

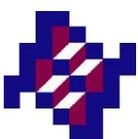


**Metilación del genoma de VPH16 y 18 como predictor de Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto grado en mujeres VPHar positivas**



**Rubí Gisela Hernández López**

**Febrero de 2015**



# **INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA**

## **ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**

**Metilación del genoma de VPH16 y 18 como predictor de  
Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto grado en mujeres VPHar  
positivas**

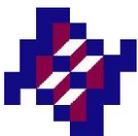
**Propuesta de artículo para obtener el grado de Maestra en  
Ciencias de la Salud con Área de Concentración en  
Epidemiología Clínica**

**Rubí Gisela Hernández López**

**Director  
Dr. Mauricio Hernández Ávila**

**Asesores  
Dr. Attila T. Lorincz  
MC. Leticia Torres**

**Febrero de 2015**



## Propuesta de artículo:

# Metilación del genoma de VPH16/18/33/31 como predictor de Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto grado en mujeres VPH positivas

Rubí Hernández,<sup>1, 2</sup> Attila T. Lorincz,<sup>3</sup> Leticia Torres<sup>1, 2</sup>, Mauricio Hernández<sup>1, 2</sup>, Caroline Reuter<sup>3</sup>, Dorota Scibior-Bentowska<sup>3</sup>, Elizabeth Barrios<sup>1, 2</sup>, Indira Mendiola,<sup>1, 2</sup> Leith León<sup>1, 2</sup>, Berenice Rivera<sup>1, 2</sup>, Eduardo Lazcano<sup>1, 2</sup>, Jorge Salmerón<sup>2</sup> y el grupo de estudio FRIDA\*

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Salud Poblacional. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Epidemiológica. IMSS. Cuernavaca Morelos, México.

<sup>3</sup> Wolfson Institute of Preventive Medicine. Barts and the London, Queen Mary University of London, London, UK.

### \*Grupo de Estudio FRIDA

Cosette Wheeler, Patti Gravitt, Mark H. Stoler, Enrique Carmona, Héctor Figueroa, Kevin Ault, Kathleen M Schmeler, Philippe Castle, David Bishai, Paula Ramírez, Pilar Hernández, Leith León, Daniel Alvarez, Elizabeth Barrios, Rubí Hernández, Indira Mendiola, Vicente González, Mauricio Hernández-Ávila, Leticia Torres, Eduardo Lazcano, Eduardo Franco, Jack Cuzick, Attila Lorincz, Thomas C. Wright, Anna Barbara Moscicki, Yvonne N. Flores, Pablo Méndez, Joacim Meneses, Berenice Rivera, Samantha E. Rudolph y Jorge Salmerón.

## Resumen

**Antecedentes.** El grado de metilación, tanto en el genoma del virus de papiloma humano de alto riesgo (VPHar) como en el gen humano EPB41L3, ha sido asociado al desarrollo de neoplasia intraepitelial de alto grado o cáncer cervical (NIC2+).

**Objetivo:** Evaluar el desempeño de la escala de metilación S5, que combina los niveles de metilación del genoma del VPH16, 18, 31, 33 y el gen EPB41L3 como predictor de NIC2+.

**Metodología.** Se llevó a cabo un estudio de casos y controles de mujeres entre 30 a 64 años referidas a colposcopia en el estudio FRIDA, conducido en Tlaxcala, México. El estudio incluyó 35 casos con confirmación histológica de NIC2+ y 105 controles con  $\leq$ NIC1, todos positivos a infección por VPHar. Se hizo la detección de VPH16/18/31/33 y se cuantificó la metilación del genoma viral en sitios CpG específicos de las regiones L1y/o L2, así como del gen humano EPB41L3, por medio de pirosecuenciación. Se evaluó la utilidad diagnóstica de la escala cuantitativa S5 por medio de la curva característica operativa del receptor (ROC) y se evaluó la capacidad de ésta para predecir la presencia de NIC2+ en mujeres VPHar positivas.

**Resultados.** La escala de metilación S5 discriminó a las mujeres con NIC2+ con una área bajo la curva de 0.75 (rango 0.53-0.82). Un punto de corte de 3.7 permite una sensibilidad de 65% (IC95% 47.8-80.9) y una especificidad de 81.9% (IC95% 73.8-88.7), con un valor predictivo positivo de 54.8%

**Conclusión.** La escala de metilación S5 puede ser una alternativa como prueba de triage en las mujeres VPHar positivas para evaluar quien requiere referencia a colposcopia para confirmación diagnóstica.

**Palabras Clave:** VPH alto riesgo, triage, VPH 16, 18, 31, 33, EPB41L3, Metilación, Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto grado.

