



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**Papel de la variabilidad viral, la expresión de RNA
y la microbiota en el carcinoma asociado a la infección
por el Virus del Papiloma Humano 16**

Álvaro de Andrés Pablo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE
L'ALIMENTACIÓ**

**PAPEL DE LA VARIABILIDAD VIRAL, LA
EXPRESIÓN DE RNA Y LA MICROBIOTA EN
EL CARCINOMA ASOCIADO A LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO 16**

Álvaro de Andrés Pablo

2024

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**PAPEL DE LA VARIABILIDAD VIRAL, LA
EXPRESIÓN DE RNA Y LA MICROBIOTA EN EL
CARCINOMA ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR
EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO 16**

Memoria presentada por Álvaro de Andrés Pablo para optar
al título de doctor por la Universitat de Barcelona

Directores

Dr. Miquel Angel Pavón Ribas

Dr. Francesc Xavier Bosch José

Tutor

Dr. Albert Tauler i Girona

AGRADECIMIENTOS

Doctorarse es parecido a la carrera de un ciclista, o quizá es mi pasión por ambas cosas lo que me lleva a hacer el símil, ¿quién sabe?

Todo empieza como un juego, aprendiendo a montar, o a saber qué son las células que componen nuestro cuerpo. Después le coges gusto, te quitas los ruedines, te preguntas el porqué de las cosas, se convierte en una afición y vas haciendo cada vez más kilómetros.

Llega un momento en el que eliges dedicarte a eso que te gusta, deja de ser un juego y la cosa se pone seria. Empiezan los primeros puertos. Al principio vas cómodo, metido en el pelotón y sin dar mucho la cara, pasas las rampas y las bajadas son reconfortantes.

Pero en toda carrera que se precie, llegan los encadenados de montaña que ponen a prueba a todo el que quiere llegar a la cima. Para llegar tienes que tener ciertas condiciones y ser constante en el entrenamiento. Además, tener la suerte de no sufrir caídas.

Pero si algo sabe un campeón del Tour, igual que yo ahora mismo, es que no se puede llegar a la meta solo. Para alzar los brazos has necesitado una familia que te apoye, unos formadores en categorías menores, entrenadores que saquen lo mejor de ti, y un equipo que te arrope durante la etapa.

Aprovecho las primeras líneas para agradecer a mis directores de tesis, Miquel Àngel y Xavier, la oportunidad de realizar mi tesis doctoral con ellos. Gracias Miquel Àngel por ser mi mentor, darme la libertad de proponer y poner a prueba las ideas que me surgen, así como ofrecerme participar en múltiples proyectos del laboratorio. He sentido en estos años confianza por tu parte y espero haber estado a la altura.

Este proyecto ha sido posible por el gran nivel del grupo al que pertenecemos, el PREC, punta de lanza en el ámbito del VPH y la epidemiología del cáncer. Laia al frente y todos los demás hacen un trabajo tremendo para que siga siendo así desde hace décadas. Gracias a esto he podido disponer de una colección de muestras al alcance de muy pocos para realizar mi proyecto. Gracias también al personal que nos facilita la vida, Diana, Fede, Jesús y Nati.

Los agradecimientos más grandes son para mi gente del laboratorio. Tenemos un equipo de técnicos espectacular, en lo personal y lo profesional. Muchas gracias Vane y Yolanda, que nada más llegar me buscaron y cortaron 400 bloques de parafina, entre otras. También a Ana, Marleny y Claudia, que me han ayudado en el laboratorio siempre que he necesitado y no se han hartado de repetirme el protocolo del Maxwell. Menciones especiales para Sonia, Victoria, Laura e Irene, animadoras de comidas y desayunos, hombros en los que llorar cuando aparecen los muros, y que nunca han dudado de parar lo que estaban haciendo para ayudarme.

Un apartado para ella sola merece Laura, sin ella no habría análisis de los datos. ¡Creo que durante estos años hemos hecho buena pareja!

Por supuesto, nadie puede participar sin patrocinadores. Quiero agradecer al Instituto Carlos III la financiación de mi contrato predoctoral. También al Institut Català d'Oncologia y el IDIBELL por poner la infraestructura necesaria para que podamos trabajar. Así como las diferentes fuentes de financiación del PREC que me han permitido poder finalizar el proyecto con contrato.

La vida son las decisiones que uno va acumulando, unas buenas y en otras aprendes. Gracias a mi familia, padres y hermana, por haberme dejado siempre la libertad de elegir, de acertar y de equivocarme. Sin ningún reproche y poniendo los medios necesarios, siempre. Nunca podré llegar a agradecerlos lo que me habéis arropado para allanar el camino a mis metas.

Quizá la decisión de mi vida ha sido la de aguantar bailando en un bar. Cuando lancé el ataque a por la victoria y me llevé el premio. Andrea, mi próximamente mujer y principal soporte en la vida. Compañera del día a día, amor y amiga. Nos unimos siendo unos críos y juntos hemos crecido hasta hoy, codo con codo. Quedan muchas etapas por superar, con sus puertos y sus descensos peligrosos, pero sé que contigo lo mejor está por venir.

Como diría el ídolo, ¡qué duro es este deporte! Ahora mismo me siento ganador, pero sin todos vosotros no habría llegado a la meta, ¡GRACIAS!

RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH) es el agente causal de múltiples cánceres ginecológicos, incluyendo el cáncer de vulva (VSCC). Si bien la infección por VPH es necesaria para el desarrollo de estas neoplasias, no es suficiente por sí sola. Otros factores, tanto virales como del huésped, juegan un papel crucial en la progresión de las lesiones precancerosas a cáncer invasivo.

Este proyecto de doctorado se centró en la identificación de factores moleculares que determinan la progresión a cáncer de lesiones de alto grado (HSIL) asociadas a la infección por VPH en la vulva. Para ello, se utilizaron dos aproximaciones: el análisis de perfiles de expresión de mRNAs y microRNAs en muestras de vulva, y el análisis de la composición de la microbiota en muestras cervicovaginales.

Se identificaron 14 genes (*CASC15*, *CCNA1*, *APOBEC3A*, *CDKN2A*, *ASCL1*, *KRT17*, *MMP9*, *APOC1*, *PRL*, *SOX2*, *ITGA8*, *CALML5*, *KLF4*, *ESR1*, *SLIT2*, *CASZ1*, *AR*) y 15 microRNAs (miR-4286, miR-223-3p, miR-206, miR-575, miR-494-3p, miR-630, miR-642a-3p, miR-1973, miR-31-5p, miR-99a-5p, let-7c-5p, miR-143-3p, miR-451a, miR-125b-5p, miR-145-5p) diferencialmente expresados entre muestras HSIL y VSCC positivas a VPH16, -18, 33 y también negativas a VPH. Además, se identificaron los genes *IFNG*, *IRF4*, *PD-L1*, *HOXA1* e *IFNA2*, implicados en la regulación de la respuesta inmune, específicamente desregulados en las muestras positivas a VPH16.

Los análisis de expresión de mRNAs y microRNAs revelaron que las principales vías y funciones biológicas alteradas entre HSIL y VSCC son la regulación del ciclo celular, la respuesta inmune, la migración e invasión tumoral, la familia APOBEC3 y las hormonas y receptores sexuales.

En el análisis de la microbiota cervicovaginal, se desarrolló un protocolo para analizar la composición de la microbiota en muestras clínicas mediante secuenciación del gen 16S rRNA utilizando la tecnología de Oxford Nanopore.

El protocolo desarrollado se validó en un conjunto de muestras pareadas de 14 pacientes (8 positivas y 6 negativas a VPH) participantes en un estudio de

aceptabilidad de la autotoma como método de muestreo en el programa de cribado de cáncer cervical. De cada paciente se obtuvo una citología líquida tomada por el profesional y una automuestra tomada por la propia paciente.

Al comparar entre pacientes positivas y negativas a VPH, se observó una disminución en la abundancia relativa de *Lactobacillus* y un aumento en la diversidad bacteriana en las muestras positivas a VPH. Los géneros *Atopibium*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus*, *Mageeibacillus*, *Dialister* y *Sneathia* resultaron significativamente más abundantes en las muestras positivas a VPH.

Por su parte, el automuestreo se validó como un método equivalente a la citología líquida para la evaluación de la microbiota cervicovaginal, no observándose diferencias significativas en la composición de la microbiota cervicovaginal en ningún caso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. El virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer	3
I.1.1. Estructura de los VPH	4
I.1.2. Ciclo viral del VPH	6
I.1.3. Infección persistente y carcinogénesis mediada por VPH	8
I.1.4. Clasificación de los VPH	8
I.2. Cáncer de vulva y lesiones precursoras	11
I.2.1. Terminología de las lesiones precursoras en vulva	11
I.2.2. Lesiones vulvares independientes de VPH (dVIN)	12
I.2.3. Lesiones vulvares asociadas a VPH (HSILs)	12
I.2.4. dVINs y HSILs son diferentes lesiones precursoras de VSCC	13
I.3. Biología molecular del cáncer asociado a la infección por VPH	15
I.3.1. Dianas celulares de E6 y E7	15
I.3.2. El papel de APOBEC en la carcinogénesis	18
I.3.3. Alteraciones transcriptómicas en la carcinogénesis mediada por VPH	20
I.3.4. RNAs reguladores en la carcinogénesis mediada por VPH	21
I.3.5. La microbiota cervicovaginal y el VPH	27
I.3.5.1. Relación entre microbiota cervicovaginal y patología asociada a VPH	28
I.3.5.2. Tipos de comunidades microbianas cervicovaginales (CSTs) ...	29
I.3.5.3. El microbioma como herramienta de diagnóstico y tratamiento	30
I.3.5.4. El microbioma de la vulva	31
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
III. METODOLOGÍA	39
III.1. Material biológico	41
III.1.1. Muestras vulvares de la colección VVAP	41
III.1.2. Células 293TT	42
III.1.3. Comunidad microbiana comercial	42
III.1.4. Muestras cervicovaginales obtenidas por el profesional y automuestras utilizadas para el análisis del microbioma	43
III.2. Metodología experimental	44
III.2.1. Ensayos de expresión en mRNAs	44
III.2.1.1. Selección del panel de genes	44

III.2.1.2. Análisis de expresión de mRNA mediante nCounter Custom CodeSets	44
III.2.1.3. Validación de la expresión de mRNAs candidatos mediante RT-qPCR	46
III.2.2. Ensayos de expresión de miRNAs	48
III.2.2.1. Panel de miRNAs analizado	48
III.2.2.2. Ensayos nCounter de miRNAs.....	48
III.2.3. Secuenciación del gen 16S rRNA	49
III.2.3.1. Amplificación del gen 16S rRNA	50
III.2.3.2. Preparación de librerías de secuenciación	51
III.2.3.3. Secuenciación del gen 16S rRNA.....	51
III.3. Metodología computacional y análisis estadístico	52
III.3.1. Filtrado y normalización de lecturas en ensayos nCounter	52
III.3.2. Análisis de expresión RNA no supervisado	53
III.3.3. Análisis de expresión diferencial de genes y miRNAs (nCounter) ...	54
III.3.4. Análisis de expresión diferencial de genes (RT-qPCR).....	54
III.3.5. Asociación de miRNAs desregulados y sus funciones biológicas ..	55
III.3.6. Determinación de la composición de la microbiota cervicovaginal	56
III.3.7. Clasificación por tipos de microbiota (CSTs)	56
III.3.8. Análisis estadístico de la alteración de la microbiota cervicovaginal	57
IV. RESULTADOS.....	59
IV.1. Análisis de expresión génica en muestras HSIL y VSCC de vulva	61
IV.1.1. Población de estudio	61
IV.1.2. Panel de genes analizado.....	61
IV.1.3. Control de calidad y normalización de los ensayos con nCounter Custom CodeSets.....	65
IV.1.4. Análisis no supervisado de expresión de mRNAs.....	65
IV.1.5. Análisis de expresión génica diferencial entre HSIL y VSCC	67
IV.1.6. Expresión génica diferencial entre HSIL y VSCC en muestras positivas a VPH16	73
IV.1.7. Expresión diferencial entre variantes de VPH16	77
IV.2. Análisis de expresión de miRNAs en muestras HSIL y VSCC de vulva...	78
IV.2.1. Población de estudio	78
IV.2.2. Control de calidad y normalización de datos.....	79
IV.2.3. Análisis no supervisado de expresión de miRNAs	80
IV.2.4. Expresión diferencial de miRNAs entre muestras HSIL y VSCC	80

