



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Tipos de virus del papiloma humano en cánceres
del cérvix, la región anogenital y la cavidad oral en
el estado de San Luis Potosí, México**

Tesis que presenta

Claudia Magaña León

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. Rubén López-Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., Marzo de 2017



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

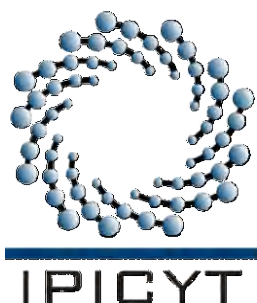
La tesis "***Tipos de virus del papiloma humano en cánceres del cérvix, la región anogenital y la cavidad oral en el estado de San Luis Potosí, México***" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Claudia Magaña León** y aprobada el **diez de marzo de dos mil diecisiete** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Director de la tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Gerardo Alfonso Anguiano Vega
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Juan Pedro Luná Arias
Miembro del Comité Tutorial

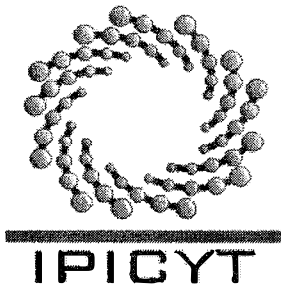


Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (34357) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

También recibió el apoyo de la convocatoria “Becas-Mixtas en el Extranjero 2009 – marzo 2010” del CONACYT para la estancia que realizó del 1 de marzo de 2010 al 31 de agosto de 2010 en el Instituto Catalán de Oncología (Barcelona).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 093 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de marzo del año 2017, se reunió a las 09:20 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Secretario	IPICYT
Dr. Gerardo Alfonso Anguiano Vega	Sinodal externo	UJED
Dr. Juan Pedro Luna Arias	Sinodal externo	CINVESTAV

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Claudia Magaña León

sobre la Tesis intitulada:

Tipos de virus del papiloma humano en cánceres del cérvix, la región anogenital y la cavidad oral en el estado de San Luis Potosí, México

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de marzo de 2017.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



A DEW,
DONDE QUIERA QUE ESTÉS...

Agradecimientos

A Marleny Vergara Muñoz, del Instituto Catalán de Oncología. Por su paciencia y dedicación para enseñarme a trabajar correctamente la técnica SPF-10-DEIA y por su sincera amistad e inigualable calidad humana.

A la Dra. Silvia de Sanjosé por recibirme en su laboratorio durante mi estancia en el ICO.

Al Dr. Cuauhtémoc Oros, el Dr Julio Castelo, el Dr Willy Escalante y el Dr Samuel Ruíz, del Hospital Central Ignacio Morones Prieto, por su apoyo para la obtención de los bloques de parafina y expedientes clínicos con los que se realizó este trabajo.

Al Dr Rubén López-Revilla por aceptarme para realizar mi trabajo doctoral en su laboratorio.

A la Bióloga Mireya Sánchez Garza, por su apoyo en cuestiones técnicas, su disposición para ayudarme a resolver dudas del laboratorio y por encargarse de que tuviera siempre el material para trabajar o hacer lo necesario para conseguirlo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por su apoyo y amistad: Mariel, Cindy, Angélica, Gloria y Alan, gracias por hacer más llevadero el camino y compartir tantos buenos momentos.

A todos aquellos que estuvieron ahí para darme su apoyo y palabras de aliento cuando el camino se hizo cuesta arriba, y cuyos nombres no es necesario mencionar pues saben lo importantes que son en mi vida.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Copia del acta del examen	iv
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
I. Cánceres asociados a virus del papiloma humano en San Luis Potosí	1
Cáncer cervicouterino	1
<i>Estadios clínicos del CaCu</i>	2
<i>CaCu y virus del papiloma humano</i>	2
Carcinomas no cervicales	4
<i>Cáncer anal</i>	4
<i>Cáncer vulvar</i>	4
<i>Cáncer vaginal</i>	5
<i>Cáncer de pene</i>	5
<i>Cánceres de cabeza y cuello</i>	6
Justificación	6
Organización de la tesis	7
II. Material y métodos	8
Neoplasias intraepiteliales de alto grado y carcinomas invasores no cervicales	8
<i>Población y diseño del estudio</i>	8
<i>Selección y análisis de los casos incluidos</i>	8
<i>Detección y tipificación de VPH</i>	10
Carcinomas invasores del cérvix	10
<i>Diseño y contexto del estudio</i>	10
<i>Estudio clínico retrospectivo</i>	11
<i>Detección y tipificación de VPH</i>	11
III. Tipos de VPH en neoplasias intraepiteliales de alto grado y carcinomas invasores no cervicales	13
Resumen	13
Resultados	14
<i>Etapas del estudio</i>	14
<i>Diagnóstico histopatológico y selección de casos</i>	14
<i>Detección y tipificación de VPH</i>	16

IV. Tipos de VPH en carcinomas invasores del cérvix	18
Resumen	18
Resultados	19
<i>Tipos histológicos</i>	19
<i>Edad y estadio clínico al momento del diagnóstico</i>	19
<i>Defunciones vs edad y estadio clínico al momento del diagnóstico</i>	19
<i>Enfermedades concomitantes</i>	22
<i>Metástasis</i>	22
Prevalencia del DNA de VPH	22
<i>Bloques de parafina asignados al diagnóstico de VPH</i>	22
<i>Tipos de VPH identificados</i>	25
<i>Tipos de VPH en las infecciones sencillas y múltiples</i>	25
IV. Discusión	30
Carcinomas no cervicales	31
Carcinomas cervicales	33
V. Referencias	36
VI. Apéndices	42
Constancia de tutoría durante la estancia de la autora en el Instituto Catalán de Oncología	42
Publicaciones resultantes del estudio	43
de Sanjosé et al. (2013) Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. <i>European Journal of Cancer</i> 2013:3450-3461	43
Alemany et al. (2014) Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: a worldwide study in 597 samples. <i>European Journal of Cancer</i> 50:2846-2854	44
Magaña-León et al. (2015) Human papillomavirus types in non-cervical high-grade intraepithelial neoplasias and invasive carcinomas from San Luis Potosí, Mexico: a retrospective cross-sectional study. <i>Infectious Agents and Cancer</i> 10:33.	45
Alemany et al. (2016) Role of human papillomavirus in penile carcinomas worldwide. <i>European Urology</i> 69:953-961	46
Castellsagué et al. (2016) HPV involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients. <i>Journal of the National Cancer Institute</i> 108 (6): djv403	47

Lista de tablas

Tabla 1. Localización anatómica y diagnóstico histopatológico de los tumores	15
Tabla 2. Tipos virales en los 13 tumores no cervicales VPH positivos	17
Tabla 3. Tipos histológicos de los carcinomas cervicouterinos invasores	20
Tabla 4. Edad al momento del diagnóstico	20
Tabla 5. Estadio clínico al momento del diagnóstico	21
Tabla 6. Defunciones vs. edad al momento del diagnóstico	21
Tabla 7. Defunciones vs. estadio clínico inicial	23
Tabla 8. Enfermedades concomitantes	23
Tabla 9. Localización de las metástasis detectadas	24
Tabla 10. Casos VPH positivos y negativos	24
Tabla 11. Prevalencia de las infecciones sencillas y múltiples en los casos VPH positivos	26
Tabla 12. Prevalencia de los 19 tipos de VPH identificados	27
Tabla 13. Prevalencia de los tipos de VPH en las infecciones sencillas	28
Tabla 14. Prevalencia de los tipos de VPH en las infecciones múltiples	29

Lista de figuras

Fig. 1. Diagrama de flujo del estudio de los carcinomas no cervicales	9
Fig. 2. Diagrama de flujo del estudio de los carcinomas del cérvix	12

Abreviaturas

CaCu	Cáncer cervicouterino.
CI	Cáncer invasor.
DDL	Laboratorio Diagnóstico de Delft (<i>Delft Diagnostic Laboratory</i>).
DEIA	Ensayo inmunoenzimático de DNA (<i>DNA enzyme immunoassay</i>).
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>).
EC	Estadio clínico del cáncer cervicouterino.
EDTA	Etiléndiamino-tetraacetato de sodio.
FFPE	Fijado con formaldehído e incluido en parafina (<i>formalin fixed-paraffin embedded</i>).
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.
IA1	Estadio clínico del CaCu con enfermedad microinvasora.
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (<i>International Agency for Cancer Research</i>).
IB2/IIA2-IVA	Estadios clínicos del CaCu localmente avanzados.
ICO	Instituto Catalán de Oncología.
IIA1	Estadio clínico del CaCu con tumores < 4 cm sin invasión parametrial.
IVB	Estadio clínico del CaCu con enfermedad avanzada o metastásica recurrente o persistente.
LiPA	Arreglo lineal de sondas (<i>Linear probe array</i>).
NIA	Neoplasia intraepitelial de alto grado.
NIB	Neoplasia intraepitelial de bajo grado
ORF	Marco de lectura abierto (<i>Open reading frame</i>).
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
SPF10	Fragmento de PCR corto generado con 10 oligonucleótidos (<i>Short PCR fragment generated with 10 oligonucleotides</i>).
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.
VPH	Virus del papiloma humano.

Resumen

Tipos de virus del papiloma humano en cánceres del cérvix, la región anogenital y la cavidad oral en el estado de San Luis Potosí, México

La infección persistente por virus del papiloma humano (VPH) es necesaria para la transformación irreversible de las células epiteliales hasta Carcinoma Invasor (CI). Hemos determinado la prevalencia de los tipos de VPH en NIA y CI de tumores no cervicales y cervicales para evaluar la oncogenicidad de los tipos virales circulantes en el estado de San Luis Potosí y la prevención potencial de infecciones y lesiones neoplásicas por la vacunación anti-VPH. El estudio incluyó los expedientes y bloques de parafina de carcinomas no cervicales y cervicales diagnosticados en el Hospital Central Ignacio Morones Prieto entre 1999 y 2011. La presencia de VPH fue determinada con el ensayo SPF10-DEIA y los tipos virales identificados con INNO-LiPA. **Carcinomas no cervicales.** Cinco tipos de alto riesgo (VPH 16, 45, 59, 33 y 35) y dos de bajo riesgo (VPH 11 y 53) fueron identificados. La mayoría de las infecciones fueron por un tipo de alto riesgo y VPH 16 fue el más prevalente. La vagina fue la localización más frecuente de los tumores VPH positivos y la vacunación contra VPH 16 y 18 pudo haber prevenido la mitad de ellos. **Carcinomas del cérvix.** Entre los 185 expedientes clínicos examinados hubo tres tipos histológicos: carcinoma epidermoide (70.3%), carcinoma adenoescamoso (16.9%) y adenocarcinoma (12.8%). El grupo de 31-60 años incluyó el 76% de los casos y el 74% de pacientes en etapas terminales y defunciones. De 103 bloques de parafina analizados 84 fueron VPH positivos, identificamos 12 tipos de alto riesgo (VPH 16, 45, 51, 52, 31, 59, 18, 33, 35, 56, 58 y 73), dos de probable alto riesgo (VPH 66 y 53), tres de bajo riesgo (VPH 44, 11 y 70) y dos tipos no clasificados (VPH 69/71 y VPH 74). Concluimos que la mayoría de los carcinomas del cérvix estaba en estadio clínico avanzado. Los tipos más prevalentes son VPH 16 y 45 y la vacuna contra VPH 16 y 18 pudo haber prevenido al menos la mitad de los tumores VPH positivos.