**Abreviaturas:** VPHar: Virus de Papiloma Humano de alto grado, CpG: Sitio Citocina-Fosfo-Guanina, NIC2+: Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto grado, ABC: área bajo la curva, NEG: Negativo a Neoplasia Intraepitelial Cervical, NIC1: Neoplasia Intraepitelial Cervical grado1 NIC2: Neoplasia Intraepitelial Cervical grado2, NIC3: Neoplasia Intraepitelial Cervical grado3, CC: Cáncer cervical, IC: Intervalo de Confianza, ADN: Acido Desoxirribonucleico,

### Autor de correspondencia:

Attila T. Lorincz. Wolfson Institute of Preventive Medicine, Barts and The London School of Medicine, London, United Kingdom a.lorincz@qmul.ac.uk; Phone +44 (0)20 7882 3540

## Introducción

El cáncer cervical (CC) representa la segunda causa de muerte en las mujeres de todo el mundo, siendo los países en desarrollo los que presentan la mayor carga por esta enfermedad.<sup>1-5</sup> El reconocimiento de la infección persistente del Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo (VPHar) como causa necesaria de cáncer cervical,<sup>6, 7</sup> ha favorecido el desarrollo de nuevas tecnologías para detección de VPHar y la implementación de éstas como prueba de tamizaje primario en programas de detección oportuna de CC en distintos países.<sup>2, 7-9</sup> Sin lugar a duda estos procedimientos significan un gran avance en el tamizaje de CC.<sup>2, 8, 10, 11</sup> No obstante, los programas de tamizaje basados en VPHar hacen imperativo el uso de pruebas de triage que permitan distinguir entre la pequeña proporción de mujeres VPHar positivas que desarrollarán lesiones de alto grado y/o CC.<sup>5, 11, 12</sup> Se han propuesto distintas alternativas de triage, sin embargo, a la fecha ninguna permite una solución completa del problema.<sup>13-15</sup> Diversos estudios han demostrado que la metilación en el genoma de VPHar y de la célula huésped desarrolla un papel importante en el ciclo de vida viral y el desarrollo de carcinogénesis,<sup>16-19</sup> por lo que es un prometedor marcador molecular para la detección de CC.<sup>19</sup>

La metilación, resulta de la adición de un grupo metilo al carbono en posición 5 del anillo de citosina en el sitio Citosina-fosfo-Guanina (CpG).<sup>16, 20</sup> Las regiones L1 y L2 del genoma viral contienen gran cantidad de sitios CpG, y estos dinucleótidos metilados son asociados con cambios en las interacciones entre proteínas-DNA y la regulación de la expresión génica viral y del huésped.<sup>16, 19, 21</sup> En diversas investigaciones se ha evaluado principalmente la metilación de VPH16 en las regiones L1 y L2. Los hallazgos de estos estudios han revelado una fuerte asociación entre la metilación de este genotipo y el desarrollo de NIC3.<sup>18, 22</sup>

Por otra parte, el gen humano EPB41L3 es un supresor de tumores y está relacionado con la movilidad celular, invasión y progresión.<sup>21, 23</sup> Durante los últimos años, se demostró que la metilación de sitios CpG específicos dentro del gen EPB41L3, está relacionada con el desarrollo de diversos carcinomas, particularmente de próstata y de cérvix.<sup>24, 25</sup>

Recientemente se han propuesto distintas escalas cuantitativas de metilación,<sup>19</sup> la más reciente de éstas, llamada S4, sugiere que la metilación conjunta de VPH16, 18, 31 aunada al gen EPB41L3, ofrece una buena sensibilidad.<sup>23</sup> Considerando que cerca del 80% del cáncer cervical invasor es causado por la infección de los genotipos específicos de HPV 16, 18, 31, 33,<sup>26, 27</sup> y que existe una fuerte asociación de la metilación del gen EPB41L3 en el desarrollo de Neoplasia Intraepitelial Cervical de alto grado (NIC2+);<sup>21, 23</sup> se ha propuesto una nueva escala de clasificación basada en la metilación cuantitativa de los anteriores genes. El objetivo de nuestro estudio es evaluar el desempeño de esta nueva escala de metilación (S5), formada por el promedio ponderado de la combinación de los niveles de metilación del genoma de VPH16, 18, 31, 33 y el gen EPB41L3 como predictor de NIC2+.

## Métodos

### Población de estudio

Se llevó a cabo un estudio de casos y controles anidado en la población de mujeres, entre 30 y 64 años de edad, participantes del estudio FRIDA. La descripción de los métodos de este estudio se encuentra en redacción (Torres L, *et al*). Brevemente, se trata de un estudio con base poblacional, en la totalidad de mujeres de la Jurisdicción Sanitaria No. 1 de los Servicios de Salud del estado de Tlaxcala, México (SST). El objetivo del estudio FRIDA es evaluar diferentes alternativas de triage en mujeres VPHar positivas. El estudio FRIDA se registró ante el Instituto Nacional de Salud Pública (1094), ante la Comisión de Investigación de la SST (SS.DECI-OI-13/12), ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS (R-2013-785-070) y ante COFEPRIS (CAS/OR/01/CAS /123300410C0044-3578/2012).