IV.2.5. Expresión diferencial de miRNAs entre HSIL y VSCC en muestras positivas a VPH16	86
IV.2.6. Análisis de dianas de miRNAs y funciones biológicas alteradas	88
IV.2.6.1. Genes diana de los miRNAs alterados entre HSIL y VSCC	89
IV.2.6.2. Análisis de enriquecimiento de funciones	89
IV.2.6.3. Análisis de enriquecimiento de enfermedades	92
IV.2.6.4. Análisis de enriquecimiento de factores de transcripción	94
IV.3. Análisis de la composición de la microbiota cervicovaginal en muestras del programa de cribado de VPH	95
IV.3.1. Diseño y optimización del protocolo para determinar la composición de la microbiota cervicovaginal.....	95
IV.3.1.1. Amplificación del gen 16S rRNA completo.....	95
IV.3.1.2. Secuenciación Nanopore y determinación de la composición microbiana	97
IV.3.2. Validación del protocolo en citologías líquidas y automuestras procedentes del programa de cribado	97
IV.3.2.1. Población de estudio y amplificación del gen 16S rRNA	98
IV.3.2.2. Secuenciación, control de calidad y asignación taxonómica ..	98
IV.3.2.3. Diversidad intramuestral (α -diversidad)	99
IV.3.2.4. Diversidad intermuestral (β -diversidad)	100
IV.3.2.5. Alteraciones de la composición de la microbiota debidos a la infección por VPH.....	101
IV.3.2.6. Clasificación por tipos de microbiota o CSTs.....	103
V. DISCUSIÓN	107
V.1. Alteración de la expresión RNA en la carcinogénesis de vulva asociada al VPH	109
V.1.1. Criterios para la elección de las técnicas utilizadas	110
V.1.2. Población de estudio	111
V.1.3. Análisis de expresión génica	111
V.1.4. Análisis de expresión de miRNAs	113
V.1.5. Diferencias en los perfiles de expresión de las variantes de VPH16	115
V.1.6. Análisis de enriquecimiento de dianas, funciones, enfermedades y factores de transcripción en el conjunto de miRNAs alterados.....	116
V.1.6.1. Enriquecimiento de dianas	117
V.1.6.2. Enriquecimiento de funciones	117
V.1.6.3. Enriquecimiento de enfermedades	118
V.1.6.4. Enriquecimiento de factores de transcripción	119

V.1.7. Procesos biológicos alterados entre HSIL y VSCC en la carcinogénesis de vulva asociada al VPH	119
V.1.7.1. Regulación del ciclo celular, proliferación y diferenciación celular	120
V.1.7.2. La regulación de la respuesta inmune	122
V.1.7.3. Migración e invasión de tejidos	123
V.1.7.4. La familia APOBEC3	124
V.1.7.5. Hormonas y receptores sexuales	124
V.1.7.6. Expresión diferencial de los genes de VPH	125
V.1.8. Limitaciones de los ensayos de expresión de RNA	126
V.1.9. ¿Qué factores moleculares determinan el riesgo de progresión a VSCC?.....	127
V.2. La microbiota cervicovaginal y VPH	128
V.2.1. Protocolo para la determinación de la microbiota cervicovaginal	128
V.2.1.1. Secuenciación con tecnología Nanopore	129
V.2.1.2. Establecimiento del protocolo	129
V.2.2. Estudio piloto y validación del protocolo en muestras clínicas reales	130
V.2.2.1. Diferencias en la microbiota cervicovaginal de pacientes positivas y negativas a VPH.....	130
V.2.2.2. Diferencias en la microbiota cervicovaginal según el método de muestreo	130
V.2.3. Limitaciones del protocolo de determinación de la microbiota	131
VI. CONCLUSIONES.....	133
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	137
VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO	169

I. INTRODUCCIÓN

I.1. El virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de transmisión sexual capaz de infectar el epitelio de diferentes regiones anatómicas. Está ampliamente distribuido en todo el mundo y es de especial relevancia clínica por ser el agente causal de más de 600.000 casos de cáncer (~4,5% de todos los casos) y más de 300.000 muertes cada año [1], [2].

Se estima que más del 80% de la población ha pasado al menos una infección por VPH en los primeros años de actividad sexual [3]. A pesar de estos datos, la mayoría de las infecciones son asintomáticas y se resuelven espontáneamente en menos de 24 meses [4]. Sin embargo, una pequeña fracción de infecciones por VPH se convierten en persistentes, dando lugar a proliferaciones celulares aberrantes que causan lesiones intraepiteliales. Dichas lesiones pueden ir aumentando su grado de severidad y eventualmente algunas progresan hasta un cáncer invasivo [4], [5], [6].

En la mucosa cervical, la mayoría de los cánceres y lesiones intraepiteliales de alto grado (HSILs; por las siglas en inglés de *high-grade squamous intraepithelial lesions*) asociadas a la infección persistente por VPH ocurren en la llamada zona de transformación, donde se pasa de un epitelio de tipo columnar a uno de tipo escamoso, siendo la región anatómica más vulnerable a la infección por VPH [7], [8]. Sin embargo, y aunque menos frecuente, otras partes del área anogenital también son susceptibles de infección por VPH y dan lugar a lesiones y carcinomas invasivos asociados, como es la vulva, la vagina, el pene o el ano [5]. También es importante la fracción de carcinomas invasivos de orofaringe mediados por la infección por VPH [5], [9]. En todo caso, solo una pequeña fracción de infecciones y lesiones precancerosas tienen riesgo de desembocar en un carcinoma invasivo de tipo escamoso (SCC; por las siglas en inglés de *squamous cell carcinoma*). Esto significa que el VPH es un agente causal de cáncer, pero solamente su presencia no es suficiente para provocarlo, es necesaria la concurrencia de otros factores.

Actualmente no existen marcadores moleculares utilizados comúnmente en la práctica clínica para identificar los casos de infección por VPH que desembocarán en un carcinoma invasivo, sin embargo, se han identificado

I. INTRODUCCIÓN

factores virales, de las células infectadas y ambientales asociados a un mayor riesgo de progresión.

I.1.1. Estructura de los VPH

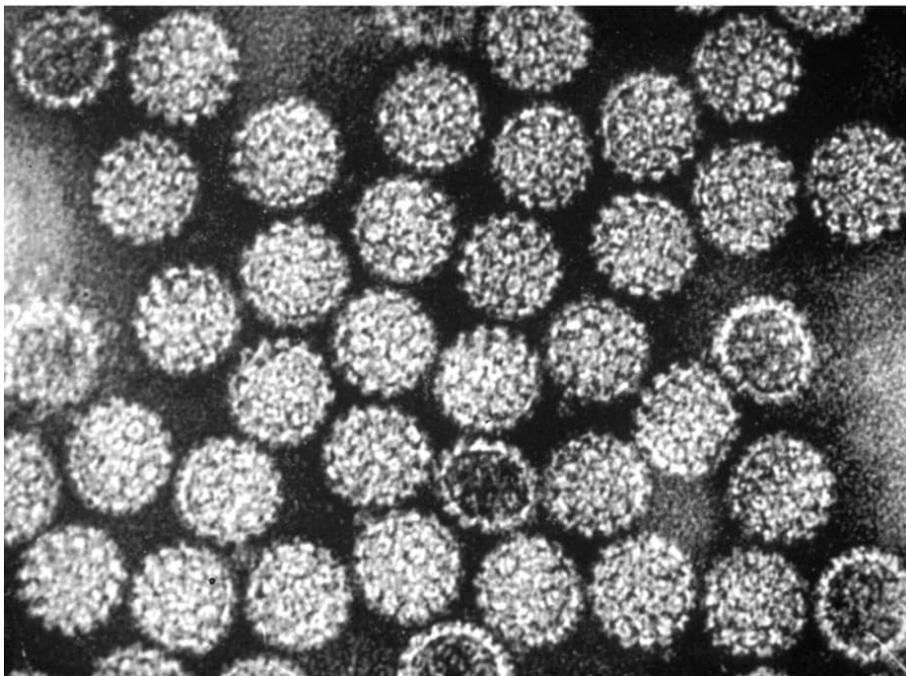


Figura 1 Partículas de VPH bajo microscopía electrónica de transmisión. Laboratorio de Daniel DiMaio (Universidad de Yale) (<https://medicine.yale.edu/lab/dimaio/>)

Aunque existe una gran diversidad funcional y de tropismos entre las diferentes especies y genotipos de los papilomavirus, en general, comparten una estructura similar [4]. Son virus sin envuelta cuya cápside icosaédrica está compuesta por 72 capsómeros formados por un pentámero de proteínas L1 y una unidad de la proteína L2 en el centro de cada capsómero [10] (Figura 1). Son virus de tipo DNA de doble cadena y circular. Su genoma tiene alrededor de 8000 pares de bases y se divide en 3 regiones: i) una región denominada temprana (E; del inglés *early*), cuyos genes (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7* y *E8*) codifican enzimas y factores de transcripción que se expresan desde los primeros estadios de la infección; ii) una región denominada tardía (L; del inglés *late*), cuyos genes (*L1* y *L2*) codifican las proteínas de la cápside y se expresan en fases posteriores de la infección; y iii) una región reguladora llamada URR (del inglés; *Upstream Regulatory Region*) o LCR (del inglés; *Long Control Region*) que contiene el origen de replicación y los sitios de unión para los factores de transcripción que activarán la expresión de los genes virales (Figura 2).

I. INTRODUCCIÓN

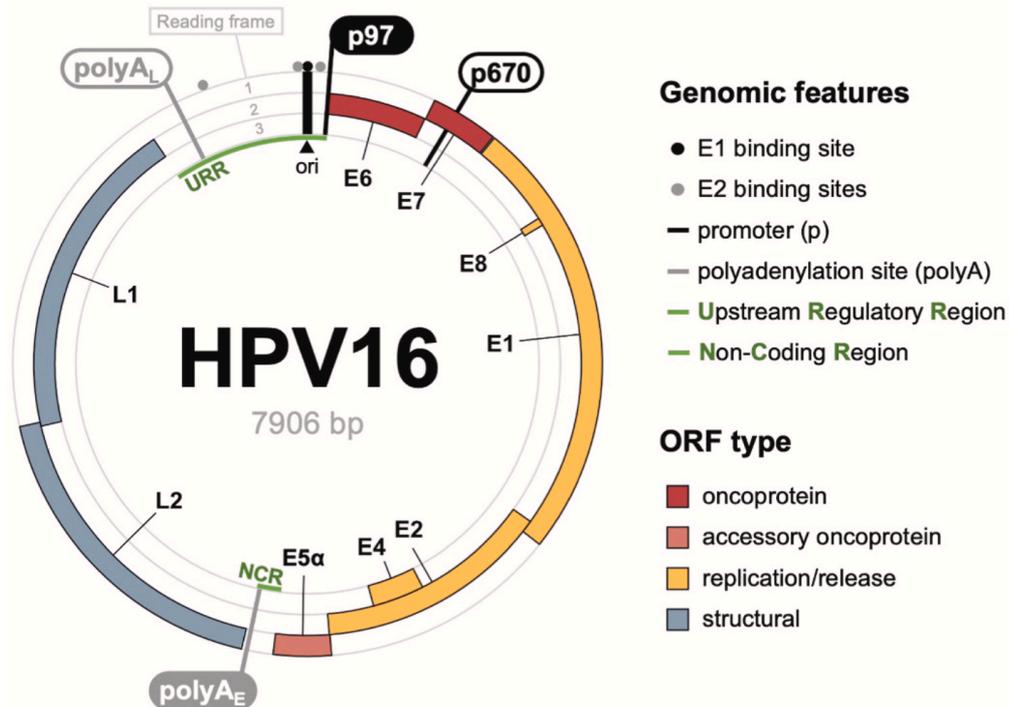


Figura 2 Representación esquemática del genoma de VPH. Los diferentes genes del virus están coloreados según las funciones en las que participan. Otros elementos esenciales para la expresión, como promotores y colas poli-A, están también representados. Imagen tomada de Nelson & Mirabello 2023 [19].

