. The characteristics of HPV integration in cervical intraepithelial cells. *J. Cancer* 2019; 10: 2783-7. doi: 10.7150/jca.31450.
- 12.- Nayar R, Wilbur D C, Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical cytology. *Comprehensive Cytopathology* 2008; 77-90 <https://doi.org/10.1016/B978-141604208-2.10006-5>.
- 13.- Motoyama S, Ladines-Llave C A, Villanueva S L, Maruo, T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J. Med. Sci.* 2004; 50: 9-19 PMID: 15342967.
- 14.- Bruni L, Albero G, Rowley J, Alemany L, Arbyn M, Giuliano AR, et al. Articles global and regional estimates of genital human papillomavirus prevalence among men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health.* 2023; 11: e1345-e1362 <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S2214-109X%2823%2900305-4>.
- 15.- Santos FLSG, Invencao MCV, Araujo GD, Barros G S, Batista M V A. Comparative analysis of different PCR - based strategies for HPV detection and genotyping from cervical samples. *J Med Virol* 2021; 93(11): 63-47. doi: 10.1002/jmv.27118.
- 16.- Ili C G, Brebi P, López J, García P, Leal P, Suarez E, et al. Genotyping of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia in a high-risk population. *J. Med. Virol.* 2011; 83(5): 833-7 doi: 10.1002/jmv.22057.
- 17.- Brebi P, Ili CG, Andana A, Menzel D, Lopez J, Guzman P, et al. Frequency of human papillomavirus in women attending cervical cancer screening program in Chile. *BMC Cancer* 2017; 17: 1-10. doi: <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3496-x>
- 18.- Van den Brule A J C, René Pol R, Fransendaalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM, and Snijders PJF. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 779-87. doi: 10.1128/JCM.40.3.779-787.2002.
- 19.- Buchegger K, Viscarra T, Andana A, Ili C, López J, Zanella L, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus virus (HPV): a comparative analysis of clinical performance in cervical and urine samples in Chilean women. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2018; 11: 5413-21. PMID: 31949624.
- 20.- Collins S I, Constandinou-Williams C, Wen K, Young LS, Roberts S, Murray PG, et al. Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: A longitudinal cohort study. *Cancer Res.* 2009; 69: 3828-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3099.
- 21.- GLOBOCAN. Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, Chile, females, all ages. https://geo.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=152&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%252D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%252D&population_group_globocan_id=
- 22.- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 518-27. doi: 10.1056/NEJMoa021641.
- 23.- Horn J, Denecke A, Luyten A, Rothe B, Axel Reinecke-Lüthge A, Mikolajczyk R, et al. Reduction of cervical cancer incidence within a primary HPV screening pilot project (WOLPHSCREEN) in Wolfsburg, Germany. *Br. J. Cancer* 2019; 120: 1015-22. doi: 10.1038/s41416-019-0453-2.
- 24.- Vacunación contra el virus del papiloma humano. Ministerio de Salud, Chile. Programa Nacional de Inmunizaciones. <https://www.minsal.cl/vacunacion-contra-el-virus-del-papiloma-humano/>
- 25.- Aldunate MF. Vacuna virus papiloma humano. Beneficios y seguridad en su uso. *Bol. Farmacovigil. vacunas, Inst. Salud Publica, Chile* 2019; 1-7. <https://www.ispch.cl/newsfarmacovacunas/03/images/03vigilancia.pdf>
- 26.- Silva R, León D, Brevi P, Ili C, Roa JC, Sánchez R. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev. Chil. infectología* 2013; 30: 186-92. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000200009>.
- 27.- World Health Organization. Guide to introducing HPV vaccine into national immunization programmes. (2016). <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549769>.
- 28.- White M. D. Pros, cons, and ethics of HPV vaccine in teens-Why such controversy? *Transl Androl Urol* 2014; 3: 429-34. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2014.11.02.
- 29.- Jørgensen L, Gøtzsche P C, Jefferson T. Benefits and harms of the human papillomavirus (HPV) vaccines: systematic review with meta-analyses of trial data from clinical study reports. *BMC Biol.* 2020; 9: 1-23 doi: 10.1186/s13643-019-0983-y.
- 30.- López J, Ili CG, Brevi P, García P, Capurro I, Guzmán P, et al. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas de cuello uterino. *Rev. Med. Chil.* 2010; 138:, 1343-50. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010001200001>.
- 31.- Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, Ampuero SLI, Snijders PJF, Meijer CJLM, et al. Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004; 13: 2271-6. PMID: 15598792.
- 32.- Gaete S, Auguste A, Bhakkan B, Peruvien J, Herrmann-Storck C, Socrier Y, et al. Frequent high-risk HPV co-infections excluding types 16 or 18 in cervical neoplasia in Guadeloupe. *BMC Cancer* 2021; 21: 1-9. doi: 10.1186/s12885-021-07940-3.