### Selección de casos y controles

Para el presente análisis se incluyeron 35 casos y 105 controles de mujeres VPHar positivas, atendidas en la clínica de colposcopia por un resultado positivo a VPH-16/18 y/o citología anormal (criterio para considerarse triage positivo en el

estudio). Los casos fueron seleccionados con base en el diagnóstico histopatológico de NIC2+ (13 NIC2, 20 NIC3 y 2 CA). Se seleccionaron 3 controles por caso, los cuales fueron pareados por edad (70 NEG y 35 NIC1). Dentro de la población atendida en el periodo entre abril de 2013 a mayo de 2014.

## Medición de la exposición

### Características de las muestras

En ambos grupos se colectaron muestras cervicales usando un cepillo Rovers Cervex brush y se almacenaron en Preservcyt como parte de las actividades de reclutamiento del estudio FRIDA. Las alícuotas se conservaron en congelación a -70°C hasta su envío y procesamiento en el Molecular Epidemiology Laboratory del Wolfson Institute of Preventive Medicine QMUL, donde se llevaron a cabo los procedimientos de análisis de ADN y metilación.

### Análisis de ADN y ensayo de metilación

El ADN se extrajo de las muestras cervicales utilizando un mini kit QIAamp (Quiagen, Hilden, Germany) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se cuantificó el ADN mediante absorción UV (NanoDrop). Se obtuvieron en promedio 30 ng/uL de ADN de cada muestra, 500 ng de ADN fueron usados en la reacción de conversión-bisulfito. En esta reacción, las citosinas sin metilar son convertidas a uracilo usando el kit de metilación EZ DNA (Zymo research, Irvine, CA). Este kit está diseñado para reducir la degradación y minimizar la pérdida de ADN durante el proceso. El ADN convertido fue eluido en 20 uL de Elution Buffer.

Después de la conversión completa, el ADN fue amplificado mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando PyroMark PCR Kit (Quiagen) para seleccionar las regiones específicas: EPB41L3 (95°C por 15'/ 94°C por 30"/ 54°C por 30"/ 72oC por 30"/72oC x 5', 45 ciclos), HPV16 L1.3 (95°C por 15'/ 94°C por 30"/ 54°C por 30"/ 72oC por 30"/72oC x 10', 45 ciclos), VPH16 L2 (95°C por 15' / 94°C por 30"/ 54°C por 30"/ 72oC por 30"/72oC x 10', 45 ciclos), VPH18 L2 (95°C por 15'/ 94°C por 30"/ 54°C por 30"/ 72oC por 30"/72oC x 10', 50 ciclos), VPH31L1 (95°C por 15'/ 94°C por 30"/ 49°C por 30"/ 72oC por 30"/72oC x 10', 45 ciclos), VPH33L2 (95°C por 15'/ 94°C por 30"/ 53°C por 30"/ 72oC por 30"/72oC x 10', 45 ciclos).

Para el ensayo de metilación, los productos de PCR fueron pirosecuenciados usando PyroMarkQ96 ID (Quiagen), y se cuantificaron las proporciones de citosina y timina para cada uno de los sitios CpG del genoma de VPH16 L1.3 (CpG6389 y CpG6367), VPH16 L2.5 (CpG4275, CpG4268, CpG4259, CpG4247, CpG4238), VPH18L2 (CpG4256, CpG4261, CpG4265, CpG4269, CpG4275, CpG4282), VPH31 L (CpG6352), HPV33 (CpG5557, CpG5560, CpG5566, CpG5572), y del gen humano EPB41L3 (CpG438, CpG427 y CpG425). Estos procedimientos se desarrollaron durante el periodo julio-noviembre de 2014 por personal calificado para estos fines. Los procedimientos y control de calidad de los mismos, han sido reportados previamente.<sup>28, 29</sup>

### Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo de las características sociodemográficas y la prevalencia de los distintos tipos específicos de VPH (16, 18, 31 y 33), en la población de estudio. Se utilizó la escala de metilación S5 creada por el grupo de investigación del Molecular Epidemiology Laboratory del Wolfson Institute of Preventive Medicine QMUL. A saber, en esta escala el valor de metilación de cada uno de los genotipos de VPH (16/18/31/33) y el gen EPB41L3 se determinó de acuerdo al promedio de metilación de sus sitios CpG específicos en cada región. El valor final de S5 está determinado por la siguiente ecuación:

$$S5 = EPB41L3(25.7) + VPH16L1.3 (12.6) + VPH16L2(4) + VPH18L2(7.9) + VPH31L1(20.6) + VPH33L2(29.1)$$

Se utilizó esta ecuación para obtener un valor de S5 para cada uno de los 35 casos (13 NIC2, 20 NIC3 y 2 CA) y los 112 controles (39 NIC1 y 73 NEG). Se realizó un gráfico box plot para estimar la distribución de la escala de metilación S5

de acuerdo al diagnóstico histopatológico por grado de lesión (NEG, NIC1, NIC2, NIC3 y CA).