Las funciones de los 9 genes codificados en los VPH son:

- **E1:** Codifica una helicasa que regula la replicación del genoma viral y la transcripción de otros genes de VPH [11].
- **E2:** Codifica una proteína de unión a DNA capaz de modular la expresión de los oncogenes *E6* y *E7*, esencial para escapar a la detección del sistema inmune en los primeros estadios de infección. Además, es capaz de unirse a los cromosomas de la célula huésped para asegurar un reparto proporcional de genomas virales en las divisiones mitóticas [11].
- **E4:** Se considera que juega un papel en la amplificación del genoma y la liberación de nuevos viriones, es decir, participa en el ciclo productivo del VPH. Se expresa mayoritariamente como una proteína de fusión ($E1^E4$) junto al extremo 5' del gen *E1* [12].
- **E5:** Es una oncoproteína transmembrana considerada no esencial en el proceso de transformación oncogénica. Participa en la evasión del sistema inmune e inhibiendo la apoptosis de la célula infectada [13].

I. INTRODUCCIÓN

- *E6*: Durante el ciclo viral su principal función es la de evitar la apoptosis de la célula infectada mediante la inactivación de la proteína p53 [14]. También es capaz de interactuar de forma directa con otras proteínas de la célula, inhibiendo la respuesta inmune y promoviendo el avance del ciclo celular. Es una de las oncoproteínas esenciales en el proceso de malignización.
- *E7*: Es una proteína capaz de interactuar con diferentes proteínas y factores de transcripción celulares. Inactiva la proteína del retinoblastoma (pRB), promoviendo la proliferación celular. También previene la diferenciación celular, favoreciendo una mayor producción de copias virales. Es también una proteína esencial en el proceso oncogénico [15].
- *E8*: Se expresa como una proteína de fusión ($E2^E8$) y su función es la de reprimir la replicación y transcripción del genoma de VPH [16].
- *L1*: Es la proteína estructural principal de la cápside viral. Tiene capacidad de autoensamblamiento [17].
- *L2*: Es la proteína estructural secundaria de la cápside viral. Se sitúa en el centro de los pentámeros de L1, estabilizando la estructura [18].

1.1.2. Ciclo viral del VPH

El VPH infecta células de la capa basal del epitelio. Cuando lo hacen en células troncales (“*stem-like*”) además crean reservorios de infección que van dando lugar a nuevas células infectadas [20]. A medida que las células infectadas van diferenciándose y ascendiendo a las capas superiores del epitelio, se va completando el ciclo viral, formando y liberando nuevas partículas víricas ensambladas según se produce el proceso de descamación de la capa más externa del epitelio [21].

El ciclo viral del papiloma es dependiente de la diferenciación celular del epitelio infectado, es decir, existe una regulación espacial y temporal de la expresión de las diferentes proteínas y funciones biológicas virales (Figura 3). Esta regulación ocurre por el requerimiento de factores de transcripción y funciones de la célula hospedadora que se expresan solo en determinadas etapas de la diferenciación epitelial [19].

I. INTRODUCCIÓN

En las capas basales, el VPH ha evolucionado para pasar desapercibido al sistema inmune del huésped. No se produce la lisis de las células infectadas ni un proceso de inflamación que induciría su reconocimiento y posterior apoptosis antes de poder completar el ciclo viral. Así, en los primeros estadios solo se expresan las proteínas E del VPH, procurando una replicación controlada del genoma viral y manteniendo un número de copias por célula bajo, entre 50 y 200 copias [21]. Las oncoproteínas E6 y E7 se expresan de manera muy controlada con el objetivo de retrasar la diferenciación celular, a la vez que promueven la proliferación celular, pero sin provocar cambios celulares evidentes que podrían ser detectados por células inmunitarias [22], [23]. En las capas intermedias y superiores del epitelio es cuando empiezan a producirse las proteínas estructurales L1 y L2, se aumenta el número de copias del genoma de VPH a más de 1000 por célula, y se ensamblan nuevas partículas víricas capaces de infectar nuevas células [19].

La mayoría de las infecciones de VPH ocurren sin provocar viremia, cascadas proinflamatorias ni apoptosis.

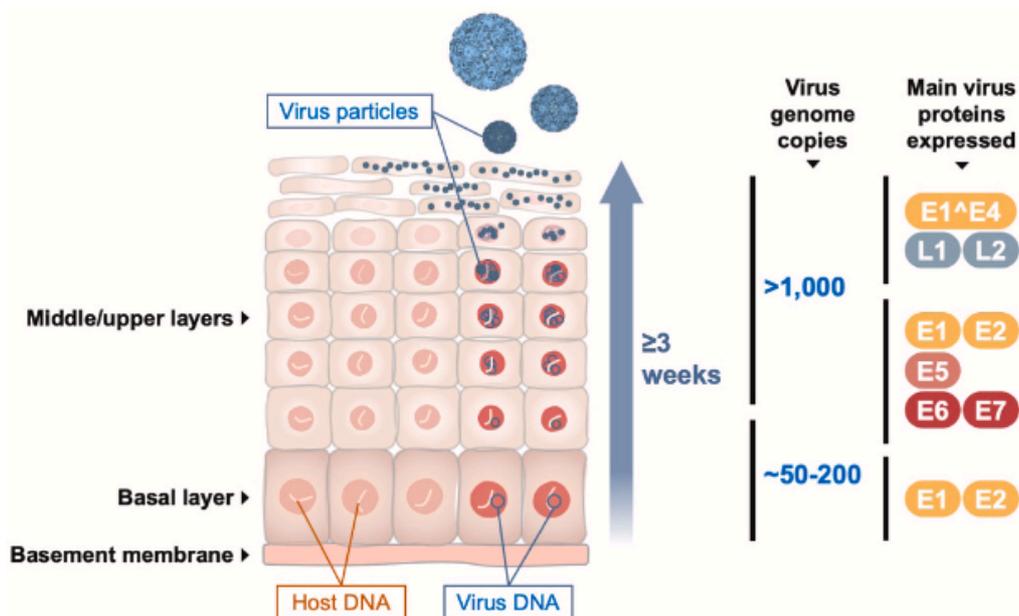


Figura 3 Ciclo viral del VPH en epitelio escamoso estratificado. La expresión de los diferentes genes virales es dependiente de la diferenciación del epitelio para completar el ciclo viral y producir nuevas partículas virales. Imagen tomada de Nelson 2023 [19].

I. INTRODUCCIÓN

I.1.3. Infección persistente y carcinogénesis mediada por VPH

La estrategia evolutiva seguida por los VPH requiere una reconfiguración profunda de las células infectadas para mantenerlas desdiferenciadas y en estado proliferativo, a la vez que escapan de la respuesta inmune y la apoptosis [19], [22]. En ocasiones, la sobreexpresión de E6 y E7 convierte la infección en persistente y provoca la acumulación de daños adicionales en el DNA del huésped. Esto favorece la proliferación celular descontrolada que, al no ser detenida a tiempo por el sistema inmune, acaba originando neoplasias precancerosas. Un porcentaje de ellas puede desembocar en un cáncer invasivo [4], [6].

Esta situación no es habitual, ya que además es contraproducente para el virus, dado que, si las células no completan el proceso de diferenciación, se da lugar a un ciclo denominado abortivo en el que no se producen nuevas partículas víricas y se limita la perpetuación de la infección [23]. Es decir, que el hecho de que se origine una lesión de alto grado o un cáncer asociado a la infección persistente por VPH es una consecuencia, y no un objetivo del virus [19].

Una de las formas en las que se desregula la expresión de E6 y E7 es por la integración del genoma viral en el de la célula huésped [24], [25]. Aunque es un fenómeno frecuente en casos de cáncer, no se considera necesario ni suficiente para provocarlo. Lo que sí se observa habitualmente en casos de cáncer es que, al linearizarse el genoma del virus y producirse la integración, se suele perder la región del gen *E2*, que es el encargado de regular la expresión de *E6* y *E7*, y por tanto se produce la expresión constitutiva de estas oncoproteínas [25]. La integración de VPH puede además producirse en regiones transcripcionalmente activas, por lo que es frecuente que provoque la disrupción de genes supresores de tumores, promoviendo la transformación maligna de las células afectadas al no ser detectados y reparados los daños del DNA [26].

I.1.4. Clasificación de los VPH

De entre los más de 150 genotipos de VPH descritos, solo 12 tipos son capaces de causar cáncer (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, y 59) [27]. Son los conocidos como genotipos de alto riesgo (AR-VPH). Otros genotipos, clasificados como de bajo riesgo (BR-VPH), son capaces de causar lesiones

I. INTRODUCCIÓN

benignas, como verrugas o papilomatosis en diferentes tejidos epiteliales, incluyendo las mucosas anogenitales, pero también la piel o el aparato respiratorio [28].

La diversidad de tropismos y enfermedades causadas por los diferentes genotipos de VPH sugiere una adaptación evolutiva siguiendo diferentes estrategias, es decir, sirviéndose de diferentes procesos celulares, para optimizar la producción de nuevas partículas víricas mientras aseguran la evasión del sistema inmune [20].

Taxonómicamente, los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, y se ha establecido unos criterios para clasificarlos según la similitud de la secuencia del gen *L1* [29]. Se han establecido 5 géneros (*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Mu-*, y *Nu-papillomavirus*), cuya secuencia de *L1* es al menos un 60% idéntica. Dentro de cada género existen diferentes especies (identidad de *L1* >70%), que no necesariamente son indicativas de los tejidos que son capaces de infectar. De mayor interés en este proyecto es el género *Alphapapillomavirus*, que infecta la mucosa genital y que incluye los 12 tipos AR-VPH (identidad de *L1* >90%) repartidos en 4 de sus 14 especies (Figura 4-A) [19].

Dentro de los AR-VPH, destaca el VPH16 por ser, de lejos, el tipo que más frecuentemente se encuentra en las lesiones precancerosas y en casos de cáncer. A nivel de secuencia, el VPH16 es muy similar a otros genotipos que poseen una capacidad oncogénica más reducida [19]. Sin embargo, hoy en día no se han encontrado las diferencias que determinan su mayor potencial oncogénico. A nivel epidemiológico, el VPH16 está presente en el 50% de cánceres de cérvix [30]. También es el causante de la mayoría de los cánceres de orofaringe asociados a VPH [9]. En la vulva, región anatómica en la que más nos centramos en este proyecto, el VPH16 está presente en el 77% de lesiones precancerosas y 72% de los casos de cáncer positivos a VPH [31].

El advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación ha permitido analizar el genoma completo de VPH de miles de muestras clínicas, identificando variantes dentro de los distintos tipos de AR-HPIV. Estas variantes se subclasifican en linajes (90-99% de identidad en todo el genoma, anotados con una letra mayúscula) y sublinajes (99-99,5% de identidad en todo el genoma, anotados con un número adicional) [32], [33]. En el caso del VPH16 existen 4

I. INTRODUCCIÓN

linajes con varios sublinajes dentro de cada uno (Figura 4-B). La distribución geográfica de los distintos sublinajes es desigual [30], [34]. La variante A1 es la más prevalente en todo el mundo, A3 y A4 son más frecuentes en Asia, los linajes B y C en África, D2 en América y B4, C4 y D4 en el norte de África [34] (Figura 4-B).

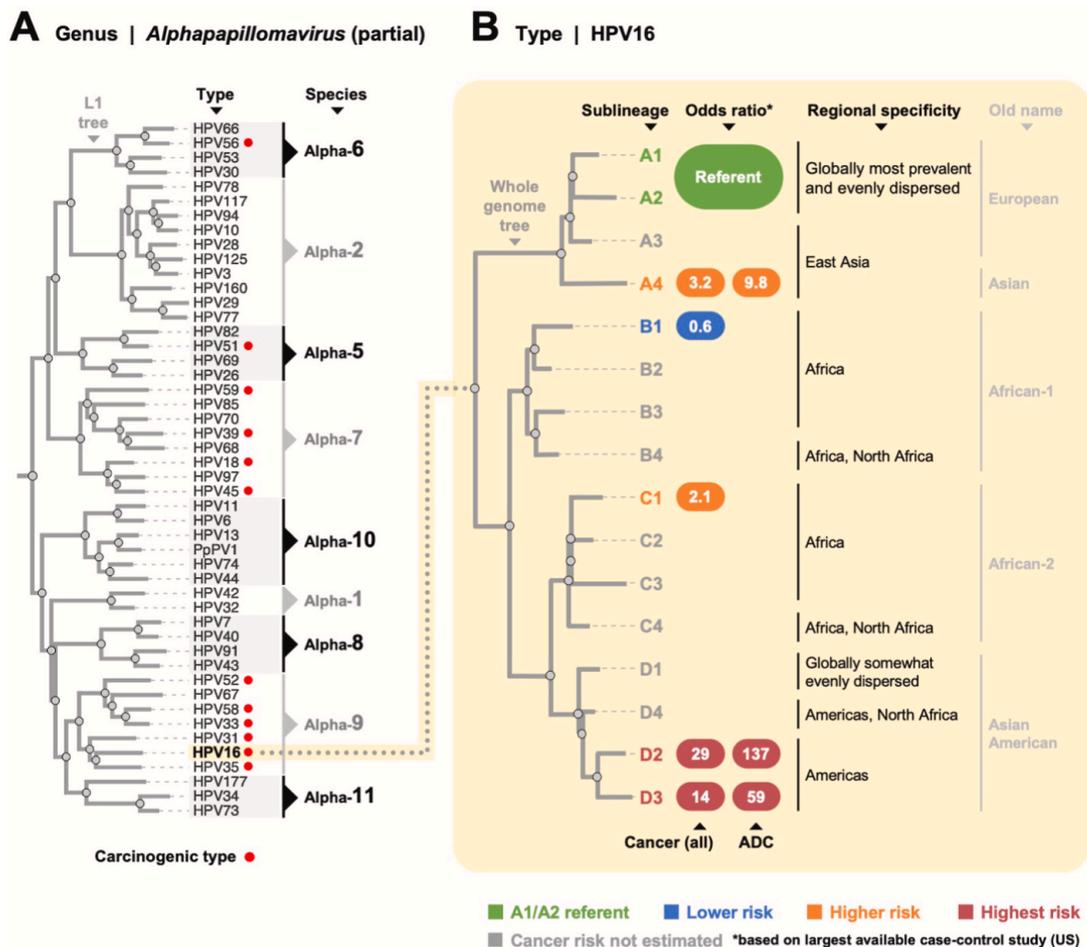


Figura 4 Clasificación taxonómica de los VPH de alto riesgo. A) Relación evolutiva entre los tipos VPH de alto riesgo de cáncer en función del porcentaje de identidad de la secuencia del gen L1. Los tipos de VPH de alto riesgo pertenecen a diferentes especies del género *Alphapapillomaviridae*. Los tipos carcinogénicos están marcados con un asterisco rojo. B) Relación evolutiva entre los diferentes linajes (A, B, C, D) y sublinajes (A1-4, B1-4, C1-4 y D1-4) del VPH16, de acuerdo con el grado de identidad de la secuencia de sus genomas completos. El riesgo de cáncer (Odds ratio) está indicado para algunos sublinajes, así como las áreas geográficas donde son más prevalentes. Figura tomada de Nelson 2023 [19].

Cabe resaltar que estudios realizados en cérvix han demostrado que ciertos sublinajes son más propensos a causar cáncer y lesiones precancerosas, como es el caso de A4, C1, D2 y D3 [30]. Además, este riesgo aumenta significativamente cuando un sublinaje concreto infecta a una mujer de determinada etnia, como es el caso de A4 en mujeres asiáticas, o el de D2/D3

en mujeres hispanas. Estas diferencias se deben a un largo proceso evolutivo en el que las diferentes variantes probablemente han co-evolucionado con sus huéspedes para optimizar su ciclo viral, adaptándose mejor a una etnia o raza que a las demás [19].

I.2. Cáncer de vulva y lesiones precursoras

El cáncer de vulva es un cáncer ginecológico poco frecuente, con una incidencia de 0,5-1,5 casos por cada 100.000 mujeres al año [31] y 17.000 muertes causadas en 2020 [35]. La mayoría de los cánceres de vulva son de tipo escamoso [36], [37], [38] (VSCC; por las siglas en inglés de *Vulvar Squamous Cell Carcinoma*) y se producen en los labios mayores de la vulva, aunque en menor medida también ocurren en los labios menores o el clítorix [39]. A diferencia del cérvix, donde el VPH parece ser necesario para causar cáncer [40], en la vulva una fracción notable de casos son independientes de la infección por VPH [31], [39], [41].

Existen, por tanto, dos vías de carcinogénesis que dan lugar a los VSCC, una asociada a la infección persistente por VPH, y otra independiente de VPH. En ambos casos se originan a partir de lesiones precursoras intraepiteliales en el que las células sufren desregulación de su funcionamiento normal y la acumulación de errores genéticos [42]. Un porcentaje de lesiones se terminan eliminando espontáneamente por el sistema inmune, mientras que otras van aumentando su grado de severidad hasta dar lugar a un cáncer invasivo.

I.2.1. Terminología de las lesiones precursoras en vulva

Desde que las lesiones precursoras del VSCC comenzaron a ganar relevancia clínica, la Sociedad Internacional de Estudio de Enfermedades Vulvares (ISSVD; acrónimo inglés de *International Society for the Study of Vulvar Disease*) introdujo el término VIN (del inglés *Vulvar Intraepithelial Neoplasia*) para designarlas [43], y se establecieron 3 grados de severidad (VIN1 a VIN3).

Posteriormente, la ISSVD introdujo cambios en la terminología para distinguir las lesiones precancerosas de alto grado (VIN2/3) asociadas e independientes a VPH. De esta forma, las asociadas a VPH se denominaron uVIN (del inglés, *usual-type VIN*) [44], [45] y las independientes a VPH como dVIN (del inglés, *differentiated-type VIN*).

I. INTRODUCCIÓN

A partir del 2012 se unificó la terminología para todas las lesiones precursoras del tracto anogenital asociadas a VPH, adoptándola también las lesiones vulvares [44]. Así, las uVIN pasaron a denominarse lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL; del inglés *high-grade squamous intraepithelial lesion*), aunque los términos uVIN y VIN2/3 todavía se encuentran frecuentemente en la literatura. Similarmente, las lesiones leves anteriormente denominadas VIN1, han pasado a clasificarse como lesiones escamosas de bajo grado (LSIL; del inglés *low-grade squamous intraepithelial lesion*). Estos cambios remarcan las diferencias entre las infecciones y verrugas genitales benignas (LSILs) de las lesiones precancerosas (HSILs), procurando evitar el sobretratamiento de lesiones benignas, en la mayoría de casos autolimitantes [45]. Las lesiones precursoras independientes a VPH han mantenido el término dVIN.

1.2.2. Lesiones vulvares independientes de VPH (dVIN)

Las lesiones precursoras independientes de VPH suelen ocurrir en mujeres de avanzada edad y presentan una progresión rápida con un alto riesgo de causar un carcinoma invasivo [46]. Suelen estar asociadas a factores como el tabaco, el número de parejas sexuales, el estado del sistema inmune y, sobre todo, a eventos de inflamación crónica del epitelio [41].

A nivel molecular, es muy frecuente encontrar mutaciones del gen supresor de tumores *TP53*, y en menor medida de *NOTCH1*, *HRAS* y el promotor de *TERT* [47], [48].

Histológicamente, muestran un epitelio aparentemente normal, con ausencia de atipia citológica y pleomorfismo nuclear. Es decir, se presentan como una lesión sutil y con frecuencia son infradiagnosticadas y confundidas con hiperplasias de epitelio escamoso [49].

1.2.3. Lesiones vulvares asociadas a VPH (HSILs)

Las HSILs, asociadas a la infección persistente por VPH, suelen ocurrir en mujeres más jóvenes, observándose un pico entre los 20 y los 35 años [50], [51]. Sin embargo, solo entre el 5 y el 16% de las HSILs no tratadas desembocan en un VSCC [52], [53], tras un largo periodo de progresión que habitualmente supera los 4 Años [38]. A pesar de ello, la práctica totalidad de HSILs son

I. INTRODUCCIÓN

tratadas, lo que supone estar sobretratando a pacientes que no lo necesitan. Se hace por tanto necesario identificar marcadores que sean capaces de diferenciar aquellas HSILs con mayor riesgo de progresión a VSCC.

A nivel macroscópico, las HSILs tienen apariencia variable, pudiendo observarse placas eritematosas o blanquecinas bien delimitadas o asimétricas, lesiones pigmentadas y/o ulceradas [41]. El prurito es el síntoma más frecuente. Histológicamente son idénticas a las lesiones intraepiteliales de alto grado en otras localizaciones del tracto anogenital [44]. Están caracterizadas por una marcada atipia nuclear y arquitectural, pérdida de maduración, alta relación núcleo/citoplasma, hiper cromasia y por presencia de mitosis en todo el grosor de la epidermis [54].

A nivel molecular, los escasos estudios centrados en vulva indican que las HSILs comparten muchas características con las lesiones cervicales de alto grado [55], [56], [57]. No obstante, el epitelio vulvar y cervical no son exactamente iguales, ya que no se ha identificado la llamada zona de transformación, como la más vulnerable al VPH del cérvix [8], [45]. Este hecho podría explicar por qué la incidencia de patología vulvar mediada por el VPH es menor, y además sugiere que en cada región anatómica se desencadenen algunos eventos específicos durante la tumorigénesis.

Los datos epidemiológicos, indican que el 80% de HSILs y el 85% de VSCCs positivos a VPH lo son a VPH16 [51], [58], el tipo de VPH más frecuente en todos los cánceres asociados al virus.

1.2.4. dVINs y HSILs son diferentes lesiones precursoras de VSCC

La incidencia de ambos tipos de lesiones precancerosas ha aumentado en las últimas décadas, siendo más notable el caso de las HSILs y sobre todo en la población más joven [37], [38], [50] (Figura 5). Este incremento se relaciona a cambios en los hábitos sexuales [59]. También se ha observado un crecimiento en la incidencia de los VSCC [60], [61], igualmente más acusado en pacientes menores de 60 años [37].