PALABRAS CLAVE: VPH, SPF10, INNOLIPA

Abstract

Human papillomavirus types in cancers of the cervix, the anogenital region and the oral cavity from the state of San Luis Potosí, Mexico

Persistent infection by human papillomavirus (HPV) is necessary for the irreversible transformation of epithelial cells up to high grade intraepithelial neoplasia (HIN) that progresses to invasive carcinoma (IC). We determined the prevalence of HPV types in HIN and IC from non-cervical and cervical tumors to evaluate the oncogenicity of the viral types circulating in the state of San Luis Potosí and the potential prevention of infections and neoplastic lesions through anti-HPV vaccination. The study included clinical files and paraffin-embedded tissue blocks from non-cervical and cervical carcinomas diagnosed at Hospital Central Ignacio Morones Prieto between 1999 and 2011. HPV was determined with the SPF10-DEIA assay and the viral types identified with the INNO-LiPA linear array. **Non-cervical carcinomas.** Five high-risk types (HPV 16, 45, 59, 33 and 35) and two low-risk types (HPV 11 and 54) were. Most infections were by a single HPV high-risk type, the most prevalent being HPV 16. Vagina is the most frequent location of the HPV positive tumors and vaccination against HPV 16 and HPV 18 could have prevented around half of them. **Cervical carcinomas.** The 185 clinical files examined registered three histological types: epidermoid carcinoma (70.3%), adenosquamous carcinoma (16.9%) and adenocarcinoma (12.8%). The 31-60 years group included 76% of cases and 74% of terminal-stage patients and defunctions. 103 paraffin blocks analyzed 84 of which were HPV positive. We identified 12 high risk types (HPV 16, 45, 51, 52, 31, 59, 18, 33, 35, 56, 58 y 73), two of probable high risk (HPV 66 y 53), three of low risk (HPV 44, 11 y 70) and two unclassified types (HPV 69/71 and HPV 74. We conclude that most cervical carcinomas were advanced. The most prevalent types are HPV 16 and 45, and vaccination against HPV 16 and 18 could have prevented at least half of the HPV positive tumors.

KEYWORDS: HPV, SPF10, INNOLIPA.

I. Cánceres asociados a virus del papiloma humano en San Luis Potosí

Cáncer cervicouterino

A nivel mundial el cáncer cervicouterino (CaCu), es la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres de todas las edades y la segunda en mujeres de 15-44 años de edad, con un total estimado de 527,624 casos nuevos y 265,672 defunciones en 2012. Alrededor del 85% de los casos de CaCu ocurre en regiones en desarrollo, donde representa el 12% de todos los cánceres femeninos (Ferlay et al. 2015). Afecta principalmente a mujeres con desventajas económicas, sociales y culturales y por ende es más común en países desarrollo, en contraste con los países desarrollados, donde ocurre únicamente el 3.6% de los casos nuevos (Siegel et al. 2014).

En México el CaCu es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres en estados con alta marginación y la segunda en estados con baja marginación. En 2013 se reportaron 15,562 casos nuevos y 5,842 defunciones por CaCu en el país (Gomez-Dantes et al. 2016). Aunque para 2013 las tasas de mortalidad disminuyeron más de la mitad respecto a las de 2010 (Gomez-Dantes et al. 2016; Sanchez-Barriga 2012), el CaCu continúa siendo un grave problema de salud pública en México y sus variaciones en incidencia y mortalidad están directamente relacionadas con el nivel socioeconómico, la dificultad para acceder a los servicios de salud y la calidad de los mismos, la ubicación geográfica, el nivel educativo y los aspectos culturales y psicosociales. En general, en Latinoamérica (incluyendo a México), la supervivencia de las mujeres con CaCu es más corta porque ellas acuden a los servicios de salud cuando la enfermedad es avanzada y también está asociada a tratamientos incompletos e inadecuada atención paliativa (Palacio-Mejia et al. 2003).

Estadios clínicos del CaCu

Los estadios clínicos del CaCu se clasifican con los lineamientos de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). La 'estadificación' se basa en el tamaño tumoral, la afección vaginal o parametrial, la extensión hacia el recto o la vejiga y las metástasis a distancia (Pecorelli et al. 2009).

En términos del tratamiento, el CaCu puede dividirse en tres grandes grupos:

- Los estadios clínicos (EC) tempranos, desde IA1 (enfermedad microinvasora) hasta IIA1 (tumores < 4 cm sin invasión parametrial), usualmente son tratados con procedimientos quirúrgicos y logran supervivencias hasta del 90%.
- En los EC localmente avanzados de IB2/IIA2 a IVA, la quimioterapia-radioterapia es el tratamiento de elección con supervivencias de 60-80%, aunque algunas instituciones emplean rutinariamente la cirugía como tratamiento primario en los estadios IB2-IIA2.
- En la enfermedad avanzada o metastásica recurrente o persistente considerada como el estadio IVB, las pacientes tienen escasas probabilidades de supervivencia, que es del 15-30% con los mejores tratamientos de quimioterapia paliativa y de blancos moleculares (Duenas-Gonzalez et al. 2010).

CaCu y virus del papiloma humano

El principal factor de riesgo para el desarrollo del CaCu es la infección persistente por virus del papiloma humano (VPH), ya que el 99.7% de los casos de CaCu invasor son VPH positivos (Walboomers et al. 1999). Por esta razón la infección se ha establecido como la causa necesaria para el desarrollo de la enfermedad (Brink et al. 2007; Castellsague et al. 2006).

Entre los factores de riesgo para el desarrollo del CaCu destacan el número de parejas sexuales, el inicio precoz de la actividad sexual (Kuzman et al. 2007), la multiparidad (Castellsague et al. 2002), la inmunosupresión, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales y la coinfección con agentes de transmisión sexual como

el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del herpes simple tipo 2 (Castellsague et al. 2003; Munoz et al. 2002).

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae* y su genoma es DNA de cadena doble de ~8000 pares de bases (pb). Los viriones miden 52 a 54 nm de diámetro, carecen de envoltura lipídica y su cápside icosaédrica está formada por 72 capsómeros. El genoma puede dividirse en tres zonas: la región larga de control (LCR), la región temprana (E, por 'early' en inglés) y la región tardía (L, por 'late' en inglés).

La LCR, localizada entre los genes L1 y E6, abarca el 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción (Münger et al., 2004; de Villiers et al., 2004). La región temprana representa el 45% del genoma y comprende los genes virales responsables de la transformación neoplásica (oncogenes E6 y E7) y de la integración del genoma viral al de la célula huésped (E2 y E1). La región tardía comprende el 40% del genoma y contiene los dos genes que codifican las proteínas estructurales de la cápside (L1 y L2).

Han sido identificados más de 100 genotipos de VPH (Chan et al. 1995; de Villiers et al. 2004; Munger et al. 2004) clasificados como de alto o bajo riesgo por su asociación o no al CaCu invasor.

Los 15 tipos de alto riesgo más prevalentes a nivel mundial son, en orden descendente, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 asociados al 95% de los CaCu invasores. Entre los de bajo riesgo los más prevalentes son los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 entre los cuales el 6 y 11 causan el 90% de los condilomas genitales (Bosch et al. 1995; Munoz et al. 2003).

El reconocimiento del papel central de la infección por VPH en la etiología de prácticamente todos los casos de CaCu ha cambiado dramáticamente las perspectivas de diagnóstico y prevención de esta neoplasia. Este cambio se refiere en principio al diagnóstico de VPH para el análisis, tamizaje y seguimiento clínico de los casos y, más recientemente, a la vacunación VPH tipo específica

para la prevención de la infección primaria y las lesiones cervicales relacionadas (Koutsky and Harper 2006; Roden and Wu 2006; Schiller and Lowy 2006).

Con la creación de vacunas profilácticas tipo específicas para VPH la prevención del CaCu se está expandiendo rápidamente, con resultados extrapolables para las lesiones preneoplásicas y los cánceres invasores no cervicales asociados a VPH (Joura et al. 2007).

Carcinomas no cervicales

Los VPH contribuyen con el 3.7% de todos los cánceres en el mundo, entre los cuales el 0.5% aparecen en sitios diferentes al cérvix y representan unos 58,000 casos nuevos cada año, aunque es posible que este número subestime la contribución real de VPH (Munoz et al. 2006).

En los últimos años han ido aumentando las evidencias que vinculan la presencia de DNA de VPH en cánceres en sitios distintos al cérvix, particularmente en los de ano, vulva, vagina, pene y cavidad oral. Aunque estos cánceres son mucho menos frecuentes que el CaCu, su asociación con VPH implica su prevención potencial con estrategias similares (Bosch et al. 2013).

Cáncer anal

Este cáncer es poco común en la población general, con una incidencia mundial de 1/100,000 pero parece haberse incrementado en varias regiones desarrolladas. Globalmente se estiman unos 30,000 casos nuevos por año (Plummer et al. 2016). La incidencia es mayor en mujeres que en hombres, pero aumenta en poblaciones de hombres que tienen sexo con hombres, en mujeres con historia de cáncer cervical o vulvar y personas inmunocomprometidas. Los cánceres anales son principalmente carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas o carcinomas basaloides y cloacogénicos (Bruni et al. 2016).

Cáncer vulvar

El cáncer de vulva es raro. Se estima que en 2012 ocurrieron unos 34,000 casos nuevos, que representan el 4% de todos los cánceres ginecológicos (Plummer et

al. 2016). Alrededor del 60% de los cánceres vulvares ocurre en los países desarrollados y se caracterizan por tener dos patrones histopatológicos con diferentes perfiles de riesgo (IARC 2012).

El tipo queratinizante representa más del 60% de los cánceres vulvares, ocurre más frecuentemente en mujeres de mayor edad y raramente se asocia a VPH.

El tipo basaloide/verrugoso, más común en mujeres jóvenes, se asocia a VPH en el 75-100% de los casos, con un perfil de factores de riesgo similar al de CaCu.

Cáncer vaginal

El cáncer de vagina es aún más raro que el de vulva, con 15,000 casos nuevos registrados en 2012. Representa el 2% de los cánceres ginecológicos (Plummer et al. 2016). La mayoría de los casos de cáncer vaginal (68%) ocurre en países menos desarrollados. Los cánceres vaginales son principalmente carcinomas de células escamosas (90%), generalmente atribuibles a VPH. Pueden confundirse con cánceres cervicales metastásicos y son diagnosticados principalmente en mujeres de edad madura (> 65 años) y raramente menores de 40 años, con un pico de incidencia entre los 55-70 años (Bosch et al. 2008).

Cáncer de pene

Han sido estimados 26,000 casos anuales a nivel mundial (Plummer et al. 2016). Afecta principalmente a hombres de 50-70 años de edad, es más prevalente en países en desarrollo y representa hasta el 10% de los cánceres masculinos en algunas partes de África, Sudamérica y Asia. Las lesiones precursoras del cáncer de pene son raras; el tipo histopatológico predominante es el carcinoma de células escamosas (95%) y los subtipos predominantes son queratinizante (49%) basaloide/verrugoso (17%), verrugoso (8%), y basaloide (6%). La presencia de VPH es detectada más frecuentemente en tumores basaloideos y verrugosos. Aproximadamente 60-100% de las lesiones invasoras del pene son VPH positivas (Bruni et al. 2016).

Cánceres de cabeza y cuello

La mayoría de los cánceres de cabeza y cuello han sido asociados al consumo excesivo de tabaco y alcohol. Sin embargo, la infección por ciertos tipos de alto riesgo como VPH 16 ha sido asociada a cánceres de cabeza y cuello, especialmente orofaríngeos. La evidencia actual también sugiere que VPH 16 está asociado a cánceres de amígdala, base de la lengua y otros sitios de la orofaringe. En otros cánceres de cabeza y cuello la asociación con VPH no es consistente y tampoco es clara en cánceres laríngeos (IARC 2012).

Justificación

Nuestro grupo demostró que las lesiones neoplásicas del cérvix eran más severas y frecuentes en la ciudad de San Luis Potosí que en la Zona Media y el Altiplano del estado y predominaban entre las mujeres más jóvenes (Lomelí-Forcada et al. 2005) y que VPH 16 era el tipo de mayor prevalencia (Lopez-Revilla et al. 2008).