Se realizó una curva característica operativa del receptor (ROC) para obtener el punto de corte que mejor permitiera la discriminación entre casos y controles. Con base en este punto de corte se establecieron 2 categorías de la escala de metilación S5 (S5 bajo y S5 alto), con el fin de estimar sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), y valor predictivo negativo (VPN), todos los valores se estimaron con un intervalo de confianza del 95%. Este análisis estadístico se llevó a cabo con el software STATA versión 12.0.

## Resultados

La población de casos y controles empleada en este análisis corresponde principalmente a mujeres entre 30 y 39 años, con una media de edad de 37 años. El 23 % de los casos y el 34% de los controles iniciaron vida sexual antes de los 16 años. La proporción de mujeres que nunca han usado anticonceptivos fue similar en ambos grupos (80%) y el ~75% de ellas refieren nunca haber usado condón durante los últimos 12 meses. En general, la población de estudio registró no haber fumado en un 90%, los casos reportaron dos veces más consumo de tabaco que los controles (5% vs 10%) (Tabla1).

El 60 % de casos y controles fueron VPH16 positivas. El 3% de los casos y el 20% de los controles fueron positivos a VPH18. La prevalencia de la infección por VPH31/33 fue de 22% en los casos y 18% en los controles. El 55% de ambos grupos fueron positivos a otro tipo de VPHar. El 60% de los casos y el 40% de los controles presentaron anomalías en la citología líquida (ASCUS+). (Tabla2)

El valor de la escala de metilación S5 se incrementa en forma importante conforme avanza la severidad de la lesión, desde un valor de 0.5 en pacientes NEG, o de VALOR en mujeres con CIN1, hasta un valor de 15.4 en pacientes con CC. Estos valores se muestran gráficamente al comparar los diagramas de caja para las distintas lesiones histológicas. (Tabla3)

El análisis ROC de la escala de metilación S5 para la detección de NIC2+ muestra un área bajo la curva de 0.75 (rango 0.53-0.82). El mejor punto para discriminar las lesiones de alto grado corresponde a un valor de 3.7 en la escala de metilación S5. Con base en este valor se logró clasificar a las mujeres en dos categorías: S5bajo y S5alto, que al contraste con el resultado histopatológico, se obtuvo una sensibilidad de 65% (IC95% 47.8-80.9) y 80.0% de especificidad (IC95% 71.8-87.3) para diagnosticar NIC2+ (Tabla 4). La escala de metilación S5 podría discriminar a las mujeres que no presentan una lesión de alto grado NIC2+ con un VPN de 88% (IC95% 80.4 -93.8).

## Discusión

Nuestros datos proporcionan evidencia de que los niveles de metilación del genoma del VPH16, 18, 31, 33 y el gen EPB41L3 usando la escala S5 tienen una sensibilidad del 65% y del 80% para detectar lesiones NIC2+. Estos resultados soportan la propuesta de crear escalas conjuntas que incorporen la metilación de genes virales y humanos, para contar con pruebas de triage que permitan discriminar entre mujeres VPHar positivas que verdaderamente requieren continuar con un proceso de confirmación diagnóstica.

La mayoría de las lesiones derivadas de la infección por VPHar, eventualmente son reversibles,<sup>5, 7</sup> por lo que la identificación de aquellas mujeres con marcadores que indican progresión neoplásica permite maximizar la oportunidad de confirmación diagnóstica y manejo entre aquellas que realmente lo requieren. Estudios previos han propuesto distintas escalas, basadas en la metilación de distintos tipos virales del VPH y genes humanos (S1, S2, <sup>20</sup> S4<sup>19, 21</sup>). Para la evaluación del potencial uso diagnóstico de estas escalas, en cada estudio, se ha seleccionado distintos puntos de corte, dado que la población estudiada ha provenido de diferentes estrategias de tamizaje. Por poner un ejemplo, la escala S4 se utilizó en mujeres referidas a colposcopia por una citología anormal y que cumplían con el criterio de ser VPHar positivas,<sup>19</sup> bajo este contexto, este tipo de escalas ofrecen una mayor sensibilidad (>85%), restringiendo la especificidad