Por sus características macroscópicas e histológicas, es previsible un infradiagnóstico de lesiones dVIN, aunque existe consenso en la literatura en que alrededor del 80% de las lesiones precursoras de vulva son HSIL [56]. Sin

I. INTRODUCCIÓN

embargo, aunque los datos son variables geográficamente, se estima que solo el 40% de VSCCs son positivos a VPH [31], [37], [51], [62], [63], [64].

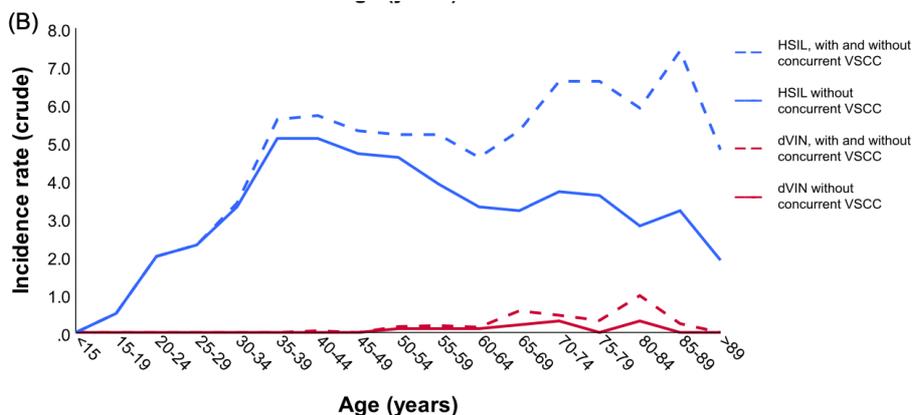


Figura 5 Incidencia de dVIN (rojo) y HSIL (azul) en diferentes grupos de edad. Líneas continuas incluyen casos sin VSCC concurrente, Líneas discontinuas incluyen casos con y sin VSCC concurrentes, Figura tomada de Thuijs 2021 [38]

Las dVIN tienen 3 veces más riesgo de convertirse en un carcinoma invasivo, además de un periodo más corto de progresión [38], [65]. La mayor acumulación de mutaciones somáticas biológicamente relevantes, principalmente observadas en genes supresores de tumores, podría explicar el mayor riesgo de progresión y recurrencia, y por tanto de peor pronóstico de las dVIN [48], [53] (Figura 6). En este sentido, cobra una mayor relevancia optimizar el manejo de ambos tipos de lesiones.

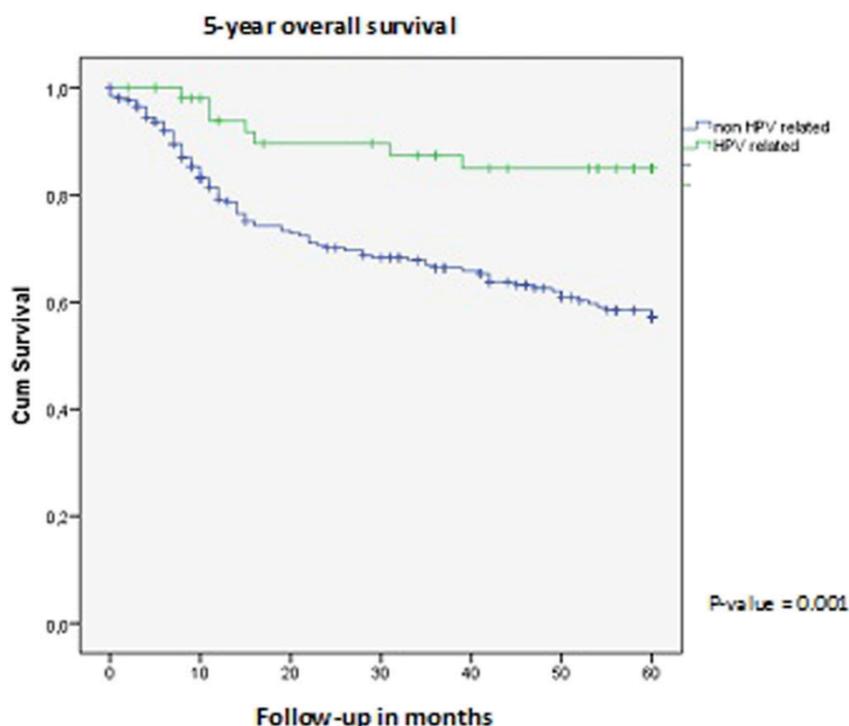


Figura 6 Gráfico de supervivencia a 5 años en pacientes de VSCC asociados (verde) e independientes (azul) a la infección por VPH. Figura tomada de Hinten 2018 [65].

I. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico diferencial entre dVINs y HSILs ha recaído tradicionalmente sobre la evaluación de la expresión de p16 y p53 mediante inmunohistoquímica. Las HSILs presentan sobreexpresión de p16 e inhibición de p53 [41], [56], mientras que las dVIN no suelen expresar p16, y se observa la expresión nuclear de p53 [66], aunque en muchos casos de cáncer sufre mutaciones somáticas y no es funcional [52]. Actualmente la presencia de DNA de VPH también es tomada en cuenta en el diagnóstico, como un factor de buen pronóstico [67].

Hoy en día no existen terapias diferenciales para el tratamiento de VSCC dependiendo de si su origen es dVIN o HSIL, y los ensayos clínicos en nuevas terapias son escasos [48]. En la mayoría de casos el tratamiento es la escisión quirúrgica, que comporta secuelas físicas y psicológicas graves para la paciente. Los VSCC conforman un grupo heterogéneo de cánceres, encontrando casos indolentes y otros muy agresivos [64]. Es importante identificar los factores que marcan la diferencia en el curso de la enfermedad para poder optimizar las decisiones clínicas y desarrollar tratamientos eficaces. Las diferencias histopatológicas y moleculares entre ambas lesiones precursoras sugieren que deben ser consideradas dos entidades distintas, con diferente pronóstico y tratamiento, al igual que los VSCCs que progresan a partir de ellas [41], [52], [64].

I.3. Biología molecular del cáncer asociado a la infección por VPH

I.3.1. Dianas celulares de E6 y E7

Como se ha explicado anteriormente, las oncoproteínas E6 y E7 de VPH se expresan desde los primeros estadios de infección [4], [6], [19], [68], interaccionando con la maquinaria celular de la célula huésped con el objetivo de optimizar la producción de nuevos viriones (Figura 7). Entre sus funciones principales está retrasar la diferenciación del epitelio, promover la proliferación celular e impedir la detección del sistema inmune para evitar la apoptosis de las células infectadas [14], [69], [70]. La expresión continua de las dos oncoproteínas es esencial tanto para mantener la infección en el ciclo viral normal, como para la progresión de las lesiones [71].

I. INTRODUCCIÓN

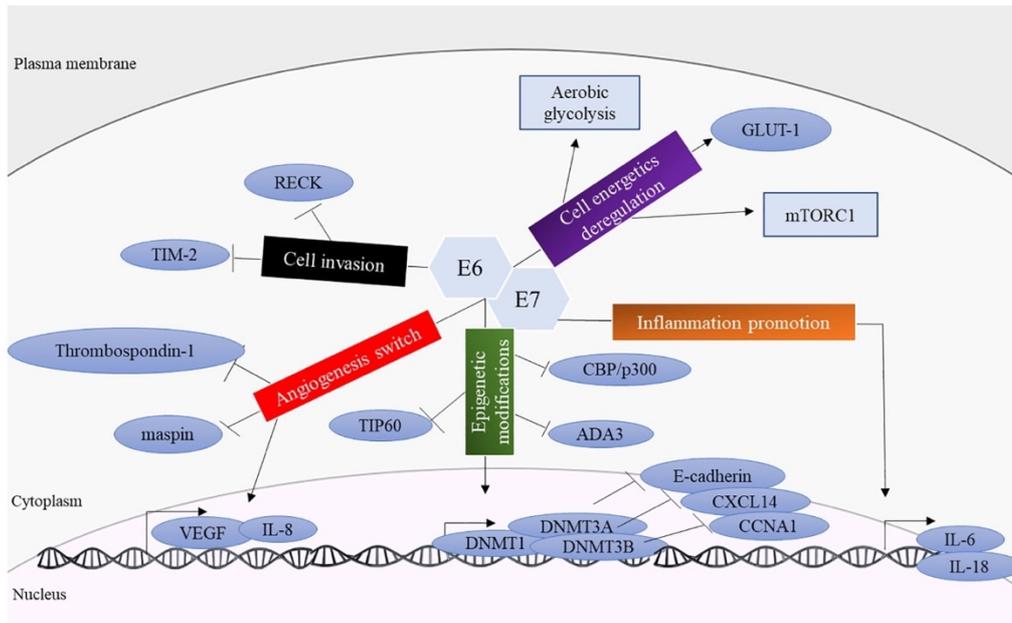


Figura 7 Funciones biológicas y proteínas con las que interacciona conjuntamente las proteínas E6 y E7 de VPH. Imagen tomada de Estevao 2019 [15].

La diana principal de E7 (Figura 8) es la proteína del retinoblastoma (pRb), encargada de modular la activación del ciclo celular. Al inhibirla o degradar pRb, se elimina la represión del factor de transcripción E2F, que controla la expresión de genes involucrados en el ciclo celular, como son las ciclinas A y E [72]. De esta forma, E7 promueve que las células de las capas basales pasen de la fase G1 a la S del ciclo celular, promoviendo la proliferación de células infectadas [15], [73].

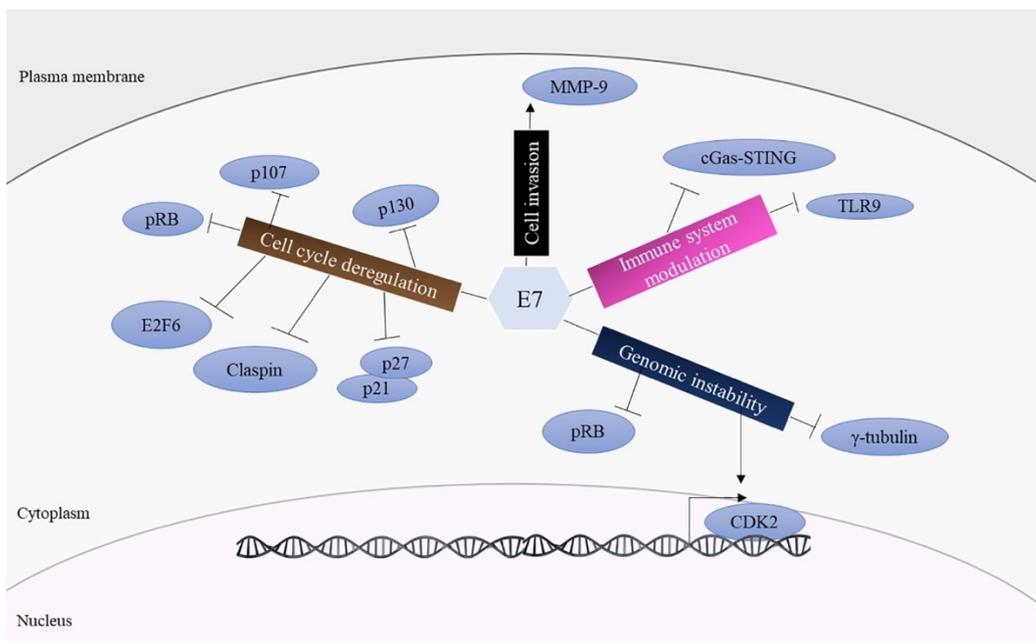


Figura 8 Funciones biológicas y proteínas con las que interacciona directamente la oncoproteína E7 de VPH. Imagen tomada de Estevao 2019 [15].