Sin embargo, un estudio posterior realizado en 700 mujeres que acudieron a las clínicas de colposcopia de las seis jurisdicciones sanitarias del estado entre 2007 y 2010 identificó infecciones del cérvix por 19 tipos de VPH (13 tipos de alto riesgo y seis de bajo riesgo) entre las que VPH 33 fue el más prevalente, con el doble de casos que VPH 16 (DelaRosa-Martinez et al. 2016).

Conocer los tipos de VPH que ocasionan los carcinomas invasores es fundamental para evaluar su distribución geográfica y la protección que tendría la vacunación tipo específica en cada región.

En el estado de San Luis Potosí no se ha determinado la contribución de los diversos tipos de VPH al desarrollo de carcinomas invasores localizados en el cérvix y otros tejidos, pues los estudios realizados hasta ahora han analizado los tipos de VPH presentes en raspados cervicales pero no en los tumores.

El hallazgo de que VPH 33 es el tipo más prevalente y duplica la prevalencia de VPH 33 en las infecciones del cérvix en el estado de San Luis Potosí nos motivó a investigar la prevalencia de los tipos de VPH asociados a los carcinomas invasores cervicales y extracervicales diagnosticados en el Hospital

Central de la capital del estado, para evaluar la oncogenicidad de los tipos virales circulantes y el potencial protector de las vacunas profilácticas contra VPH en la región.

Con este propósito la autora promovió la colaboración del grupo del IPICYT con el Instituto Catalán de Oncología (ICO) de Barcelona, donde hizo una estancia bajo la tutoría de la Dra. Silvia de Sanjosé. Llevó consigo bloques de parafina de tumores extracervicales del Hospital Central, cuyos resultados han sido incluidos en varios estudios multicéntricos. Recibió adiestramiento para la detección y tipificación de VPH, colaboró en los estudios que estaban realizándose y aplicó esta experiencia a su regreso a México.

Este estudio incluye el análisis de los expedientes clínicos de 185 casos de CaCu diagnosticados entre 1999 y 2010 en el Hospital Central Ignacio Morones Prieto y 170 bloques de tejidos fijados con formaldehído e incluidos en parafina (FFPE) de 103 tumores del cérvix y 67 tumores de otras localizaciones, con diagnóstico de neoplasia intraepitelial de alto riesgo (NIA) o carcinoma invasor (CI) realizados entre 1999 y 2011 en el Departamento de Patología del mismo hospital.

Organización de la tesis

A este capítulo introductorio sigue el de los métodos empleados, dos capítulos con los datos clínicos y los tipos de VPH asociados a los carcinomas no cervicales y cervicales incluidos en el estudio, un capítulo con la discusión de los resultados y otro con las referencias bibliográficas. Al final se encuentra un apéndice con las publicaciones resultantes, presentadas en orden cronológico.

II. Material y métodos

Neoplasias intraepiteliales de alto grado y carcinomas invasores no cervicales

Población y diseño del estudio

El protocolo de este trabajo se basa en el de un estudio multicéntrico diseñado por el ICO y aprobado por el Laboratorio Diagnóstico de Delft (DDL) (de Sanjose et al. 2010). El protocolo del estudio y el consentimiento para el procedimiento fueron aprobados por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Central Ignacio Morones Prieto y el Instituto Catalán de Oncología (ICO). Al igual que estudios similares, su aplicación no requirió el consentimiento informado de los pacientes, los cuales no se identifican por su nombre de conformidad con la Ley General de Salud.

El estudio (Fig. 1) incluyó 67 tumores no cervicales cuyos bloques de tejido fijados en formaldehído e incluidos en parafina (FFPE) fueron recuperados. Los diagnósticos iniciales de NIA y CI se realizaron entre 1999 y 2011 en el Departamento de Patología del Hospital Central Ignacio Morones Prieto.

Selección y análisis de los casos incluidos

Los casos incluidos fueron aquellos en los que el Laboratorio de Patología de Referencia del ICO confirmó la presencia de tejido tumoral y llegó a un diagnóstico histopatológico final (NIA o CI). Se analizaron bloques de los 67 casos por el método de sándwich basado en cinco cortes (de Sanjose et al. 2010). El corte 1 (control negativo), de 5 µm de espesor, se obtuvo a partir de un bloque de parafina virgen y fue colocado en un tubo. Los siguientes cuatro cortes en serie eran del bloque de parafina de un caso aceptable (es decir, con tejido tumoral); los cortes 2 y 5, de 3 µm de espesor, fueron colocados en portaobjetos individuales; los cortes 3 y 4, de 5 µm de espesor, se colocaron en cada uno de dos tubos. Para evitar la

contaminación cruzada, en todos los casos fue reemplazada la cuchilla del microtomo después de obtener los cortes de cada bloque de tumor. Los cortes en

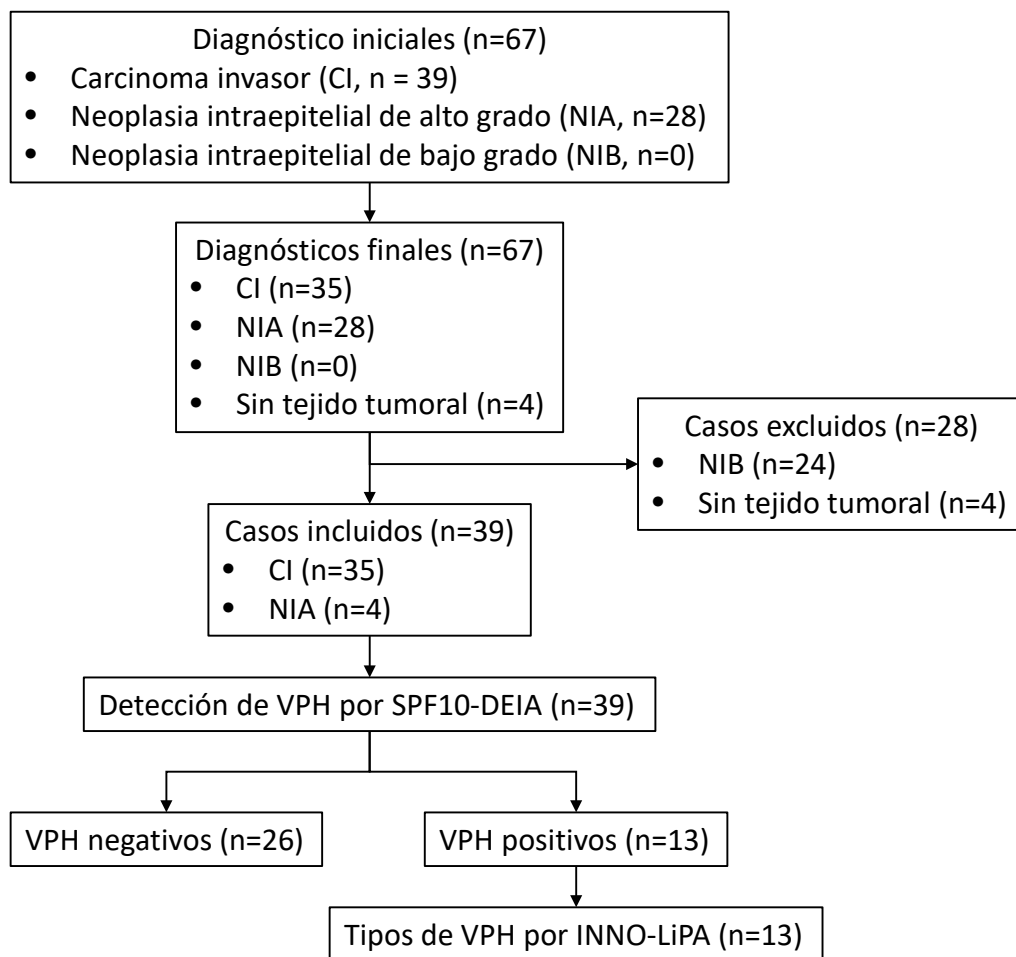


Fig. 1. Diagrama de flujo del estudio de los carcinomas no cervicales

La revisión histopatológica mostró que cuatro de los 67 bloques de parafina iniciales carecían de tejido tumoral y fueron descartados. De los 63 bloques aceptables, 28 fueron excluidos porque su diagnóstico final cambió de NIA a NIB. El DNA extraído de los bloques de parafina de los 39 casos incluidos (35 CI y 4 NIA) se sometió al ensayo SPF-10-DEIA. Los 13 casos VPH positivos fueron analizados con el ensayo INNO-LiPA para identificar los tipos virales.

las laminillas fueron teñidas con hematoxilina-eosina y se sometieron a revisión histopatológica. Se extrajo el DNA de los cortes 1 y 3 o 5 para la detección y tipificación de VPH (de Sanjose et al. 2010).

Los casos se excluyeron si los cortes 2 y 4 no contenían tejido tumoral. Cuando sólo el primer corte contenía tejido tumoral, el DNA extraído del tubo 1 fue amplificado usando el método SPF10 (*short PCR fragment generated with 10 oligonucleotides*: fragmento corto de PCR generado con 10 oligonucleótidos) seguido de ensayo inmunoenzimático de DNA (DEIA) para detectar secuencias de VPH (Kleter et al. 1999). El DNA extraído del tubo 2 se amplificó cuando se encontró tejido tumoral en ambos cortes o sólo en el segundo (de Sanjose et al. 2010).

Detección y tipificación de VPH

Cada corte de 5 µm de un bloque de parafina con tejido tumoral se mezcló con 250 µL de proteinasa K (1 mg/mL) disuelta en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8.0) y Tween-20 0.5%, y se incubó durante la noche a 60 °C. A continuación, la proteinasa K se inactivó por calentamiento a 95 °C durante 10 min. Para determinar la presencia de DNA de VPH, 1 µL del sobrenadante de cada corte tratado con proteinasa K se añadió a la mezcla de PCR SPF10-DEIA en las condiciones descritas por Kleter et al. (1998).

Se analizaron muestras de los extractos de DNA VPH positivos con el método de hibridación reversa en tira INNO-LiPA (Innogenetics, DDL), un arreglo lineal de sondas que identifica 25 de los 40 tipos de VPH anogenitales (Kleter et al. 1999).

Carcinomas invasores del cérvix

Diseño y contexto del estudio

Este trabajo consta de dos etapas (Fig. 2): 1) un estudio observacional transversal retrospectivo de casos de CaCu invasor, y 2) la detección y tipificación del DNA de

VPH en los bloques de parafina recuperados de dichos casos. El protocolo se basa en un estudio observacional transversal multicéntrico del Instituto Catalán de Oncología (ICO) publicado por de Sanjose et al. (2010) y aprobado por el Delft Diagnostic Laboratory (DDL) de Holanda. Como otros estudios similares, su ejecución no requiere consentimiento informado de los pacientes.

Estudio clínico retrospectivo

Para el estudio retrospectivo fueron considerados los 185 expedientes de CaCu invasor del periodo 1999-2010 que contaban con el registro del tipo histológico de los carcinomas, la edad de las pacientes, el estadio clínico al momento del diagnóstico, las enfermedades concomitantes, la presencia y localización de metástasis y el estadio final de los tumores (incluyendo la defunción o la etapa terminal).

Detección y tipificación de VPH

Para la detección y tipificación del DNA de VPH fueron empleados los bloques de parafina de 103 casos con diagnóstico de CaCu invasor procesados entre 1999 y 2011 que pudieron ser recuperados del Departamento de Patología del Hospital Central.

La técnica de sándwich fue aplicada para determinar la calidad y asegurar la presencia de tejido tumoral en los bloques de parafina. La extracción del material genético, amplificación y tipificación se realizaron como se describe en el apartado anterior.

El análisis de los datos permitió determinar la proporción de muestras VPH positivas, así como la prevalencia de los tipos virales y de las infecciones sencillas (por un solo tipo viral) o múltiples (por dos o más tipos virales).