(<40%). Ahora bien, pudiera ser que si el propósito es evaluar la utilidad de este tipo de escala como prueba de triage en mujeres VPHar positivas, sería más conveniente mejorar el balance hacia una mayor especificidad. Aún más, si deseamos evaluar su desempeño en un escenario como el de este análisis, en el que las mujeres que son evaluadas con esta escala son un grupo preseleccionado con VPHar, con tipo específico 16/18 y/o citología anormal, resulta conveniente utilizar puntos de corte con un balance óptimo entre sensibilidad y especificidad. Finalmente consideramos que resulta indispensable tomar en cuenta el tipo de población o el nivel de tamizaje en el que se encuentra. Por ejemplo, en un escenario como el empleado en el estudio de la escala S4, se podrían evitar cerca del 30% de colposcopías innecesarias. En contraste, en nuestro estudio, la aplicación de la escala S5 como prueba de triage pudiera ofrecer una reducción del 70% de las colposcopías.

De acuerdo a nuestros resultados la escala S5 detectó niveles altos de metilación en 12% de los controles. Publicaciones anteriores<sup>18, 19, 30, 21</sup>, han observado que la asociación del valor de metilación predice la persistencia de la infección de los tipos virales estudiados en la cada escala.<sup>21</sup> Por lo que, se podría sugerir que las mujeres en las cuales no ha sido posible detectar lesiones relevantes en su primera evaluación colposcópica deberán ser cuidadosamente evaluadas en visitas de seguimiento que permita documentar la aclaración o progresión de la infección.

Dentro de las limitantes de este estudio es importante tomar en cuenta que la población de casos y controles del presente estudio provienen de mujeres atendidas en la clínica de colposcopia, por ser triage positivo VPH16/18 y/o ASCUS+. La presencia de VPH31 y 33 no fue considerada como criterio de envío a colposcopia y la genotipificación de estos tipos de VPH se llevó a cabo posterior al conocimiento del diagnóstico histopatológico. Hay que considerar que los potenciales casos atribuibles al VPH-31 y 33 en este estudio se encuentran posiblemente subestimados. Los casos por estos dos tipos virales son aquellos que fueron enviados a colposcopia por tener una citología anormal. Por otra parte, este estudio no incluye la evaluación de la adición del tipo de VPH-33 al panel de metilación, sin embargo resulta de interés llevar a cabo una comparación del beneficio de incluir este tipo viral.

En resumen, la escala de clasificación S5 ofrece una sensibilidad aceptable como prueba de triage en nuestra población. Consideramos que un biomarcador que pueda ser utilizado como una prueba de triage en mujeres positivas a VPHar podría ser de gran utilidad para ser más eficiente los programas de prevención del cáncer cervical, reduciendo así visitas en colposcopia innecesarias y costos de procedimientos innecesarios.

## Tablas y figuras

**Tabla 1.** Características sociodemográficas, salud sexual, reproductiva y estilo de vida de la población de estudio (n=140)

Grupos de edad	Media (DS) 37.0 (7.8)	Casos (n=35)		Controles (n=105)	
		n	%	n	%
30 a 39		26	74.2	80	76.2
40 a 49		7	20.0	17	16.2
50 a 59		1	2.9	4	3.8
60 a 64		1	2.9	4	3.8
<b>Estado civil</b>					
Casada/Unión Libre		30	85.7	93	88.6
Divorciada/ Separada/ Viuda		1	2.9	3	2.8
Soltera		4	11.4	9	8.6
<b>Edad de inicio de vida sexual</b> Media (DS) 18.3 (3.8)					
Antes de los 16 años		8	22.9	35	33.4
Después de los 16 años		27	77.1	70	66.6
<b>Número de parejas sexuales</b> Media (DS)1.4 (0.5)					
1		21	60.0	63	60.0
2 o más		14	40.0	43	40.0
<b>Anticonceptivos hormonales</b> Duración					
Si	Menos de 12 meses	5	14.3	11	10.5
	Más de 12 meses	2	5.7	12	11.4
Nunca		28	80.0	82	78.1
<b>Uso de dispositivo intrauterino</b> Duración					
Si	Menos de 12 meses	2	5.7	13	12.5
	Más de 12 meses	13	37.1	32	30.4
Nunca		20	57.2	60	57.1
<b>Uso de condón en los últimos 12 meses</b>					
Nunca		27	77.2	77	73.4
Casi siempre		4	11.4	14	13.3
Siempre		4	11.4	14	13.3
<b>Número de embarazos</b> Media (DS) 3.5 (2.1)					
0		1	2.8	3	2.8
1 a 3		19	54.3	50	47.6
4 o más		15	42.9	52	49.5
<b>Hábito tabáquico</b>					
Nunca		31	88.6	99	94.3
Fumador actual		1	2.9	6	4.7
Exfumador		3	8.6	0	0.0