I. INTRODUCCIÓN

Sin embargo, también se ha descrito la interacción directa de E7 con un buen número de otros factores de transcripción, como son STAT1, NF- κ B, IRF1, SMAD2/3, TBP, Miz 1, B-Myb, c-Myc, c-Jun, c-Fos, E2F1, y E2F6 [74]. Esta actividad sugiere una alteración transcripcional profunda que cambia la fisiología de la célula, que debería ser detectada por el sistema inmune y acabar con la muerte programada de la célula infectada. Sin embargo, E6 y E7 parecen cooperar para evitar dicha detección [69].

La oncoproteína E6 de VPH también interacciona con un buen número de proteínas y factores de transcripción celulares (Figura 9), desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento del genoma episomal, asegurando la distribución equitativa de copias en las divisiones mitóticas [75]. Además, E6 inhibe la actividad de las proteínas E6AP y p53, reguladoras de la apoptosis, un evento que cabría esperar como consecuencia de la actividad de E7 [76].

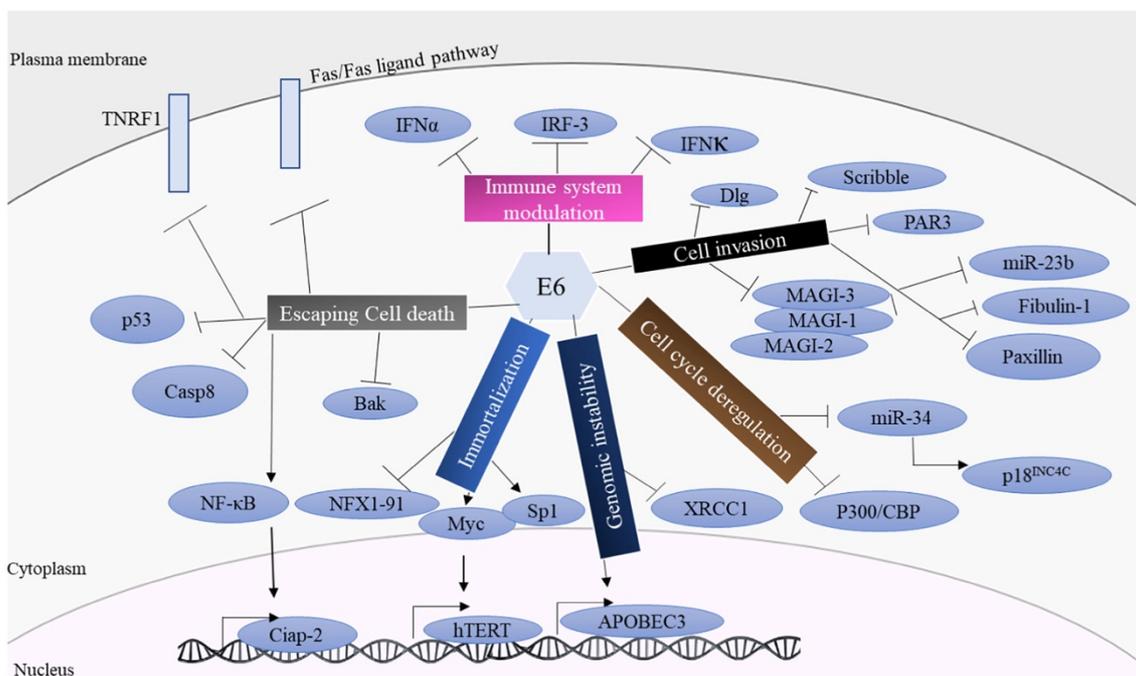


Figura 9 Funciones biológicas y proteínas con las que interacciona directamente la oncoproteína E6 de VPH. Imagen tomada de Esteveao 2019 [15].

La inhibición de p53 es esencial para el ciclo viral del virus, ya que tanto los tipos de alto como de bajo riesgo son capaces de inhibir su actividad [77]. No obstante, solo los tipos de alto riesgo provocan su degradación, y lo hacen por diferentes vías [78], [79], [80]. Esto, junto con el alto grado de mutaciones somáticas encontradas en el gen *TP53* en los casos de VSCC independientes a VPH [47], indica la importancia de la inactivación de p53 en la carcinogénesis.

I. INTRODUCCIÓN

La proteína E6 además es capaz de inhibir otras rutas metabólicas y de señalización, como Notch1, involucrada en la diferenciación del epitelio [81]. También promueve la degradación de la proteína tuberina, promoviendo la activación de la vía regulada por mTor, la traducción de proteínas y la proliferación celular [82], [83].

En la evasión del sistema inmune, E6 interacciona con IRF3, IFN- α , IFN- κ , y junto con E7 inhiben citoquinas como TNF- α , TGF- β y varios componentes del interferón [69], [84]. Estas interacciones inhiben la respuesta de la inmunidad innata, evitando la muerte celular [85].

Las múltiples actividades de E6 y E7 descritas, tienen como objetivo optimizar el ciclo viral del virus. Sin embargo, es necesaria una regulación muy precisa de E6 y E7 para que la célula infectada sobreviva. Cuando las oncoproteínas se sobreexpresan, la célula comienza a acumular errores genéticos cuyo resultado final puede ser su muerte por no ser viable, la detección y eliminación por el sistema inmune o, en algunos casos, la transformación maligna que desemboca en un tumor.

La mayoría de las alteraciones celulares descritas se han identificado en muestras cervicales o en estudios in vitro. También se conoce que los distintos tipos de VPH tienen mayor afinidad por determinadas células epiteliales, siguiendo estrategias diferentes para completar su ciclo viral. Sin embargo, a partir de la evidencia ya existente, se prevé que los AR-VPH actúen de manera similar en distintas regiones anatómicas, como la vulva, que es el foco de interés de este proyecto [39], [41].

1.3.2. El papel de APOBEC en la carcinogénesis

La familia APOBEC3 (cuyo nombre en inglés es *apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3*) conforma un sistema de defensa antiviral intracelular capaz de reconocer y editar DNA exógeno. APOBEC3 tiene actividad citidin-deaminasa, reconoce el patrón TpCpW (W = A o T) y sustituye la C por una T. De esta forma, promueve el aclaramiento del VPH creando nuevos epítomos reconocibles por el sistema inmune o por la inviabilidad del virus debido a la acumulación de mutaciones [19].

I. INTRODUCCIÓN

Curiosamente, se ha demostrado que la expresión de E6 y/o E7 en cultivos celulares aumenta la actividad de algunos miembros de APOBEC3 [86], [87]. El mismo efecto se ha observado en células infectadas y cánceres de cérvix y orofaringe [88]. Esta actividad alterada de APOBEC3 deriva en la introducción de mutaciones en el genoma de la célula infectada, lo que, sumado a la inhibición de supresores de tumores como p53, puede dar lugar a inestabilidad cromosómica y la acumulación de mutaciones. Varios estudios sugieren un papel fundamental de la desregulación de los genes de la familia APOBEC3 en la oncogénesis de cérvix y orofaringe mediada por VPH [88], [89], [90], [91] (Figura 10). Actualmente no se ha demostrado si APOBEC3 juega un papel similar en el cáncer de vulva asociado a VPH.

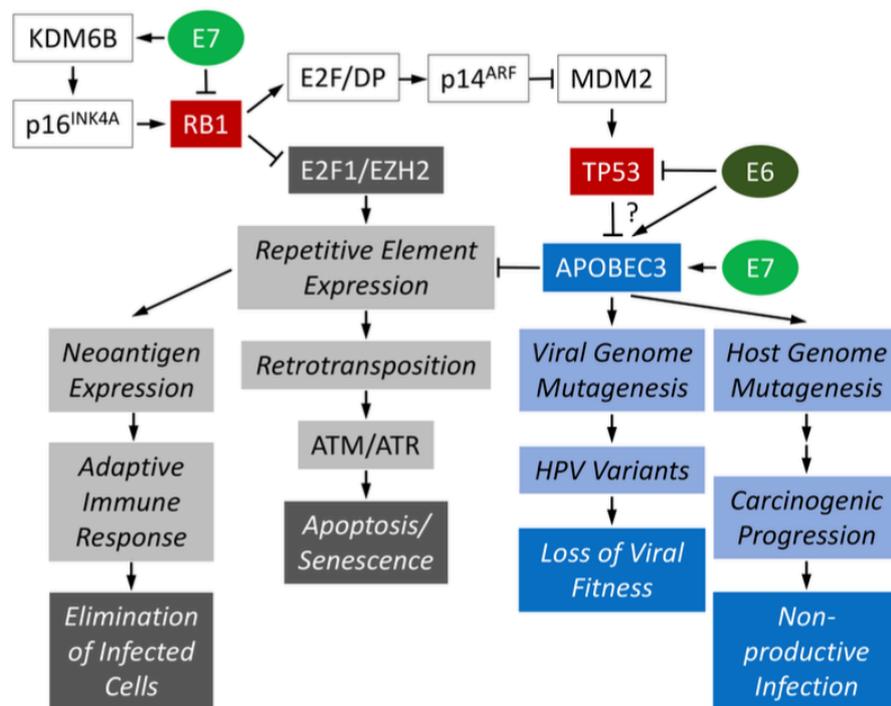


Figura 10 Efectos moleculares en las células debidos a la activación de APOBEC3 por E6 y E7, Imagen tomada de Wallace 2018 [92].

Cabe destacar la paradoja de que el propio VPH promueva la activación de APOBEC3, ya que dificulta su viabilidad por medio del aclaramiento o la carcinogénesis, donde el virus no puede completar su ciclo productivo. Se cree que esta actividad viral se mantiene evolutivamente porque las mutaciones producidas por APOBEC3 introducen variabilidad en los genomas de VPH, pudiendo ser rentable para el virus [87], [91], [92].

I. INTRODUCCIÓN

1.3.3. Alteraciones transcriptómicas en la carcinogénesis mediada por VPH

Las interacciones previamente descritas de E6 y E7 con diferentes factores de transcripción de las células infectadas, tiene como consecuencia la alteración global del transcriptoma de la célula huésped. Esta alteración aumenta en consonancia con el grado de lesión, siendo en ocasiones difícil establecer cuáles son causa o consecuencia en la carcinogénesis asociada a VPH.

Existen numerosos estudios demostrando la expresión génica desregulada en casos de cáncer mediado por VPH [93], [94], [95]. La mayoría de los genes alterados están implicados en la regulación del ciclo celular, la proliferación celular, apoptosis y regulación de la respuesta inmune, lo que concuerda con las dianas afectadas por las oncoproteínas E6 y E7.

En un estudio [96] donde se analizaron los perfiles de expresión de RNA en la carcinogénesis de 3 áreas ginecológicas (el cérvix, el endometrio y la vulva) se observó un 15-40% de solapamiento en los genes diferencialmente expresados en cáncer. Al analizar las rutas metabólicas y funciones biológicas de los genes alterados, se observó un solapamiento mucho mayor. Las rutas metabólicas más afectadas están relacionadas con la regulación del ciclo celular y la apoptosis. A pesar de ser rutas muy similares, los resultados de este estudio indican que el proceso de carcinogénesis puede ocurrir por diferentes vías, aunque termine afectando a la célula de manera similar.

Respecto al cáncer de vulva, son pocos los estudios existentes analizando específicamente los perfiles de expresión de RNA en VSCCs [48], [60], [97], [98] y solo se ha descrito un perfil en lesiones precursoras de la vulva [55].

Los resultados de los estudios en vulva coinciden en general con lo ya comentado en otros cánceres asociados a VPH y las actividades de E6 y E7. Todos los estudios analizados destacan la sobreexpresión de genes relacionados con la regulación del ciclo celular y la proliferación, así como la inhibición de genes supresores de tumores, genes relacionados con la regulación hormonal y otros involucrados en la adhesión celular, lo que promueve la invasión de otros tejidos. También destaca la alteración de la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta inmunitaria [56], y la sobreexpresión de genes de reparación del DNA en los VSCCs positivos a

I. INTRODUCCIÓN

VPH [60]. Esto podría explicar la menor acumulación de mutaciones somáticas respecto a los VSCCs independientes de VPH [53].