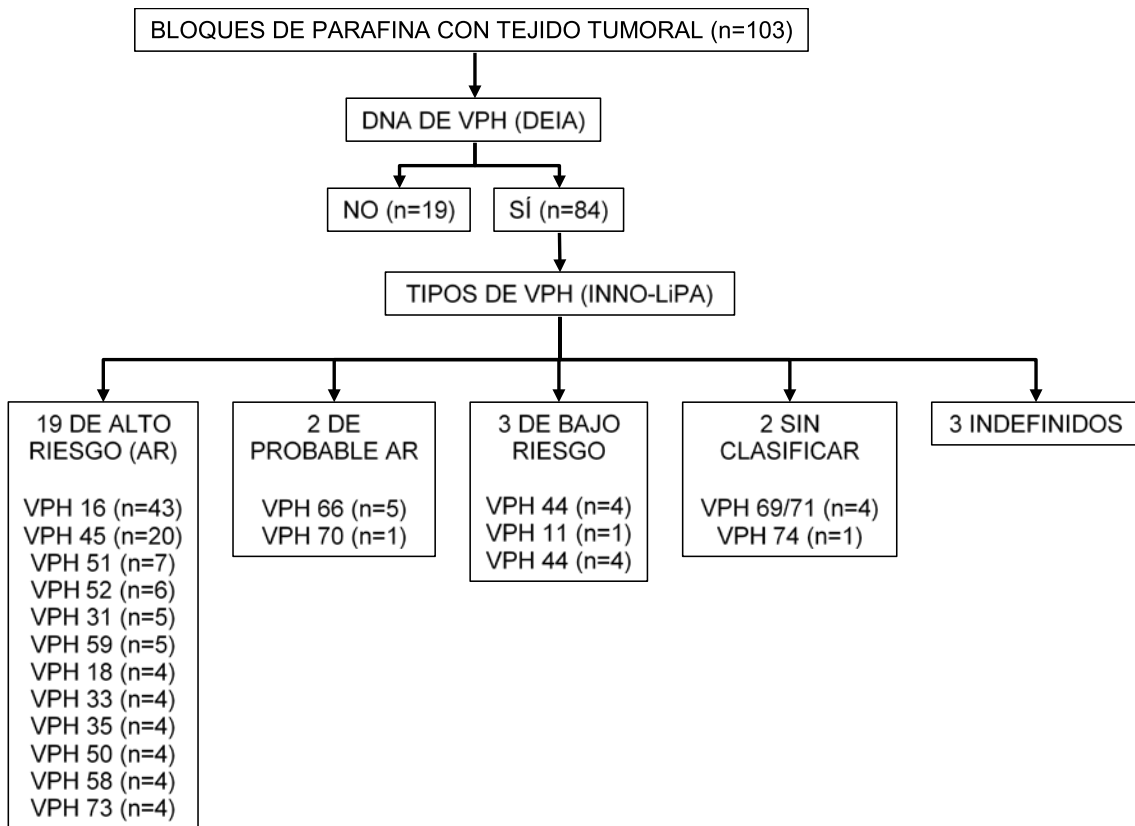


Fig. 2. Diagrama de flujo del estudio de los carcinomas del cérvix

Secuencia de los pasos y los resultados obtenidos al analizar la presencia de VPH en las muestras con tejido tumoral.

III. Tipos de VPH en neoplasias intraepiteliales de alto grado y carcinomas invasores no cervicales

Resumen

La carga de las neoplasias intraepiteliales de alto grado (NIA) y los carcinomas invasores (CI) asociados a infecciones por virus del papiloma humano (VPH) puede ser prevenida por vacunas anti-VPH tipo específicas. Este estudio determinó la prevalencia de los tipos de VPH en NIA y CI diagnosticados de 1999 a 2011 en un hospital general de San Luis Potosí, México. La revisión de 67 especímenes no cervicales fijados con formaldehído e incluidos en parafina diagnosticados inicialmente como NIA (n=28) o CI (n=39) confirmó la presencia de tejido tumoral en 63 de ellos y cambió el diagnóstico de 24 NIA a neoplasias intraepiteliales de bajo grado, excluidas del estudio. El DNA de VPH fue detectado con el inmunoensayo SPF10-DNA en los 39 casos incluidos, y los tipos virales en los tumores VPH positivos fueron identificados con el arreglo lineal INNO-LiPA. Entre los casos incluidos, cuatro NIA se localizaban en la vagina (n=3) y vulva (n=1), y 35 CI en la cavidad oral (n=19), pene (n=8), vagina (n=7) y vulva (n=1). Hubo 13 casos VPH positivos en la vagina (n=7), vulva (n=1), pene (n=1) y cavidad oral (n =1). Los tipos virales de alto riesgo identificados fueron VPH 16 en la vagina (n=3) y vulva (n=3), VPH 45 en la vagina (n =2), VPH 59 en la vagina (n =1) y pene (n=1), VPH 35 en la lengua (n =1); y los de bajo riesgo fueron VPH 54 en la vagina (n =1) y VPH 11 en la vulva (n =1). Concluimos que cinco tipos de alto riesgo (VPH 16, 45, 59, 33 y 35) y dos de bajo riesgo (VPH 11 y 53) infectaron un tercio de los NIA y CI incluidos. La mayoría de las infecciones fueron por un solo tipo de alto riesgo, siendo VPH 16 el más prevalente. La vagina es la localización más frecuente de los tumores VPH positivos. La vacunación contra VPH 16 y 18 podría haber prevenido la mitad de los tumores VPH positivos.

Resultados

Etapas del estudio

El estudio se llevó a cabo en cinco etapas (Fig. 1): 1) el Departamento de Patología del Hospital Central Ignacio Morones Prieto proporcionó 67 bloques de tejido de tumores no cervicales fijados con formaldehído e incluidos en parafina (FFPE) con diagnóstico de NIA o CI; 2) en el Laboratorio de Patología de Referencia del ICO se obtuvieron cortes histológicos por el método de sándwich y se establecieron los diagnósticos finales; 3) se incluyeron los casos con diagnóstico final de NIA o CI, y fueron excluidos los que carecían de tejido tumoral o tuvieron diagnósticos finales de neoplasia intraepitelial de bajo riesgo (NIB); 4) se realizó el ensayo SPF10-DEIA para identificar los tumores VPH positivos y negativos en los casos incluidos; 5) se identificaron los tipos virales de los casos VPH positivos con el ensayo INNO-LiPA.

Diagnóstico histopatológico y selección de casos

Entre los diagnósticos iniciales de los 63 casos aceptables, 28 correspondieron a NIA y 35 a CI (Tabla 1). Hubo 27 NIA de genitales femeninos (25 en la vagina, dos en la vulva) y uno en el ano. Diecinueve CI provenían de la cavidad oral (nueve en la laringe, seis en la lengua, dos en el paladar, uno en la mandíbula, uno en la faringe), ocho en el pene, ocho en los genitales femeninos (siete en la vagina, uno en la vulva).

La revisión de los cortes histológicos mostró que cuatro bloques carecían de tejido tumoral y estableció los diagnósticos finales que determinaron la inclusión o exclusión de los especímenes. Veinticuatro casos con diagnóstico inicial de NIA cambiaron a NIB y por lo tanto fueron excluidos (22 de la vagina, uno de la vulva y uno del ano) (Tabla 1).

La concordancia entre los diagnósticos iniciales y finales para CI fue del 100% (35/35), pero sólo del 14.3% (4/28) para NIA (Tabla 1). Los 39 casos incluidos fueron cuatro NIA (tres de la vagina y uno de la vulva) y los 35 CI de los sitios antes mencionados.

Tabla 1. Localización anatómica y diagnóstico histopatológico de los tumores

Localización		Diagnóstico ^a				
		Inicial		Final ^b		
		NIA	CI	NIB	NIA	CI
Anogenital	Vulva	0	1	0	0	1
	Vagina	25	7	22	3	7
	Vulva	2	0	1	1	0
	Ano	1	0	1	0	0
	Pene	0	8	0	0	8
	Subtotal	28	16	24	4	16
Oral	Laringe	0	9	0	0	9
	Lengua	0	6	0	0	6
	Paladar	0	2	0	0	2
	Mandíbula	0	1	0	0	1
	Faringe	0	1	0	0	1
	Subtotal	0	19	0	0	19
Total		28	35	24	4	35

Detección y tipificación de VPH

Catorce de los 39 casos incluidos fueron VPH positivos (35.9%) y correspondieron a 10 CI (seis de la vagina, uno de la vulva, uno del pene y uno de la lengua), y cuatro NIA (tres de la vagina y uno de la vulva).

Identificamos siete tipos virales con el ensayo INNO-LiPA aplicado a los casos VPH positivos (Tabla 2): cinco de alto riesgo (VPH 16, 45, 59, 33 y 35) y dos de bajo riesgo (VPH 11 y 54). El tipo más frecuente fue VPH 16, presente en seis casos (dos vaginales y un CI vulvar y tres NIA vaginales), seguido de VPH 45 en dos CI vaginales y VPH 59 en dos CI (uno de la vagina y uno del pene). Hubo cinco casos con cada uno de los siguientes tipos: VPH 33 (CI vaginal), VPH 35 (CI lingual), VPH 54 (CI vaginal) y VPH 11 (NIA vulvar) (Tabla 2).

Doce de los 13 casos VPH positivos (92.3%) tenían DNA de un solo tipo de alto riesgo. El único CI vaginal tenía una infección doble por un tipo de alto riesgo y un tipo de bajo riesgo (VPH 16 y VPH 59). La única NIA vulvar tenía el tipo de bajo riesgo VPH 11.

Tabla 2. Tipos virales en los 13 tumores no cervicales VPH positivos

Tipo de VPH	CI				NIA		Total
	Lengua	Pene	Vagina	Vulva	Vagina	Vulva	n (%)
16	0	0	2	1	3	0	6 (42.9)
45	0	0	2	0	0	0	2 (14.3)
59	0	1	1 ^a	0	0	0	2 (14.3)
33	0	0	1	0	0	0	1 (7.1)
35	1	0	0	0	0	0	1 (7.1)
54	0	0	1	0	0	0	1 (7.1)
11	0	0	0	0	0	1	1 (7.1)
Total	1	1	7	1	3	1	14 (100.0)

^a Este CI vaginal fue el único con infección doble por VPH 16 y 59.

IV. Tipos de VPH en carcinomas invasores del cérvix

Resumen

La oncogenicidad de los tipos de virus del papiloma humano (VPH) circulantes puede diferir sustancialmente de la de los tipos virales prevalentes en infecciones en la misma región. Determinamos la prevalencia de los tipos de VPH en neoplasias intraepiteliales de alto grado (NIA) y carcinomas invasores (CI) del cérvix para evaluar la oncogenicidad de los tipos virales en San Luis Potosí. El estudio incluyó 185 expedientes y 103 bloques de parafina de tumores diagnosticados en el Hospital Central Ignacio Morones Prieto entre 1999 y 2011. La presencia de VPH en el DNA extraído de los bloques fue determinada con el ensayo inmunoenzimático SPF10-DNA y los tipos virales con el arreglo lineal INNO-LiPA. Los tipos histológicos encontrados fueron: carcinoma epidermoide (70.3%), carcinoma adenoescamoso (16.9%) y adenocarcinoma (12.8%). El grupo de 31-60 años incluyó el 76% de los casos y el 74% de defunciones y pacientes en etapas terminales. El tejido tumoral fue confirmado en los 103 especímenes, 84 de los cuales fueron VPH positivos (81.6%) con 12 tipos de alto riesgo (VPH 16, 45, 51, 52, 31, 59, 18, 33, 35, 56, 58 y 73), dos de probable alto riesgo (VPH 66 y 53), tres de bajo riesgo (VPH 44, 11 y 70) y dos no clasificados (VPH 69/71 y VPH 74). Los tipos más prevalentes fueron VPH 16 (34.1%) y VPH 45 (15.9%). En 81 casos demostramos infecciones sencillas (58.3%), dobles (25.0%), triples (10.7%) y cuádruples (2.4%). Concluimos que el estadio clínico de la mayoría de los carcinomas del cérvix era avanzado, la mayoría de los carcinomas del cérvix tiene VPH, con un solo tipo viral en casi dos tercios de los casos. Los 19 tipos de VPH identificados incluyen 12 de alto riesgo, dos de probable alto riesgo y tres de bajo riesgo. Los tipos más prevalentes son VPH 16 y 45 y la vacuna contra VPH 16 y 18 pudo haber prevenido algo más de la mitad de los tumores VPH positivos.