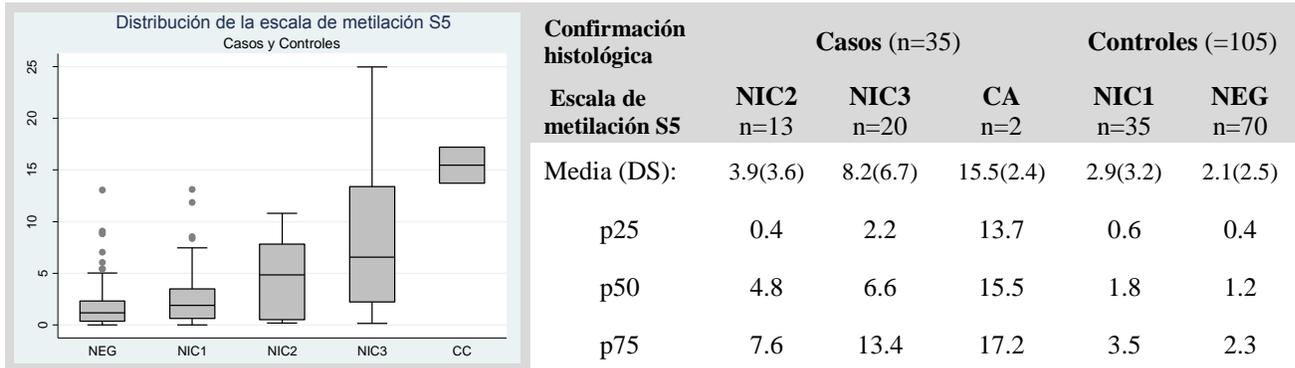
Distribución de las características de sociodemográficas y de estilo de vida de la población (grupos de edad, estado civil, edad de inicio de vida sexual, número de parejas sexuales, anticonceptivos hormonales, uso de dispositivo intrauterino, uso de condón en los últimos 12 meses, número de embarazos y hábito tabáquico)

**Tabla 2.** Prevalencia de la infección por VPHar y evaluación citológica

Infección por VPHar	Casos (n=35)		Controles (n=105)	
	n	%	n	%
VPH16+	21	60.0	59	52.7
VPH18+	1	2.9	21	20.5
VPH31+	3	8.6	12	10.7
VPH33+	5	14.3	9	8.0
VPHOtros+	20	57.2	61	54.5
<b>Evaluación citológica</b>				
Normal	16	45.7	65	61.9
Anormal (ASCUS+)	19	54.3	38	36.2
Missing	0	0	2	1.9

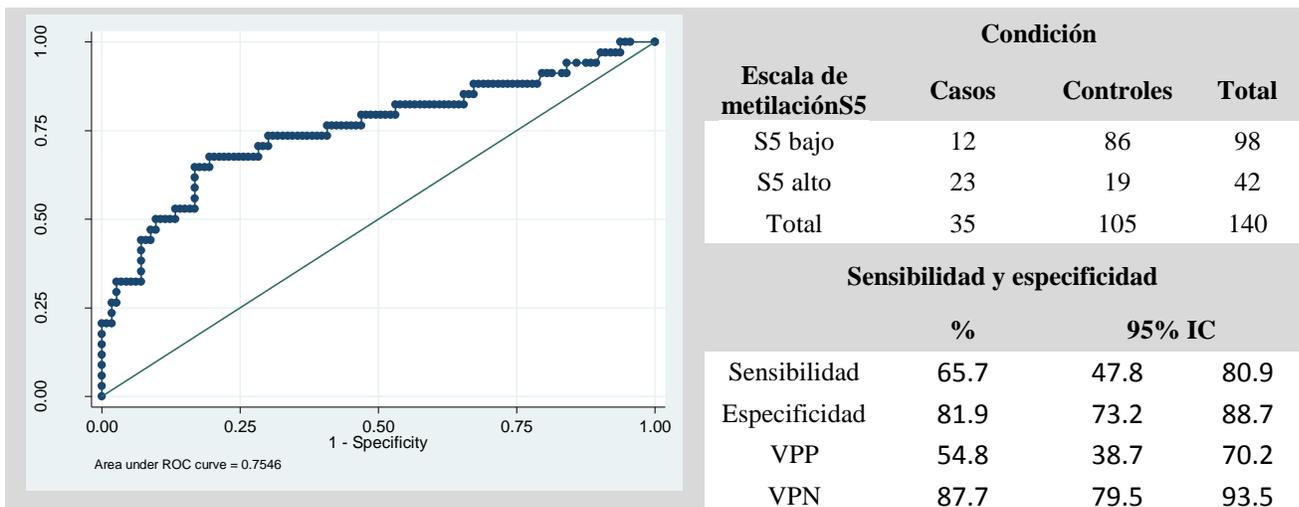
Prevalencia de la infección por VPH16, 18, 31,33 el 54% del total de la población fue positiva a VPH16, el 16% tiene infección por VPH18, el 10% de las mujeres fueron positivas a VPH31 y 33 respectivamente, adicionalmente el otros genotipos de VPH se presentaron en más del 50% de la población de casos y controles. Toda la población analizada fue positiva a una prueba de VPHar.