Respecto a la expresión de RNA en las lesiones precursoras, los resultados indican que en las HSILs se sobreexpresan genes relacionados con la proliferación celular, además de forma independiente a la señalización por hormonas, ya que varios receptores y ligandos están inhibidos. También cabe destacar que no se observa una desregulación significativa de genes relacionados con la angiogénesis y la apoptosis [55]. Las HSILs constituyen por tanto una enfermedad premaligna, en la cual ya se observan algunos rasgos distintivos del cáncer (los conocidos en inglés como *hallmarks of cancer*).

Los estudios analizados presentan algunas limitaciones. La limitación principal es utilizar muestras de tejido sano para establecer la expresión basal. Esto impide identificar los factores que determinan la progresión a cáncer. Así, las observaciones en HSILs [55] indican que hay un aumento de la proliferación celular, un evento necesario, pero no suficiente para progresar a cáncer. En el estudio de Pappa y colaboradores [97] se hace el ejercicio de comparar los resultados obtenidos en 6 muestras VSCC (solo 1 es positiva a VPH) con los de las HSILs de Santegoets y colaboradores [55]. Aunque aporta una información útil, no parece ideal comparar ambos conjuntos de muestras al tratarse de lesiones con diferente origen. De hecho, los estudios de Kolitz *et al.* [98] y Prieske *et al.* [60] reflejan que las muestras positivas y negativas a VPH son diferenciables en función de sus patrones transcripcionales.

Cabe destacar que no se ha identificado ningún estudio que compare los perfiles de expresión de RNA entre muestras HSIL y VSCC positivas a VPH. Tampoco se ha encontrado ningún estudio que analice si diferentes tipos de VPH provocan diferentes alteraciones transcripcionales en el epitelio vulvar infectado, pudiendo indicar que utilizan diferentes vías oncogénicas.

1.3.4. RNAs reguladores en la carcinogénesis mediada por VPH

El Proyecto Genoma Humano desveló que solo el 1,5-2% del genoma corresponde a genes que codifican proteínas [99]. Posteriormente el Proyecto ENCODE y estudios posteriores [100], [101] revelaron que, sin embargo, la mayor parte del genoma se transcribe a RNAs sin aparente función. Este

I. INTRODUCCIÓN

fenómeno, conocido como transcripción penetrante (o *pervasive transcription* en inglés), supone un gran gasto energético para las células como para no tener ninguna función o beneficio evolutivo [102], [103].

La revolución de las tecnologías NGS ha demostrado que la transcripción del conocido como 'DNA basura' produce moléculas de RNA no codificante (ncRNAs) que desempeñan funciones fundamentales para el correcto funcionamiento de todos los tipos de células eucariotas.

Se han identificado numerosos tipos de ncRNAs, cuya transcripción y degradación está más regulada de lo que en un principio se esperaba. Se han dividido en dos grandes clases en función de su tamaño, mayor o menor a 200 nucleótidos. Dentro de cada clase se han establecido diferentes tipos en función de su biogénesis, localización celular y las funciones que desempeñan, casi siempre de señalización o de regulación de las funciones celulares. Los dos tipos más estudiados son los *long*-ncRNAs (o lncRNAs) y los microRNAs (o miRNAs).

Los lncRNAs es un grupo heterogéneo de ncRNAs en el que muchos se transcriben por promotores convencionales, igual que un gen codificante de proteína, pero también hay otros que se transcriben por otras vías no canónicas (Figura 11) [104], [105], [106]. Sus funciones son esencialmente de regulación de la expresión génica, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional [107], [108], participando en procesos biológicos fundamentales como el desarrollo embrionario y diferenciación celular, la respuesta a eventos de estrés celular, la regulación del ciclo celular y la tumorigénesis [104], [109], [110], [111].

También se han descrito lncRNAs que contienen pequeños marcos de lectura abiertos (conocidos en inglés como *small ORFs* o *smORFs*), con capacidad de entrar en los ribosomas [110], [112]. La traducción a proteínas de algunos lncRNAs es una forma de regular al nivel de la traducción la expresión de otros RNAs mensajeros, sobre todo cuando se expresan a la vez por el mismo promotor [113]. Cabe resaltar que también se han detectado péptidos funcionales provenientes de algunos smORFs de lncRNAs, que podrían ser importantes como moléculas señalizadoras e incluso reguladoras [103], [114], [115].

I. INTRODUCCIÓN

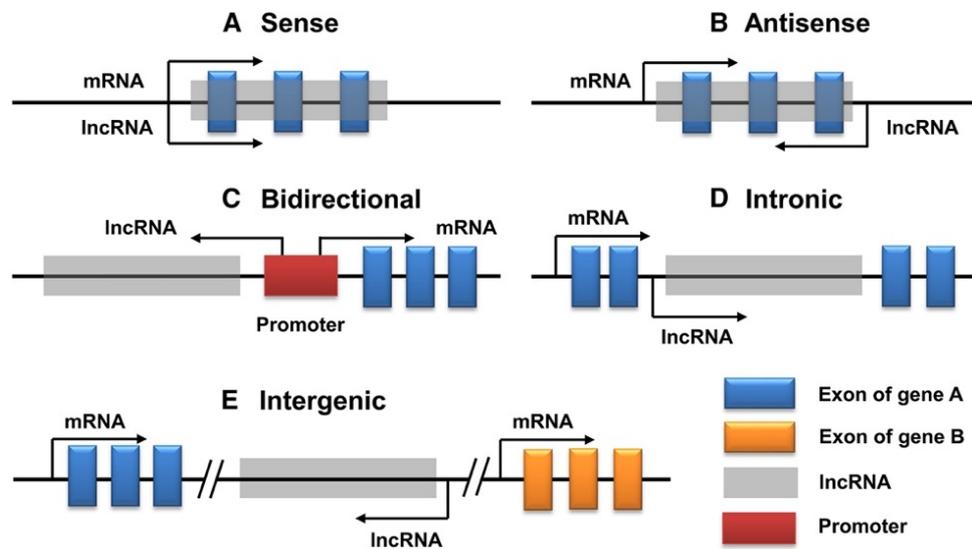


Figura 11 Esquema representativo de los diferentes orígenes genómicos de los lncRNAs. Imagen tomada de Liu 2021 [104].

Los miRNAs por su parte, son moléculas de RNA de cadena simple, con una longitud generalmente de 22 nucleótidos generados a partir de transcritos endógenos en regiones intergénicas y en intrones del genoma de la célula. Desempeñan funciones regulatorias y de señalización de manera similar a los lncRNAs, involucrados igualmente en procesos biológicos importantes, regulando grandes programas de transcripción durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular, la respuesta a eventos de estrés y amenaza, y también juegan un papel importante en diferentes enfermedades, destacando su implicación en los procesos oncogénicos y de metástasis [116], [117], [118]. Además, los miRNAs están muy conservados entre especies muy diferentes, lo que demuestra su gran importancia en estos procesos biológicos [119].

La producción de miRNAs maduros se encuentra bajo un estricto control, sometida a varios niveles de regulación tanto espacial como temporal [120] (Figura 12). Los genes que los producen son transcritos por la RNA polimerasa II, dando lugar a un largo pri-miRNA que adopta una estructura secundaria en forma de horquilla. Este pri-miRNA es procesado en el núcleo por un complejo llamado microprocesador, compuesto por una proteína del tipo RNasa III llamada Drosha y su cofactor llamado DGCR8. Con la ayuda de DGCR8, Drosha corta los extremos de la molécula de RNA en un sitio específico, dando lugar al pre-miRNA, que sale del núcleo gracias a la exportina 5 (EXP5) y la hidrólisis de una

I. INTRODUCCIÓN

molécula de GTP. Una vez en el citoplasma el pre-miRNA es procesado por Dicer, otra proteína del tipo RNasa III que corta la molécula cerca de la horquilla, dando lugar a un dúplex miRNA:miRNA de una longitud de 22 nucleótidos. Cada una de las hebras de este dúplex puede dar lugar a una forma madura, miRNA-5p y miRNA-3p (en función de su cercanía a cada uno de los extremos del pri-miRNA), aunque en muchos casos solo uno de los dos miRNAs es funcionalmente activo y el otro es degradado [121]. Los niveles de algunos miRNAs maduros también son modulados por algunos lncRNAs, a los que se unen competitivamente por complementariedad de secuencia, haciendo un efecto esponja [122], [123].

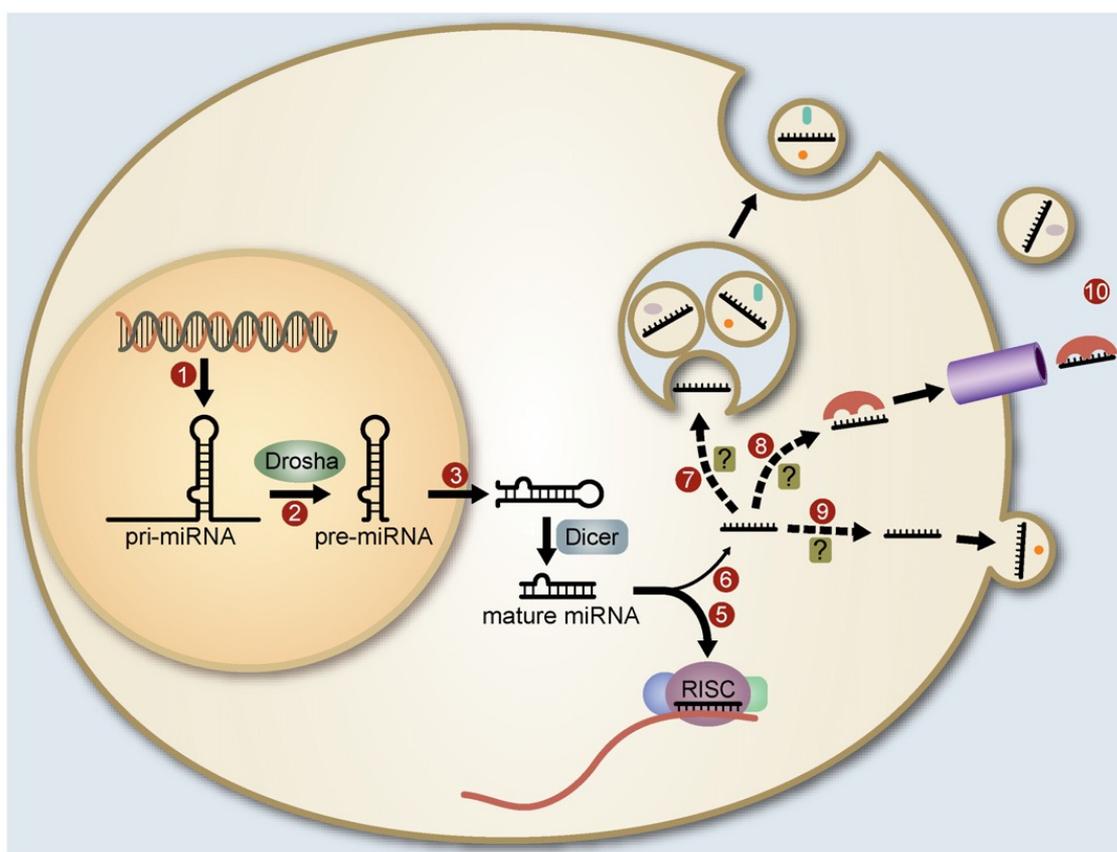


Figura 12 Esquema representativo del proceso de biogénesis, maduración y modos de acción de los miRNAs. Imagen tomada de Etheridge 2011 [119].