Resultados

Tipos histológicos

Trece expedientes (7.0%) no especificaban el tipo histológico de los carcinomas. En los 172 expedientes restantes (93.0%) fueron registrados tres tipos histológicos: carcinoma epidermoide (n=121, 70.3%), carcinoma adenoescamoso (n=29, 16.9%) y adenocarcinoma (n=22, 12.8%) (Tabla 3).

Edad y estadio clínico al momento del diagnóstico

Para analizar la distribución de las edades al momento del diagnóstico se formaron grupos por decenios a partir de los 21 años (la edad más temprana) hasta los 60 años, y de 61 años o mayores. La edad al momento del diagnóstico no fue especificada en cinco casos (2.7%). La distribución en el resto de los casos quedó así: 21-30 años (n=7), 3.9%; 31-40 años (n=37), 20.6%; 41-50 años (n=59), 32.8%; 51-60 años (n=41), 22.8%; ≥61 años (n=36), 20.0% (Tabla 4).

No había datos del estadio clínico al momento del diagnóstico en dos casos (1.1%). La distribución en los 183 casos restantes (98.9%) fue la siguiente: carcinoma in situ (n=19), 10.4%; estadio IA (n=10), 5.5%: IA I (n=9), 4.9%, IA II (n=1), 0.5%; estadio IB (n=20), 10.9%: IB I (n=17), 9.3%, IB II (n=3), 1.6%; estadio IIA (n=1), 0.5%; estadio IIB (n=37), 20.2%; estadio IIIA (n=5), 2.7%; estadio IIIB (n=73), 39.9%; estadio IVA (n=10), 5.5%; estadio IVB (n=8), 4.4% (Tabla 5).

Defunciones vs edad y estadio clínico al momento del diagnóstico

Al revisar los expedientes, 88 pacientes (47.6%) no estaban en riesgo de muerte, en tanto que 97 (52.4%) habían muerto o se encontraban en etapas terminales.

Una defunción carecía del registro de la edad al momento del diagnóstico. La distribución de las 96 defunciones restantes por grupos de edad fue la siguiente: 21-30 años (n=3), 3.1%, 31-40 años (n=19), 19.8%, 41-50 años (n=30), 31.3%, 51-60 años (n=22), 22.9%, ≥61 años (n=22), 22.9% (Tabla 6).

Tabla 3. Tipos histológicos de los carcinomas cervicouterinos invasores

Tipo histológico	Casos	
	n	%
Sin datos	13	7.0
Epidermoide	121	65.4
Adenoescamoso	29	15.7
Adenocarcinoma	22	11.9
Total	185	100.0

Tabla 4. Edad al momento del diagnóstico

Grupo de edad (años)	Casos	
	n	%
Sin datos	5	2.7
21-30	7	3.8
31-40	37	20.0
41-50	59	31.9
51-60	41	22.2
≥61	36	19.5
Total	185	100.0

Tabla 5. Estadio clínico al momento del diagnóstico

Estadio	Casos	
	n	%
Sin datos	2	1.1
In situ	19	10.3
I AI	9	4.9
I AII	1	0.5
I BI	17	9.2
I BII	3	1.6
II A	1	0.5
II B	37	20.0
III A	5	2.7
III B	73	39.5
IV A	10	5.4
IV B	8	4.3
Total	185	100.0

Tabla 6. Defunciones vs. edad al momento del diagnóstico

Grupo de edad (años)	Todos los casos	Defunciones			
		No		Sí ^a	
		n	%	n	%
Sin datos	5	4	2.2	1	0.5
21-30	7	4	2.2	3	1.6
31-40	37	18	9.7	19	10.3
41-50	59	29	15.7	30	16.2
51-60	41	19	10.3	22	11.9
≥61	36	14	7.6	22	11.9
Total	185	88	47.6	97	52.4

Una defunción carecía de registro del estadio clínico al momento del diagnóstico. El estadio clínico inicial de las 96 defunciones restantes se distribuyó así: estadio IA1 (n=1), 1.0%; estadio IB1 (n=2), 2.1%; estadio IIA (n=1), 1.0%; estadio IIB (n=21), 21.9%; estadio IIIA (n=5), 5.2%; estadio IIIB (n=49), 51.0%; estadio IVA (n=9), 9.4%; estadio IVB (n=8), 8.3% (Tabla 7).

Enfermedades concomitantes

Además del CaCu invasor, 61 pacientes (33.0%) tenían registradas las siguientes enfermedades concomitantes: diabetes (n=28), 45.9%, hipertensión arterial (n=26), 42.6%, cáncer de ovario (n=4), 6.6%, VIH/SIDA (n=1), 1.6%, cáncer de páncreas (n=1), 1.6%, miomatosis uterina (n=1), 1.6% (Tabla 8).

Metástasis

En trece casos (7.0%) se detectaron metástasis, siendo la localización más frecuente la de pulmón (n=6, 46.2%), seguida de sitios no especificados (n=4, 30.8%) y una de hígado (n=1, 7.7%), cerebro (n=1, 7.7%) y hueso (n=1, 7.7%), respectivamente (Tabla 9).

Prevalencia del DNA de VPH

Bloques de parafina asignados al diagnóstico de VPH

La presencia de tejido tumoral fue confirmada en los 103 bloques de parafina de los cuales fue extraído el DNA para determinar la presencia de VPH.

De los bloques asignados al diagnóstico molecular, 84 (81.6%) fueron VPH positivos (Tabla 10).

Tabla 7. Defunciones vs. estadio clínico inicial

Estadio clínico	Defunciones			
	No		Sí ^a	
	n	%	N	%
Sin datos	1	0.5	1	0.5
In situ	19	10.3	0	0.0
I AI	8	4.3	1	0.5
I All	1	0.5	0	0.0
I BI	15	8.1	2	1.1
I BII	3	1.6	0	0.0
II A	0	0.0	1	0.5
II B	16	8.6	21	11.4
III A	0	0.0	5	2.7
III B	24	13.0	49	26.5
IV A	1	0.5	9	4.9
IV B	0	0.0	8	4.3
Total	88	47.6	97	52.4

Tabla 8. Enfermedades concomitantes

Enfermedad	Casos	
	n	%
Cáncer de ovario	4	6.6
Miomatosis	1	1.6
Diabetes	28	45.9
Hipertensión arterial	26	42.6
VIH/SIDA	1	1.6
Cáncer de páncreas	1	1.6
Total	61	100.0

Tabla 9. Localización de las metástasis detectadas

Localización	Casos	
	n	%
Hígado	1	7.7
Pulmón	6	46.2
Cerebro	1	7.7
Hueso	1	7.7
No especificada	4	30.8
Total	13	100.0

Tabla 10. Casos VPH positivos y negativos

VPH	Casos	
	n	%
Sí	84	81.5
No	19	18.4
Total	103	100

Tipos de VPH identificados

El ensayo INNO-LiPA identificó 19 tipos virales entre los casos VPH positivos: doce tipos de alto riesgo (VPH 16, 45, 51, 52, 31, 59, 18, 33, 35, 56, 58 y 73), dos de probable alto riesgo (VPH 66 y 53), tres de bajo riesgo (VPH 44, 11 y 70) y dos no clasificados (VPH 69/71 y VPH 74).

Los dos tipos más prevalentes fueron VPH 16 (n=43, 34.1%) y VPH 45 (n=20, 15.9%) (Tabla 11).

Tipos de VPH en las infecciones sencillas y múltiples

El tipo viral no pudo ser identificado en tres bloques VPH positivos (3.6%). En los 81 bloques restantes (96.4%) fueron identificadas infecciones sencillas (n=49, 58.3%), dobles (n=21, 25.0%), triples (n=9, 10.7%) y cuádruples (n=2, 2.4%) (Tabla 12).

Entre las 49 infecciones sencillas, 42 (85.7%) fueron por alguno de nueve tipos de alto riesgo (VPH 16, 45, 59, 18, 33, 35, 58, 51 y 52); tres (6.1%) por dos tipos de probable alto riesgo (VPH 66 y 53); tres (6.1%) por dos tipos no clasificados (VPH 69/71 y 74) y una (2.0%) por un tipo de bajo riesgo (VPH 70) (Tabla 13).

En las infecciones dobles la combinación más prevalente fue VPH 16-VPH 45 (n=7, 33.0%). VPH 16 fue el tipo más prevalente en las infecciones triples y fue identificado en las dos infecciones cuádruples (Tabla 14).

Tabla 11. Prevalencia de las infecciones sencillas y múltiples en los casos VPH positivos

Infecciones	Casos	
	n	%
Sencillas	49	60.5
Dobles	21	26
Triples	9	11
Cuádruples	2	2.5
Total	81	100

Tabla 12. Prevalencia de los 19 tipos de VPH identificados

Clasificación	Tipo de VPH	Infecciones	
		n	%
Alto riesgo (12 tipos)	VPH 16	43	34.1
	VPH 45	20	15.9
	VPH 51	7	5.6
	VPH 52	6	4.8
	VPH 31	5	4.0
	VPH 59	5	4.0
	VPH 18	4	3.2
	VPH 33	4	3.2
	VPH 35	4	3.2
	VPH 56	4	3.2
	VPH 58	4	3.2
	VPH 73	1	0.8
	Subtotal	107	84.9
Probable alto riesgo (2 tipos)	VPH 66	5	4.0
	VPH 53	2	1.6
	Subtotal	7	5.6
Bajo riesgo (3 tipos)	VPH 44	4	3.2
	VPH 11	1	0.8
	VPH 70	1	0.8
	Subtotal	6	4.8
No clasificados (2 tipos)	VPH 69/71	4	3.2
	VPH 74	2	1.6
	Subtotal	6	4.8
Total (19 tipos)		126	100.0

Tabla 13. Prevalencia de los tipos de VPH en las infecciones sencillas

Clasificación de los VPH	Tipo de VPH	Casos	
		n	%
Alto riesgo	VPH 16	24	49.0
	VPH 45	5	10.2
	VPH 59	3	6.1
	VPH 18	2	4.1
	VPH 33	2	4.1
	VPH 35	2	4.1
	VPH 58	2	4.1
	VPH 51	1	2.0
	VPH 52	1	2.0
	Subtotal	42	85.7
Probable alto riesgo	VPH 66	2	4.1
	VPH 53	1	2.0
	Subtotal	3	6.1
Bajo riesgo	VPH 70	1	2.0
	Subtotal	1	2.0
No clasificados	VPH 69/71	2	4.1
	VPH 74	1	2.0
	Subtotal	3	6.1
Total		49	100.0

Tabla 14. Prevalencia de los tipos de VPH en las infecciones múltiples

Infecciones	Tipos de VPH	Casos		
		n	Por grupo	Global
Dobles	16 + 45	7	33.3%	21.9%
	16 + 52	2	9.5%	6.3%
	16 + 33	1	4.8%	3.1%
	16 + 51	1	4.8%	3.1%
	16 + 58	1	4.8%	3.1%
	16 + 73	1	4.8%	3.1%
	45 + 51	1	4.8%	3.1%
	45 + 59	1	4.8%	3.1%
	45 + 69/71	1	4.8%	3.1%
	31 + 44	3	14.3%	9.4%
	56 + 52	1	4.8%	3.1%
	56 + 53	1	4.8%	3.1%
	Subtotal	21	100.0%	65.6%
Triples	16 + 11 + 18	1	11.1%	3.1%
	16 + 31 + 45	1	11.1%	3.1%
	16 + 35 + 45	1	11.1%	3.1%
	16 + 51 + 66	1	11.1%	3.1%
	31 + 35 + 44	1	11.1%	3.1%
	45 + 51 + 58	1	11.1%	3.1%
	45 + 51 + 59	1	11.1%	3.1%
	52 + 56 + 66	2	22.2%	6.3%
	Subtotal	9	100.0%	28.1%
Cuádruples	16 + 18 + 45 + 74	1	50.0%	3.1%
	16 + 33 + 51 + 69/71	1	50.0%	3.1%
	Subtotal	2	100.0%	6.3%
Total	32	100.0%	100.0%	

IV. Discusión

Este es el primer estudio realizado en el estado de San Luis Potosí para la detección e identificación del DNA de los tipos de VPH en bloques de parafina de carcinomas del cérvix y de sitios distintos al cérvix (vagina, vulva, pene, ano y cavidad oral). Antes sólo se había determinado la prevalencia de los tipos de VPH en infecciones del cérvix.