- 33.- Zhao S, Zhao X, Hu S, Lu J, Duan X, Zhang X, et al. Distribution of high-risk human papillomavirus genotype prevalence and attribution to cervical precancerous lesions in rural North China. *Chinese J. Cancer Res.* 2019; 31: 663-72. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2019.04.10.
- 34.- Vergara N, Espinoza G, Balanda M, Quiero A, Hidalgo W, San Martín H, et al. Prevalence of human papillomavirus infection among Chilean women from 2012 to 2016. *J. Med. Virol.* 2017; 89: 1646-53. doi: 10.1002/jmv.24805.
- 35.- Adcock R, Cuzick J, Hunt WC, McDonald RM, Wheeler CM. Role of HPV genotype, multiple infections and viral load on the risk of high-grade cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2019; 28: 1816-24. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0239.
- 36.- Kabaca C, Peker EK. The meaning of high-risk HPV other than type 16 / 18 in women with negative cytology: Is it really safe to wait for 1 year? *Diagn. Cytopathol.* 2021; 49: 480-6. doi: 10.1002/dc.24705.
- 37.- Bai A, Xue P, Li Q, Jiang Y, Qiao Y. Diagnostic value of high-risk HPV other than type 16 / 18 in high-grade cervical neoplasia among cytology-negative women: A multicenter retrospective study. *Cancer Med.* 2023; 12: 14794-805 doi: 10.1002/cam4.6109.
- 38.- Lyons YA, Kamat D O A A, Zhou H, Mody DR. Non-16 / 18 High-Risk HPV infection predicts disease persistence and progression in women with an initial interpretation of LSIL. *Cancer Cytopathol.* 2015; 435-42. doi: 10.1002/cncy.21549.
- 39.- Yarandi F, Shirali E, Feizabad E, Ramhormoziyan S, Sarmadi S, SadrAmeli M, et al. T Cervical intraepithelial neoplasia in non-16 / 18 high-risk human papilloma virus positive / cytology negative women: An alternative approach in poor resource areas.

- Taiwan. *J. Obstet. Gynecol.* 2023; 62: 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2022.12.003>.
- 40.- Obermann E C, Prince SS, Barascud A, Grilli B, Herzog M, Kaup D, et al. Prediction of outcome in patients with low-grade squamous intraepithelial lesions by fluorescence in situ hybridization analysis of human papillomavirus, *terc*, and *myc*. *Cancer Cytopathol.* 2013; 121: 423-31. doi: 10.1002/cncy.21280.
- 41.- Gimenes F, Pantarotto Souza R, Luelsdorf Pimenta de Abreu A, Wolski Pereira M, Lopes Consolaro, Ramos Sela da Silva V. Simultaneous detection of human papillomavirus integration and *c-MYC* gene amplification in cervical lesions: an emerging marker for the risk to progression. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2015; 293: 857-63. doi: 10.1007/s00404-015-3870-3.
- 42.- Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat. Genet.* 2015; 47: 158-63. doi: 10.1038/ng.3178.
- 43.- Ribeiro J, Teixeira D, Marinho-Dias J, Monteiro P, Loureiro J, Baldaque I, Medeiros R, et al. Characterization of human papillomavirus genotypes and HPV-16 physical status in cervical neoplasias of women from northern Portugal. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2014; 125: 107-10. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.10.011.
- 44.- Oliveira AG, Delgado C, Verdasca N, Pista Â. Prognostic value of human papillomavirus types 16 and 18 DNA physical status in cervical intraepithelial neoplasia. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19: E447-50. doi: 10.1111/1469-0691.12233.
- 45.- Li H, Yi Yang, Zhang R, Cai Y, Yang X, Wang Z, et al. Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *J. Clin. Virol.* 2013; 56: 342-7. doi: 10.1016/j.jcv.2012.12.014.
- 46.- Corden SA, Sant-Cassia L J, Easton AJ, Morris AG. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *J. Clin. Pathol. - Mol. Pathol.* 1999; 52, 275-82 doi: 10.1136/mp.52.5.275.
- 47.- Liu Y, Lu, Z, Xu, R, Ke, Y. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. *Oncotarget* 2016; 7: 5852-64 doi: 10.18632/oncotarget.6809.
- 48.- Kamal M, Lameiras S, Deloger M, Morel A, Vacher S, Lecerf C, et al. Human papilloma virus (HPV) integration signature in cervical cancer: identification of MACROD2 gene as HPV hot spot integration site. *Br. J. Cancer* 2020; 124: 777-85 doi: 10.1038/s41416-020-01153-4.
- 49.- Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Rodríguez-Gutiérrez HF, Gómez-Macias GS, Fajardo-Ramírez OR, Treviño V, et al. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 61: 134-44. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.003.
- 50.- Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2006; 2006 Suppl:40470. doi: 10.1155/IDOG/2006/40470.