**Tabla 3.** Escala de metilación del ADN y resultado de patología.



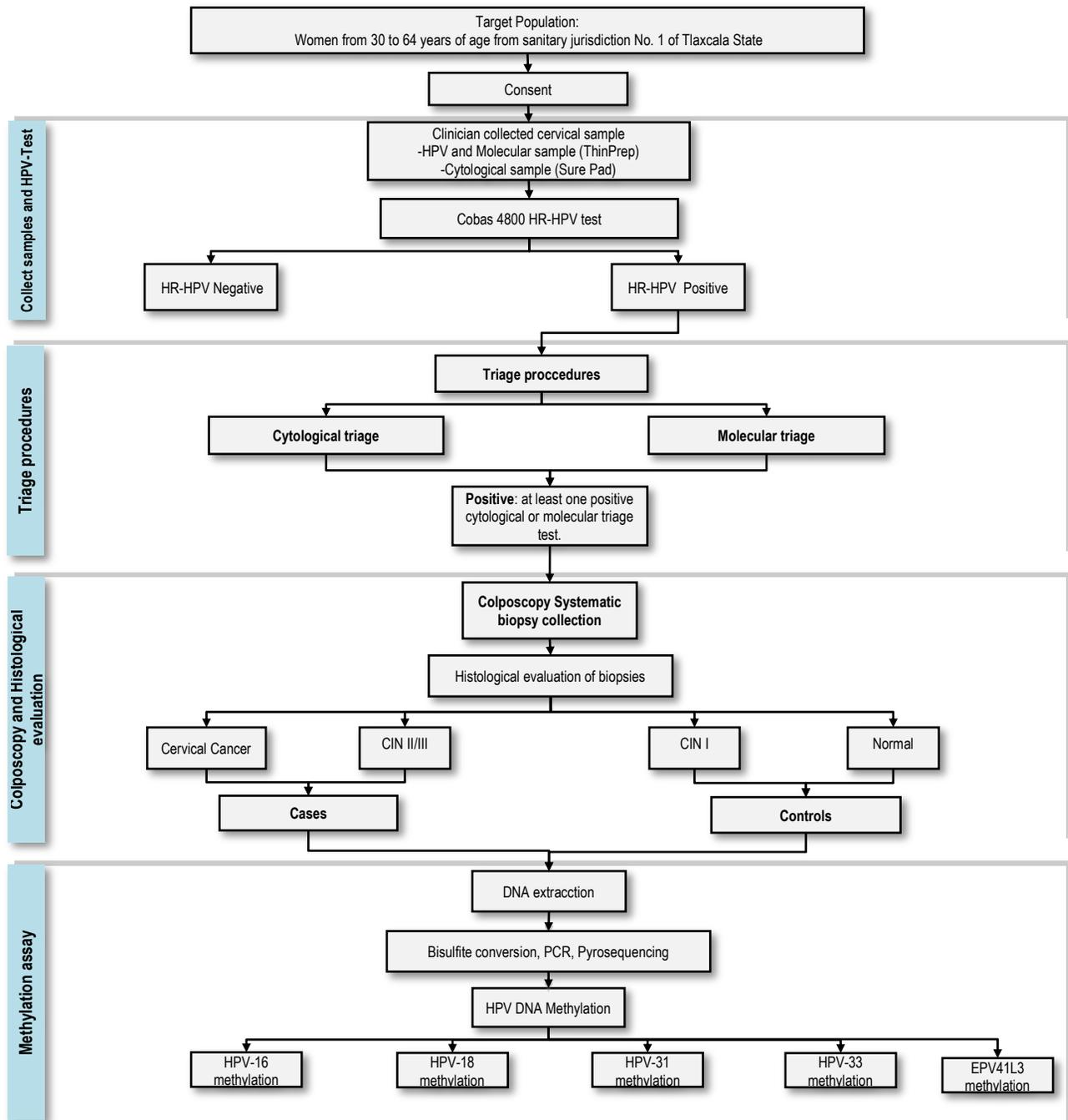
Comparación de la escala de metilación S5 en contraste con el grado de lesión determinado por el diagnóstico histopatológico. Se muestran los valores de la media y mediana por grado de lesión en los casos y controles. p25: percentil25, p50: percentil 50y p75: percentil 75

**Tabla 4.** Análisis ROC



Sensibilidad y especificidad de la escala de metilación S5, Se muestra un área bajo la curva de 0.75. Se consideró un punto de corte de 3.7 para clasificar S5 en dos categorías (S5alto y S5bajo) con 65% de sensibilidad y 81% de especificidad..