La selección de muestras con la técnica de sándwich empleada garantiza la presencia de tejido tumoral no necrosado en los cortes analizados. Este punto crítico demanda personal calificado en el diagnóstico que garantice la homogeneidad de los criterios de inclusión y minimice la variación inter-observador asociada al diagnóstico microscópico.

Como los VPH no pueden propagarse en células en cultivo y las pruebas serológicas no son suficientemente sensibles, el diagnóstico de la infección por VPH se basa en la detección del genoma del DNA viral. La gran diversidad de genotipos virales requiere que la detección sea tipo específica o de amplio espectro. Ambas técnicas están disponibles actualmente, aunque la detección tipo específica puede incluir un gran número de reacciones de PCR para cada muestra clínica individual y es impráctica para el diagnóstico de rutina.

Diversos grupos de oligonucleótidos de amplio espectro permiten la detección de múltiples tipos de VPH en una sola mezcla de PCR (Jenkins et al. 1991; Manos 1989; Tieben et al. 1993; van den Brule et al. 1990). Sin embargo, ninguno de los oligonucleótidos disponibles es capaz de detectar efectivamente todos los genotipos de VPH anogenitales (Qu et al. 1997; Smits 1996). Diversos estudios han demostrado que la prevalencia general de VPH puede ser subestimada considerablemente si se usa un solo método de detección de DNA (Baay et al. 1996; Karlsen et al. 1996; Smits 1996; Smits et al. 1995).

Los sistemas universales de detección de VPH basados en el ORF L1 utilizan oligonucleótidos degenerados (MY11/09) u oligonucleótidos consenso (GP5+/6+) (de Roda Husman et al. 1995; Manos 1989). En contraste, el sistema SPF emplea una mezcla de oligonucleótidos definidos para las regiones blanco

dentro del gen L1 y, como la heterogeneidad de los sitios blanco es limitada, la mezcla de estos oligonucleótidos puede ser más específica para la detección del DNA viral que los oligonucleótidos consenso o degenerados.

La sensibilidad de la detección de DNA por PCR está relacionada inversamente con el tamaño del amplicón. La importancia de los amplicones pequeños ha sido demostrada para la detección del virus de la hepatitis C (Garson et al. 1991). Más aún, como la eficiencia de la PCR también depende de la calidad del DNA extraído de especímenes clínicos, la detección con amplicones pequeños es ventajosa, especialmente cuando se usan materiales que han sido incluidos en parafina y fijados con formaldehído (Baay et al. 1996; Ohara et al. 1992).

El ensayo SPF10-DEIA-INNOliPA utilizado en este trabajo es altamente sensible y específico para la detección y tipificación de DNA de VPH. Como la fijación y manipulación de los cortes histológicos daña el DNA y evita la generación de amplicones más largos (Kleter et al. 1998; Melchers et al. 1999) se ha utilizado en varios estudios multicéntricos (de Sanjose et al. 2013; de Sanjose et al. 2010) porque genera amplicones virales de 65 pares de bases.

Carcinomas no cervicales

Cada vez es más reconocido el papel de los VPH como agentes etiológicos de cánceres del tracto anogenital y una fracción de los cánceres de cabeza y cuello.

La presencia de tejido tumoral en los casos de neoplasias no cervicales fue confirmada por nosotros en 63 de los 67 bloques de parafina originales y el estudio incluyó sólo 39 casos con diagnóstico final de NIA o CI, porque los diagnósticos iniciales cambiaron de NIA a NIB en 24 casos. Los diagnósticos iniciales y finales coincidieron en los 35 casos incluidos, en tanto que 24 de los 28 casos NIA iniciales cambiaron a NIB y fueron excluidos. Debido a que las lesiones epiteliales escamosas vaginales premalignas se clasifican como de grado 1 (NIB), grado 2 y grado 3 —estos dos últimos sinónimos de NIA— (Tavassoli and Devilee 2003), la discordancia diagnóstica pareció resultar de haber incluido lesiones de grado 2 y 3 en los diagnósticos iniciales y lesiones de grado 3 en los diagnósticos finales. Por otro lado, la exclusión de 24 casos NIA iniciales (22 de la vagina)

mejoró la calidad del estudio. Los criterios diagnósticos más estrictos del Laboratorio Patología de Referencia del ICO para lesiones neoplásicas preinvasoras dieron lugar a la inclusión de todos los CI, pero sólo el 14.3% de los NIA diagnosticados inicialmente.

Los casos de NIB fueron excluidos porque las infecciones por VPH desaparecen espontáneamente en la mayoría de ellos, pero persisten en NIA y CI (Smith et al. 2007). La mayoría de los casos incluidos fueron CI (89.7%) con las siguientes localizaciones anatómicas: 48.7% en la cavidad oral (23.1% laringe, lengua 15.4%, 5.1% paladar, mandíbula 2.6%, faringe 2.6%); 41.0% en los genitales masculinos y femeninos (pene 20.5%, 17.9% vagina, vulva 2.6%). Los casos de NIA incluidos se localizaron en los genitales femeninos (10.3%): vagina (7.7%) y vulva (2.6%).

Identificamos siete tipos virales en los casos VPH positivos: cinco de alto riesgo (VPH 16, 45, 59, 33 y 35), y dos de bajo riesgo (VPH 11 en una NIA vulvar y VPH 54 en un CI vaginal). Infecciones con sólo un tipo de VPH de bajo riesgo fueron encontradas en CI vulvar (VPH 6, 26 o 61) por Sutton et al. (Sutton et al. 2008), y en NIA y CI anal y perineal (VPH 6 y 11) por Cornall et al. (2013).

El tipo viral más frecuentemente identificado fue VPH 16 (46.1%), seguido por VPH 45 y 59 (15.4% cada uno). Estos datos son consistentes con el señalamiento de que VPH 16 es el tipo más frecuente en carcinomas vulvares, anales, vaginales y orales (De Vuyst et al. 2009; Kreimer et al. 2005).

Identificamos VPH 35 en el único CI oral a pesar de que VPH 18 se asocia a menudo con carcinomas no cervicales (IARC 2007) y VPH 16 es el más prevalente en carcinomas orales (D'Souza et al. 2007).

Detectamos un solo tipo viral en 12 de los 13 tumores VPH positivos (92.3%), y dos tipos en el tumor restante. Este hallazgo sugiere que la mayoría de las infecciones por un tipo de VPH están ligadas al desarrollo de tumores y concuerdan con un estudio multicéntrico que demostró infecciones individuales en 93% de los carcinomas VPH positivos cervicales y no cervicales (de Sanjose et al. 2010).

El pequeño tamaño de la muestra, derivado de la baja prevalencia de los carcinomas no cervicales, es una obvia limitación de este estudio que incluye los tumores no cervicales diagnosticados a lo largo de más de una década en un hospital mexicano relativamente grande, identifica los tumores VPH positivos y los tipos virales a los que pueden ser atribuidos y permite calcular cuáles podrían haberse prevenido mediante vacunación contra VPH.

La mayoría de los casos incluidos fueron CI (89.7%) con las siguientes localizaciones anatómicas: 48.7% en la cavidad oral (23.1% laringe, lengua 15.4%, 5.1% paladar, mandíbula 2.6%, faringe 2.6%); 41.0% en los genitales masculinos y femeninos (pene 20.5%, 17.9% vagina, vulva 2.6%). Los casos de NIA incluidos se localizaron en los genitales femeninos (10.3%): vagina (7.7%) y vulva (2.6%).

Sólo 13 (un tercio) de los casos incluidos fueron VPH positivos. Nueve CI: (seis de la vagina, uno de la vulva, uno del pene y uno de la cavidad oral) y cuatro NIA (tres de la vagina y uno de la vulva). Estos resultados son consistentes con los de varios estudios multicéntricos; Kreimer et al. (2005) encontraron una prevalencia de VPH alrededor del 25% en los carcinomas de cabeza y cuello, De Vuyst et al. (2009) encontraron prevalencias de 85.3% para CI y 40.4% para NIA en la vulva y del 90.1% para CI y 69.9% para NIA en la vagina, y Van Aar et al. (2013) de 16 a 32% en los carcinomas de pene.

Demostramos que el tipo más prevalente es VPH 16 (46.1%), seguido por VPH 45 y 59 (15.4% cada uno). Estos datos son consistentes con el señalamiento de que VPH 16 es el tipo más frecuente en carcinomas vulvares, anales, vaginales y orales (De Vuyst et al. 2009; Kreimer et al. 2005).

Suponiendo que las vacunas bivalente, cuadrivalente y nonavalente contra VPH inducen protección completa sólo contra los tipos virales a los que se dirigen, las vacunas bivalente y tetraivalente podrían haber evitado siete tumores (~54%) y la nonavalente 11 tumores (~85%), en su mayoría vaginales y vulvares.

Carcinomas cervicales

Un trabajo reciente de nuestro grupo demostró que VPH 33 es el tipo más prevalente en las infecciones del cérvix entre mujeres que acuden a las clínicas de

colposcopia del estado de San Luís Potosí (DelaRosa-Martinez et al. 2016). Sin embargo, los resultados del presente estudio indican que VPH 16 es el tipo más prevalente entre los 84 casos de carcinomas invasores de cérvix VPH positivos analizados y que VPH 33 sólo estuvo asociado a cuatro de ellos.

Entre los 19 genotipos de VPH que identificamos en los carcinomas invasores del cérvix 12 fueron de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 73), dos de probable alto riesgo (VPH 53 y 66), tres de bajo riesgo (VPH 11, 44 y 70) y dos no tienen una clasificación definida (VPH 69/71 y VPH 74). Además, identificamos una infección única por VPH 70, clasificado como de bajo riesgo.

El tipo histopatológico más frecuente fue el carcinoma epidermoide seguido de carcinoma adenoescamoso y adenocarcinoma. Estos datos coinciden con los de reportes previos para la población mexicana (Tirado-Gomez et al. 2005). En la población venezolana se ha descrito el predominio de carcinoma epidermoide seguido de adenocarcinoma (Suárez et al. 2006), pero también se ha reportado que el carcinoma escamoso es el de mayor prevalencia seguido del adenocarcinoma (Sanchez et al. 2016). Tirado et al. (2005) y Suárez et al. (2006) encontraron que el carcinoma adenoescamoso es el menos prevalente, con porcentajes similares (2.8% y 2.3%, respectivamente), pero en nuestro estudio el menos prevalente es el adenocarcinoma (11.9% del total).

En cuanto a la edad de las pacientes, la mayoría de los casos ocurrió en mujeres de 40 años o mayores, lo cual coincide con los datos reportados globalmente. De igual manera, los estadios clínicos avanzados al momento del diagnóstico fueron los más prevalentes como ocurre en la población latinoamericana, donde el 83.4% de los casos de CaCu analizados entre 2004 y 2005 fueron de estadios avanzados (Suárez et al. 2006). Este hallazgo es consistente con la idea de que la menor supervivencia de las mujeres latinoamericanas con CaCu se debe principalmente al diagnóstico tardío (Palacio-Mejia et al. 2003).

Aunque la diabetes tipo II fue la enfermedad concomitante más prevalente, no contamos con información suficiente para determinar si influye directamente en

la progresión de la infección por VPH al cáncer invasor. Aunque no todos los expedientes contaban con datos de metástasis, su presencia confirma que los diagnósticos se realizan tardíamente.

En los casos VPH positivos identificamos 19 tipos virales. Doce de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 73). Dos de probable alto riesgo (VPH 53 y 66). Tres de bajo riesgo (VPH 11, 44 y 70). Dos no clasificados (VPH 69/71 y VPH 74). Los más frecuentes son VPH 16, 45 y 51. Entre las 84 infecciones, 49 son únicas 21 dobles 11 triples y dos cuádruples. Entre las infecciones únicas, 85.6% son por tipos virales de alto riesgo, 6.1% por tipos de probable alto riesgo, 6.1% por tipos no clasificados y sólo el 2.0% por tipos de bajo riesgo. El tipo más prevalente es VPH 16, como en otros trabajos en México (Berumen et al. 2001; Hernandez-Hernandez et al. 2002; Torres Lobaton et al. 2013; Torroella-Kouri et al. 1998) y en otros países (Clifford et al. 2003; Franco et al. 1999; Moberg et al. 2005; Munoz 2000).

Entre las infecciones dobles el 61.9% es por VPH 16 y el 47.6% por VPH 45. La infección doble más frecuente es VPH 16+45 (33.3%). Entre las nueve infecciones triples el 44.4% es por VPH 16 o 45. En las dos infecciones cuádruples hay VPH 16. La asociación VPH 16+45 en las infecciones dobles contrasta con la más frecuente asociación VPH 16+18 encontrada por Sánchez et al. (2016).

Como la mayoría de los casos de CaCu corresponden a estadios clínicos avanzados y más de la mitad de las mujeres diagnosticadas sigue muriendo, es necesario hacer el diagnóstico oportuno de la enfermedad y llevar a cabo la vacunación profiláctica, pues las vacunas bivalente y tetravalente podrían haber prevenido al menos el 50% y la nonavalente el 84% de los tumores VPH positivos.

V. Referencias

- Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Stolz E, Herbrink P (1996) Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 34:745-7
- Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A (2001) Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93:1325-30
- Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsague X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M, de Sanjose S, authors of ICOMCCoHPVI, Related Diseases Vaccine Volume S (2013) Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 31 Suppl 7:H1-31
- Bosch FX, Cuzick J, Schiller JT, Garnett GP, Meheus A, Franco EL, Wright TC (2008) Prevention of Cervical Cancer: Progress and Challenges on HPV Vaccination and Screening. *Vaccine* 26: K1-K94
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87:796-802
- Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ (2007) HPV detection methods. *Dis Markers* 23:273-81
- Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, de Sanjose S, Castellsague X (2016) Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *Lancet Glob Health* 4:e453-63
- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N (2002) Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89:191-9
- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N (2003) The male role in cervical cancer. *Salud Publica Mex* 45 Suppl 3:S345-53
- Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study G (2006) Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 98:303-15
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S (2003) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88:63-73

- Cornall AM, Roberts JM, Garland SM, Hillman RJ, Grulich AE, Tabrizi SN (2013) Anal and perianal squamous carcinomas and high-grade intraepithelial lesions exclusively associated with "low-risk" HPV genotypes 6 and 11. *Int J Cancer* 133:2253-8
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU (1995) Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 69:3074-83
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356:1944-56
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76 (Pt 4):1057-62
- de Sanjose S, Alemany L, Ordi J, Tous S, Alejo M, Bigby SM, Joura EA, Maldonado P, Laco J, Bravo IG, Vidal A, Guimera N, Cross P, Wain GV, Petry KU, Mariani L, Bergeron C, Mandys V, Sica AR, Felix A, Usubutun A, Seoud M, Hernandez-Suarez G, Nowakowski AM, Wilson G, Dalstein V, Hampl M, Kasamatsu ES, Lombardi LE, Tinoco L, Alvarado-Cabrero I, Perrotta M, Bhatla N, Agorastos T, Lynch CF, Goodman MT, Shin HR, Viarheichyk H, Jach R, Cruz MO, Velasco J, Molina C, Bornstein J, Ferrera A, Domingo EJ, Chou CY, Banjo AF, Castellsague X, Pawlita M, Lloveras B, Quint WG, Munoz N, Bosch FX, group HVs (2013) Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer* 49:3450-61
- de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menendez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andujar M, Castellsague X, Sanchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Munoz N, Bosch FX, Retrospective International S, Group HPVTTTS (2010) Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 11:1048-56
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27
- De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S (2009) Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer* 124:1626-36

- DelaRosa-Martinez R, Sanchez-Garza M, Lopez-Revilla R (2016) HPV genotype distribution and anomalous association of HPV33 to cervical neoplastic lesions in San Luis Potosi, Mexico. *Infect Agent Cancer* 11:16
- Duenas-Gonzalez A, Cetina L, Coronel J, Martinez-Banos D (2010) Pharmacotherapy options for locally advanced and advanced cervical cancer. *Drugs* 70:403-32
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-E386
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE (1999) Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 180:1415-23
- Garson JA, Ring CJ, Tuke PW (1991) Improvement of HCV genome detection with "short" PCR products. *Lancet* 338:1466-7
- Gomez-Dantes H, Lamadrid-Figueroa H, Cahuana-Hurtado L, Silverman-Retana O, Montero P, Gonzalez-Robledo MC, Fitzmaurice C, Pain A, Allen C, Dicker DJ, Hamavid H, Lopez A, Murray C, Naghavi M, Lozano R (2016) The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud Publica Mex* 58:118-31
- Hernandez-Hernandez DM, Garcia-Carranca A, Guido-Jimenez MC, Gonzalez-Sanchez JL, Cruz-Talonia F, Apresa-Garcia T, Martinez-Elizondo OA, Ornelas-Bernal L, Alvarado-Cabrera I, Munoz S (2002) [High-risk human papilloma virus and cervical intraepithelial neoplasia in women at 2 hospitals in Mexico City]. *Rev Invest Clin* 54:299-306
- IARC (2007) Human Papillomaviruses. WHO, Lyon, France
- IARC (2012) A review of human carcinogens. Part B: biological agents. WHO, Lyon, France
- Jenkins A, Kristiansen BE, Ask E, Oskarsen B, Kristiansen E, Lindqvist B, Trope C, Kjorstad K (1991) Detection of genital papillomavirus types by polymerase chain reaction using common primers. *APMIS* 99:667-73
- Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J (2007) Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet* 369:1693-702
- Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, Johansson B, Hagmar B (1996) Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 34:2095-100
- Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, Lindeman J, ter Harmsel B, Burger M, Quint W (1999) Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 37:2508-17

- Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, ter Harmsel B, Quint W (1998) Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* 153:1731-9
- Koutsky LA, Harper DM (2006) Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/114-21
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:467-75
- Kuzman M, Simetin IP, Fanelic IP (2007) Early sexual intercourse and risk factors in Croatian adolescents. *Coll Antropol* 31 Suppl 2:121-30
- Lomelí-Forcada A, Sánchez-Garza MG, Zamora-Ramírez MJ, L. R-O, Ortiz-Valdez J, Oros C, López-Revilla R (2005) Las lesiones del cérvix son más severas y frecuentes en la ciudad de San Luis Potosí que en la Zona Media y el Altiplano del estado. X Foro Regional de Investigación en Salud de la Dirección Regional Norte del Instituto Mexicano del Seguro Social., San Luis Potosí, S.L.P.
- Lopez-Revilla R, Martinez-Contreras LA, Sanchez-Garza M (2008) Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infect Agent Cancer* 3:3
- Manos MM, Ting, Y., Wright, D. K., Lewis, A. J., Broker, T. R. & Wollinsky, S. M. (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 7:209-214
- Melchers WJ, Bakkens JM, Wang J, de Wilde PC, Boonstra H, Quint WG, Hanselaar AG (1999) Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papillomavirus types. *Clinical evaluation and follow-up. Am J Pathol* 155:1473-8
- Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U (2005) High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 92:891-4
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78:11451-60
- Munoz N (2000) Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19:1-5
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study G (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-27
- Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/1-10
- Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX, International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study G (2002) Role of parity and human

- papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1093-101
- Ohara Y, Honma M, Iwasaki Y (1992) Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting human T-cell leukemia virus type I sequences in paraffin-embedded tissue. Effect of unbuffered formalin fixation. *J Virol Methods* 37:83-8
- Palacio-Mejia LS, Rangel-Gomez G, Hernandez-Avila M, Lazcano-Ponce E (2003) Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Publica Mex* 45 Suppl 3:S315-25
- Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F (2009) Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 105:107-8
- Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S (2016) Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a review and synthetic analysis. *Lancet Glob Health* 4: e609–16
- Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, Burk RD (1997) PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 35:1304-10
- Roden R, Wu TC (2006) How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 6:753-63
- Sanchez-Barriga JJ (2012) [Mortality trends from cervical cancer in the seven socioeconomic regions and the thirty two federative entities of Mexico, 2000-2008]. *Gac Med Mex* 148:42-51
- Sanchez GI, Bravo LE, Hernandez-Suarez G, Tous S, Alemany L, de Sanjose S, Bosch FX, Munoz N (2016) Secular trends of HPV genotypes in invasive cervical cancer in Cali, Colombia 1950-1999. *Cancer Epidemiol* 40:173-8
- Schiller JT, Lowy DR (2006) Prospects for cervical cancer prevention by human papillomavirus vaccination. *Cancer Res* 66:10229-32
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A (2014) Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64:9-29
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM (2007) Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 121:621-32
- Smits HL (1996) The use of consensus PCR and direct sequence analysis for the identification of HPV. *Methods Mol Biol* 50:109-26
- Smits HL, van Gemen B, Schukkink R, van der Velden J, Tjong AHSP, Jebbink MF, ter Schegget J (1995) Application of the NASBA nucleic acid amplification method for the detection of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcripts. *J Virol Methods* 54:75-81
- Suárez CM, Mijares Briñez A, Castillo Marrero L, Briceño JM (2006) Tipificación del VPH en cáncer de cuello uterino en la población venezolana. *Rev Ven Oncol* 18:221-225
- Sutton BC, Allen RA, Moore WE, Dunn ST (2008) Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. *Mod Pathol* 21:345-54
- Tavassoli FA, Devilee P (2003) Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC, Lyon, France

- Tieben LM, ter Schegget J, Minnaar RP, Bouwes Bavinck JN, Berkhout RJ, Vermeer BJ, Jebbink MF, Smits HL (1993) Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods* 42:265-79
- Tirado-Gomez LL, Mohar-Betancourt A, Lopez-Cervantes M, Garcia-Carranca A, Franco-Marina F, Borges G (2005) [Risk factors in invasive cervical cancer among Mexican women]. *Salud Publica Mex* 47:342-50
- Torres Lobaton A, Bustamante Iglesias JI, Torres Rojo A, Oliva Posada JC, Morales Palomares MA, Roman Bassaure E (2013) [Cervical cancer. Epidemiological profile in 1,217 patients. Seguro popular]. *Ginecol Obstet Mex* 81:71-6
- Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV (1998) HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 70:115-20
- van Aar F, Mooij SH, van der Sande MA, Speksnijder AG, Stolte IG, Meijer CJ, Verhagen DW, King AJ, de Vries HJ, Schim van der Loeff MF (2013) Anal and penile high-risk human papillomavirus prevalence in HIV-negative and HIV-infected MSM. *AIDS* 27:2921-31
- van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM (1990) Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28:2739-43
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-9

VI. Apéndices

Constancia de tutoría durante la estancia de la autora en el Instituto Catalán de Oncología



Av. Gran Via, s/n Km 2,7
08907 L'Hospitalet - Barcelona
Tels. 93 260 77 33 / 93 335 70 11
Fax 93 260 77 83
www.iconcologia.net

Cancer Epidemiology Research Program (CERP)
Unit of Infections & Cancer (UNIC)
Catalan Institute of Oncology

Barcelona, 1 de Octubre de 2009

PARA Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

A QUIEN PUEDA INTERESAR

Con la presente yo, Silvia de Sanjosé Llongueras, Jefe de la Unidad de Infecciones y Cáncer del Instituto Catalán de Oncología ubicado en Barcelona, España, confirmo que desarrollaré las actividades de tutora de **Claudia Magaña-León**, doctorante en la División de Biología Molecular del IPICYT, de San Luis Potosí, México. El proyecto en el cual realizará sus actividades en España es de Genotipado del Virus de Papiloma Humano en muestras de cáncer de cavidad oral. Dichas actividades han sido planteadas en común acuerdo entre la doctorante, su tutor en México y nuestro equipo en España. La estancia de Dña Claudia se prevé para un periodo de seis meses, del 1 de marzo de 2010 al 31 de agosto de 2010. Esperamos que dicha estancia permita iniciar una fructífera colaboración a largo plazo entre ambos grupos de investigación.