## Diagrama del estudio



## Referencias

1. Almonte, M., et al., *New paradigms and challenges in cervical cancer prevention and control in Latin America*. Salud Publica Mex, 2010. **52**(6): p. 544-59.
2. Lazcano Ponce, E.C., et al., *Factores que determinan la participación en el tamizaje de cáncer cervical en el estado de Morelos*. Salud Publica Mex, 1999. **41**(4): p. 278-85.
3. Lazcano-Ponce, E., et al., *A pilot study of HPV DNA and cytology testing in 50,159 women in the routine Mexican Social Security Program*. Cancer Causes Control, 2010. **21**(10): p. 1693-700.
4. Murillo, R., et al., *Cervical cancer screening programs in Latin America and the Caribbean*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 11**: p. L37-48.
5. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
6. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
7. Franco, E.L., E. Duarte-Franco, and A. Ferenczy, *Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection*. Cmaj, 2001. **164**(7): p. 1017-25.
8. Ratnam, S., E.L. Franco, and A. Ferenczy, *Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. **9**(9): p. 945-51.
9. Munoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
10. Schiffman, M., C.M. Wheeler, and P.E. Castle, *Human papillomavirus DNA remains detectable longer than related cervical cytologic abnormalities*. J Infect Dis, 2002. **186**(8): p. 1169-72.
11. Tota, J.E., et al., *Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies*. Prev Med, 2011. **53 Suppl 1**: p. S12-21.
12. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(5): p. 368-83.
13. Fields, R.P., *Human papillomavirus DNA versus papanicolaou screening tests for cervical cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(6): p. 642-3; author reply 643-4.
14. Flores, Y.N., et al., *HPV testing for cervical cancer screening appears more cost-effective than Papanicolaou cytology in Mexico*. Cancer Causes Control, 2011. **22**(2): p. 261-72.
15. Mayrand, M.H., et al., *Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer*. N Engl J Med, 2007. **357**(16): p. 1579-88.
16. Denis, H., M.N. Ndlovu, and F. Fuks, *Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms*. EMBO Rep, 2011. **12**(7): p. 647-56.
17. Lai, H.C., et al., *Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer*. Int J Cancer, 2008. **123**(1): p. 161-7.
18. Lorincz, A.T., et al., *HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology*. Int J Cancer, 2013. **133**(3): p. 637-44.
19. Lorincz, A.T., *Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation*. Expert Rev Mol Diagn, 2014. **14**(3): p. 293-305.
20. Sun, C., L.L. Reimers, and R.D. Burk, *Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer*. Gynecol Oncol, 2011. **121**(1): p. 59-63.
21. Brentnall, A.R., et al., *A DNA methylation classifier of cervical precancer based on human papillomavirus and human genes*. Int J Cancer, 2014. **135**(6): p. 1425-32.
22. Vinokurova, S. and M. von Knebel Doeberitz, *Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24451.
23. Louvanto, K., et al., *Methylation of viral and host genes and severity of cervical lesions associated with human papillomavirus type 16*. Int J Cancer, 2015. **136**(6): p. E638-45.
24. Eijsink, J.J., et al., *A four-gene methylation marker panel as triage test in high-risk human papillomavirus positive patients*. Int J Cancer, 2012. **130**(8): p. 1861-9.
25. Vasiljevic, N., et al., *DNA methylation of PITX2 predicts poor survival in men with prostate cancer*. Biomark Med, 2014. **8**(9): p. 1143-50.
26. de Sanjose, S., et al., *Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study*. Lancet Oncol, 2010. **11**(11): p. 1048-56.
27. Vasiljevic, N., et al., *A comparison of methylation levels in HPV18, HPV31 and HPV33 genomes reveals similar associations with cervical precancers*. J Clin Virol, 2014. **59**(3): p. 161-6.
28. Clarke, M.A., et al., *Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer*.

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(12): p. 2125-37.
29. Cuzick, J., et al., *New technologies and procedures for cervical cancer screening*. Vaccine, 2012. **30 Suppl 5**: p. F107-16.
  30. Mirabello, L., et al., *Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia*. Int J Cancer, 2013. **132**(6): p. 1412-22.
  31. Cox, J.T., et al., *Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: results from the ATHENA HPV study*. Am J Obstet Gynecol, 2013. **208**(3): p. 184.e1-184.e11.
  32. Wright, T.C., Jr., et al., *Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results*. Am J Clin Pathol, 2011. **136**(4): p. 578-86.