Quedando a su disposición para cualquier información al respecto.

Atentamente

Silvia de Sanjosé, M.D., PhD.
Unit of Infections and Cancer (UNIC)
Cancer Epidemiology Research Programme
Institut Català d' Oncologia, IDIBELL, CIBERESP
Gran Via km 2,7
08907 L' Hospitalet de LL., Barcelona
Spain
Tel. (34) 93 2607812
Fax (34) 93 2607787
Email: s.sanjose@iconcologia.net

Servei d'Epidemiologia
i Registre del Càncer
Av. Gran Via, s/n. km. 2,7
08907 L'Hospitalet de Llobregat
BARCELONA (SPAIN)
Tel. 34 932 607 128 - Fax 34 932 607 787

Publicaciones resultantes del estudio

de Sanjosé et al. (2013) Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *European Journal of Cancer* 2013:3450-3461

European Journal of Cancer (2013) 49, 3450-3461



Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva

Silvia de Sanjosé^{a,b,*}, Laia Alemany^{a,b}, Jaume Ordi^c, Sara Tous^a, Maria Alejo^d, Susan M. Bigby^e, Elmar Armin Joura^f, Paula Maldonado^g, Jan Laco^h, Ignacio G. Bravo^a, August Vidalⁱ, Núria Guimerà^j, Paul Cross^k, Gerard V. Wain^l, Karl Ulrich Petry^m, Luciano Marianiⁿ, Christine Bergeron^o, Václav Mandys^p, Adela Rosa Sica^q, Ana Félix^r, Alp Usubutun^s, Muhieddine Seoud^t, Gustavo Hernández-Suárez^u, Andrzej Marcin Nowakowski^v, Godfrey Wilson^w, Veronique Dalstein^x, Monika Hampel^y, Elena Sachiko Kasamatsu^z, Luis Estuardo Lombardi^{aa}, Leopoldo Tinoco^{ab}, Isabel Alvarado-Cabrero^{ac}, Myriam Perrotta^{ad}, Neerja Bhatla^{ae}, Theodoros Agorastos^{af}, Charles F. Lynch^{ag}, Marc T. Goodman^{ah}, Hai-Rim Shin^{ai,aj}, Halina Viarheichyk^{ak}, Robert Jach^{al}, M.O.L. Eugenia Cruz^{am}, Julio Velasco^{an}, Carla Molina^{ao}, Jacob Bornstein^{ap}, Annabelle Ferrera^{aq}, Efren Javier Domingo^{ar}, Chou Cheng-Yang^{as}, Adekunbiola F. Banjo^{at}, Xavier Castellsagué^a, Michael Pawlita^{au}, Belén Lloveras^{av}, Wim G.V. Quint^j, Nubia Muñoz^{aw}, F. Xavier Bosch^a, on behalf of the HPV VVAP study group^l

Mexico: Isabel Alvarado-Cabrero (Instituto Mexicano del Seguro Social); Rubén López-Revilla, Claudia Magaña-León (Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, AC); Cuauhtémoc Oros (Hospital Central Ignacio Morones Prieto, San Luis Potosí).

Alemaný et al. (2014) Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: a worldwide study in 597 samples. European Journal of Cancer 50:2846-2854

European Journal of Cancer (2014) 50, 2846–2854



Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.ejcancer.com



Original Research

Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: A worldwide study in 597 samples



L. Alemany^{a,b,1,*}, M. Saunier^{a,1}, L. Tinoco^c, B. Quirós^a,
I. Alvarado-Cabrero^d, M. Alejo^{a,c}, E.A. Joura^f, P. Maldonado^g, J. Klaustermeier^{a,b},
J. Salmerón^d, C. Bergeron^h, K.U. Petryⁱ, N. Guimerà^j, O. Clavero^a, R. Murillo^k,
C. Clavel^{l,m}, V. Wainⁿ, D.T. Geraets^j, R. Jach^o, P. Cross^p, C. Carrilho^q, C. Molina^r,
H.R. Shin^s, V. Mandys^t, A.M. Nowakowski^u, A. Vidal^v, L. Lombardi^w,
H. Kitchener^x, A.R. Sica^y, C. Magaña-León^z, M. Pawlita^{aa}, W. Quintⁱ, I.G. Bravo^a,
N. Muñoz^{ab}, S. de Sanjosé^{a,b}, F.X. Bosch^a, on behalf of the HPV VVAP study group

Magaña-León et al. (2015) Human papillomavirus types in non-cervical high-grade intraepithelial neoplasias and invasive carcinomas from San Luis Potosí, Mexico: a retrospective cross-sectional study. Infectious Agents and Cancer 10:33.

Magaña-León et al. *Infectious Agents and Cancer* (2015) 10:33
DOI 10.1186/s13027-015-0027-8



RESEARCH ARTICLE

Open Access



Human papillomavirus types in non-cervical high-grade intraepithelial neoplasias and invasive carcinomas from San Luis Potosí, Mexico: a retrospective cross-sectional study

Claudia Magaña-León¹, Cuauhtémoc Oros² and Rubén López-Revilla^{1*}

Abstract

Background: Viral infections and the burden of high-grade intraepithelial neoplasias (HIN) and invasive carcinomas (IC) associated to infections by human papillomavirus (HPV) types may be prevented by type-specific anti-HPV vaccines. This study determined the prevalence of HPV types in non-cervical HIN and IC diagnosed from 1999 to 2011 at a general hospital in San Luis Potosí, Mexico.

Methods: Review of the 67 formaldehyde-fixed paraffin-embedded non-cervical specimens initially diagnosed as HIN ($n = 28$) or IC ($n = 39$) confirmed the presence of tumor tissue in 63 of them and changed the diagnosis of 24 from HIN to low-grade intraepithelial neoplasias, that were excluded from the study. HPV DNA was detected with the SPF10-DNA enzyme immunoassay in the 39 cases included, and viral types in the HPV-positive tumors were identified with the INNO-LIPA linear probe array.

Results: Among the cases included, four HIN were located in the vagina ($n = 3$) and vulva ($n = 1$), and 35 IC in the oral cavity ($n = 19$), penis ($n = 8$), vagina ($n = 7$) and vulva ($n = 1$). There were 13 HPV-positive cases from the vagina ($n = 7$), vulva ($n = 1$), penis ($n = 1$) and oral cavity ($n = 1$). The viral types identified were the high-risk types HPV16 in the vagina ($n = 3$) and vulva ($n = 3$), HPV45 in the vagina ($n = 2$), HPV59 in the vagina ($n = 1$) and penis ($n = 1$), HPV33 in the vagina ($n = 1$), and HPV35 in the tongue ($n = 1$); and the low-risk types HPV54 in the vagina ($n = 1$), and HPV11 in the vulva ($n = 1$).

Conclusions: Five high-risk viral types (HPV16, 45, 59, 33 and 35) and two low-risk types (HPV11 and 54) infect one third of the non-cervical HIN and IC included. Most infections are by a single HPV high-risk type, the most prevalent one being HPV16. Vagina is the most frequent location of the HPV-positive tumors. Vaccination against HPV16 and HPV18 could have prevented around half of the HPV-positive tumors.

Keywords: HPV, Non-cervical carcinomas, SPF10, INNO-LIPA

Alemany et al. (2016) Role of human papillomavirus in penile carcinomas worldwide. *European Urology* 69:953-961

EUROPEAN UROLOGY 69 (2016) 953–961

available at www.sciencedirect.com
journal homepage: www.europeanurology.com



Penile Cancer

Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide

Laia Alemany^{a,b,}, Antonio Cubilla^c, Gordana Halec^d, Elena Kasamatsu^c, Beatriz Quirós^a, Emili Masferrer^e, Sara Tous^a, Belén Lloveras^e, Gustavo Hernández-Suarez^f, Ray Lonsdale^g, Leopoldo Tinoco^h, Maria Alejoⁱ, Isabel Alvarado-Cabrero^j, Jan Laco^k, Nuria Guimerà^l, Enrique Poblet^m, Luis E. Lombardiⁿ, Christine Bergeron^o, Omar Clavero^a, Hai-Rim Shin^p, Annabelle Ferrera^q, Ana Felix^r, Julieta Germar^s, Vaclav Mandys^t, Christine Clavel^u, Maria Tzardi^v, Luis E. Pons^w, Vincent Wain^x, Eugenia Cruz^y, Carla Molina^z, Jose D. Mota^{aa}, Robert Jach^{bb}, Julio Velasco^{cc}, Carla Carrilho^{dd}, Ruben López-Revilla^{ee}, Marc T. Goodman^{ff,gg}, Wim G. Quint^l, Xavier Castellsagué^u, Ignacio Bravo^a, Michael Pawlita^d, Nubia Muñoz^{hh}, F. Xavier Bosch^a, Silvia de Sanjosé^{u,b}*
on behalf of the HPV VVAP study group

Castellsagué et al. (2016) HPV involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients. Journal of the National Cancer Institute 108 (6): djv403



JNCI J Natl Cancer Inst (2016) 108(6): djv403

doi:10.1093/jnci/djv403

First published online January 28, 2016

Article

ARTICLE

HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients

Xavier Castellsagué*, Laia Alemany[†], Miquel Quer, Gordana Halec, Beatriz Quirós, Sara Tous, Omar Clavero, Llúcia Alòs, Thorsten Biegner, Tomasz Szafarowski, Maria Alejo, Dana Holzinger, Enrique Cadena, Edith Claros, Gillian Hall, Jan Laco, Mario Poljak, Maria Benevolo, Elena Kasamatsu, Hisham Mehanna, Cathy Ndiaye, Núria Guimerà, Belen Lloveras, Xavier León, Juan C. Ruiz-Cabezas, Isabel Alvarado-Cabrero, Chang-Suk Kang, Jin-Kyoung Oh, Marcial Garcia-Rojo, Ermina Iljazovic, Oluseyi F. Ajayi, Flora Duarte, Ashrafun Nessa, Leopoldo Tinoco, Marco A. Duran-Padilla, Edyta C. Pirog, Halina Viarheichyk, Hesler Morales, Valérie Costes, Ana Félix, Maria Julieta V. Germar, Marisa Mena, Arzu Ruacan, Asha Jain, Ravi Mehrotra, Marc T. Goodman, Luis Estuardo Lombardi, Annabelle Ferrera, Sani Malami, Estela I. Albanesi, Pablo Dabed, Carla Molina, Rubén López-Revilla, Václav Mandys, Manuel E. González, Julio Velasco, Ignacio G. Bravo, Wim Quint, Michael Pawlita, Nubia Muñoz, Silvia de Sanjosé, F. Xavier Bosch; on behalf of the ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group[†].