Los miRNAs se producen y actúan en las células, mostrando unos perfiles relativamente estables en condiciones fisiológicas. Algunos miRNAs son ubicuos y otros son específicos o se expresan preferentemente en un determinado tejido, en el cual ejercen su función. Recientemente se ha comprobado que cierta cantidad de miRNAs están presentes en fluidos circulantes, como la sangre, líquido cerebrospinal, orina o leche materna [124], [125], [126]. Son más

I. INTRODUCCIÓN

estables en el entorno extracelular que otros RNAs de mayor longitud, debido seguramente a que son transportados en exosomas o unidos a proteínas, evitando así la acción de ribonucleasas presentes en esos mismos fluidos [119]. Dado el papel central de los miRNAs en el desarrollo de enfermedades y su estricta regulación en condiciones fisiológicas, múltiples estudios han evaluado su potencial como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico [127], [128]. También se está explorando su potencial como agentes y dianas terapéuticas [129].

En las infecciones por virus capaces de provocar cáncer, como el VPH, el Epstein Barr virus o el HTLV, entre otros, se han identificado miRNAs alterados directa o indirectamente por la actividad viral, y dicha desregulación juega un papel clave en el proceso oncogénico al alterar la expresión global de la célula [130].

En la carcinogénesis mediada por VPH, existe evidencia científica de miRNAs desregulados en pacientes de cáncer y también en cultivos celulares que expresan las oncoproteínas E6 y E7 [131], [132], [133], [134].

En el caso específico del carcinoma de vulva asociado a la infección por VPH solo existen, hasta nuestro conocimiento, dos estudios analizando la expresión diferencial de miRNAs [135], [136]. El primer estudio [135] incluye muestras VSCC positivas y negativas a VPH, identificando 25 miRNAs cuya expresión es significativamente diferente entre ambos grupos. Además, al comparar la expresión entre todas las muestras VSCC, sin diferenciar la positividad a VPH, frente a un grupo control de tejido normal sano, identifican 79 miRNAs alterados. El análisis de sus mRNAs diana y sus funciones celulares coincide con las funciones generalmente observadas como alteradas en la carcinogénesis mediada por VPH.

El segundo estudio [136] se centra en el potencial como biomarcador pronóstico del miR-431-5p en sangre, observándose una asociación entre los niveles medidos y la supervivencia y también la recurrencia. En este estudio se incluyen muestras precursoras (dVIN y HSIL) y VSCCs previamente testadas para VPH. Sin embargo, no indican si se observan diferencias en la expresión del miRNA estudiado entre ambos grupos.

I. INTRODUCCIÓN

En definitiva, igual que en la literatura analizada de genes codificantes de proteínas, observamos que se tiende a considerar el VSCC como un todo, sin tener en cuenta el papel de VPH, lo que dificulta establecer los mecanismos moleculares implicados específicamente en la carcinogénesis inducida por VPH. En este sentido cabe destacar un estudio [132] en el que se compara la expresión de miRNAs entre muestras de cáncer cervical (positivos a VPH), y dos grupos de muestras de cáncer de orofaringe, uno positivo y otro negativo a VPH. Los resultados observados indican una mayor similitud entre los carcinomas positivos a VPH, que entre ambos grupos de muestras de orofaringe.

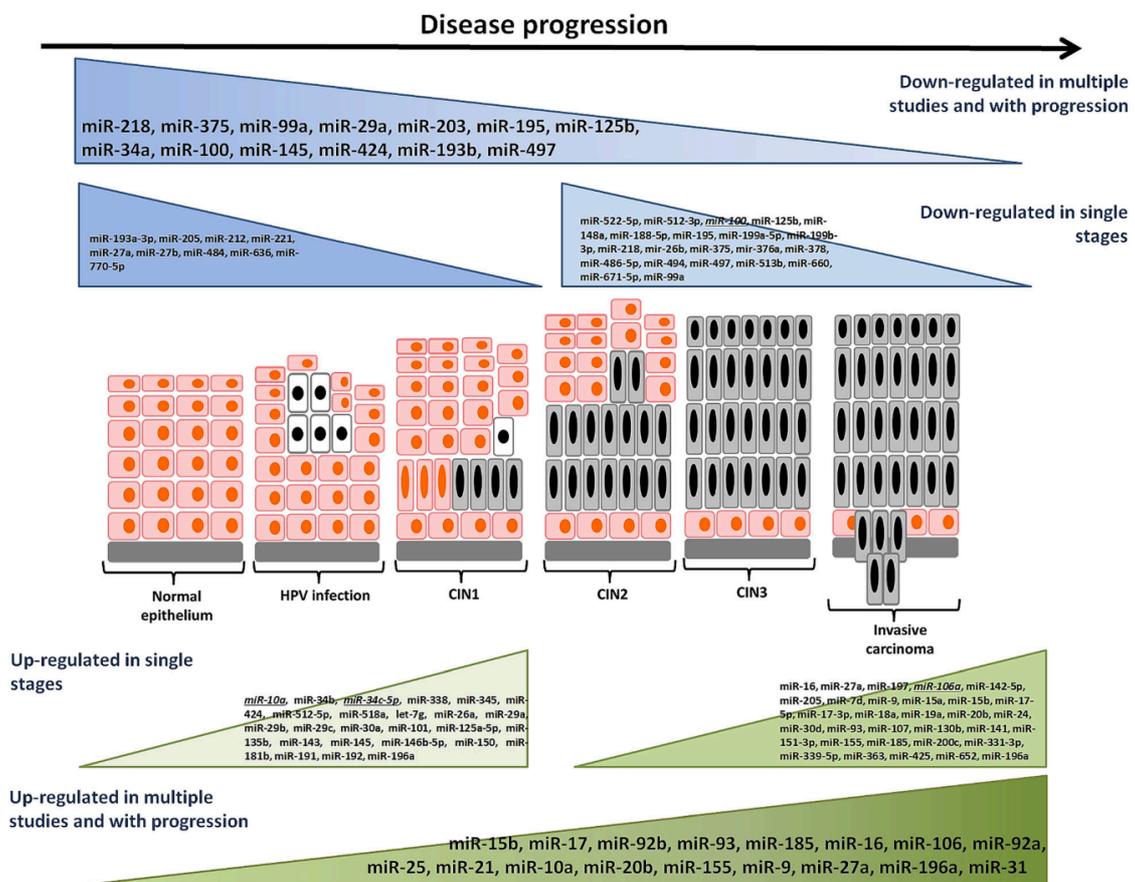


Figura 13 Representación esquemática de progresión a cáncer del epitelio cervical y los miRNAs que se han identificado como alterados en cada una de las etapas o grados de lesión. En azul, miRNAs infraexpresados; en verde, miRNAs sobreexpresados, comparado con tejido sano. Imagen tomada de Pardini 2018 [137].

Igualmente se ha observado el uso de tejido sano para establecer la línea basal de expresión de los miRNAs, cuando la desregulación global de la célula se observa desde los primeros estadios de infección [134]. Los resultados de otro estudio [137] indican que el número de miRNAs alterados aumenta con el grado de lesión, al menos en el cérvix (Figura 13). Dado que solo un porcentaje de

lesiones progresan hasta un carcinoma invasivo, es previsible que solo una fracción de los miRNAs alterados sea determinante en dicha progresión. Esto refuerza la necesidad de centrar la comparativa entre HSILs y VSCCs para identificar los miRNAs clave en la carcinogénesis.

1.3.5. La microbiota cervicovaginal y el VPH

Como se ha descrito en los apartados anteriores, la presencia de VPH no es suficiente para causar cáncer en el tracto genital femenino. Es necesaria la implicación de otros factores, y uno de los que están ganando mayor relevancia es la microbiota cervicovaginal (MCV), cuya composición se ve alterada desde los primeros estadios de la infección por VPH (Figura 14).

Las nuevas tecnologías de secuenciación también han permitido caracterizar las comunidades microbianas que cohabitan diferentes regiones anatómicas del ser humano, tanto en individuos sanos como en casos de enfermedad. Diversos estudios resaltan la importancia de la dominancia de determinadas especies bacterianas para que se puedan mantener unas condiciones óptimas para el correcto funcionamiento de determinados órganos.

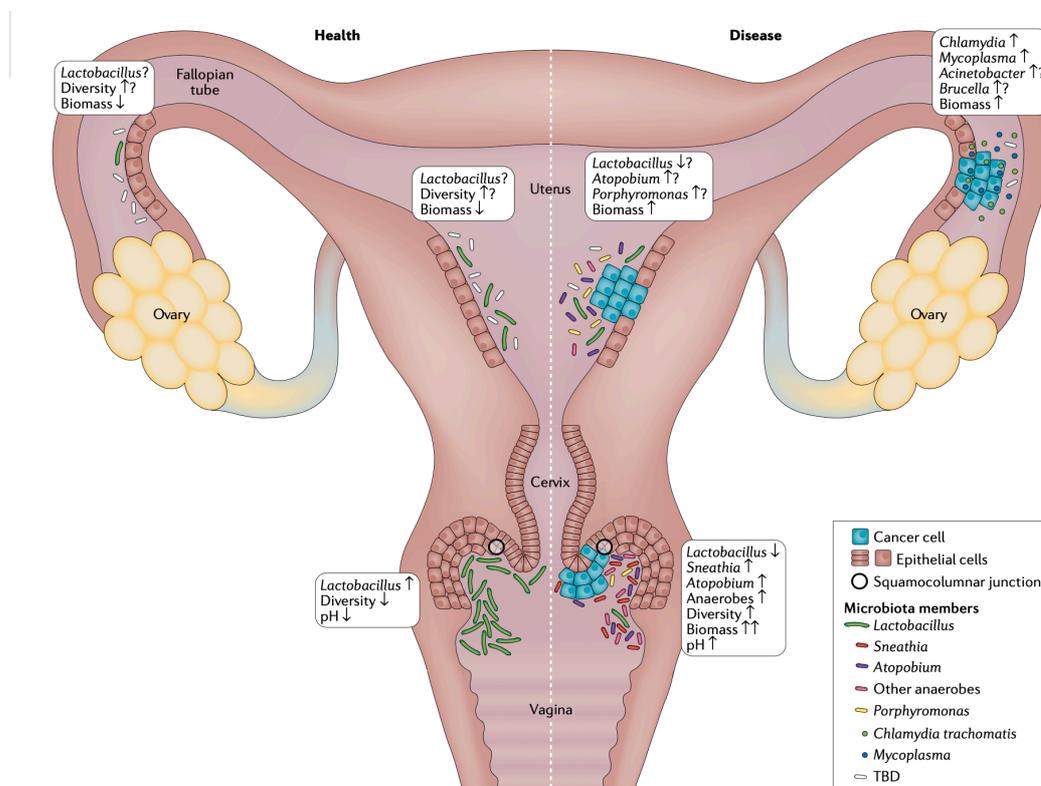


Figura 14 Diferencias en las comunidades microbianas que colonizan la cavidad cervicovaginal en mujeres saludables (izquierda) y en casos de cáncer ginecológico. Imagen tomada de Laniewski 2020 [138].

I. INTRODUCCIÓN

1.3.5.1. Relación entre microbiota cervicovaginal y patología asociada a VPH

En la cavidad cervicovaginal, la microbiota está dominada por especies del género *Lactobacillus* que mantienen un pH ácido, producen bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos y crea una barrera que impide la adhesión de microorganismos patógenos por exclusión competitiva, ayudando a mantener la homeostasis y la integridad de la capa mucosa del epitelio [138]. Una composición del microbioma saludable contribuye a una mejor respuesta inmune y también a un mejor pronóstico de los cánceres ginecológicos [138], [139].

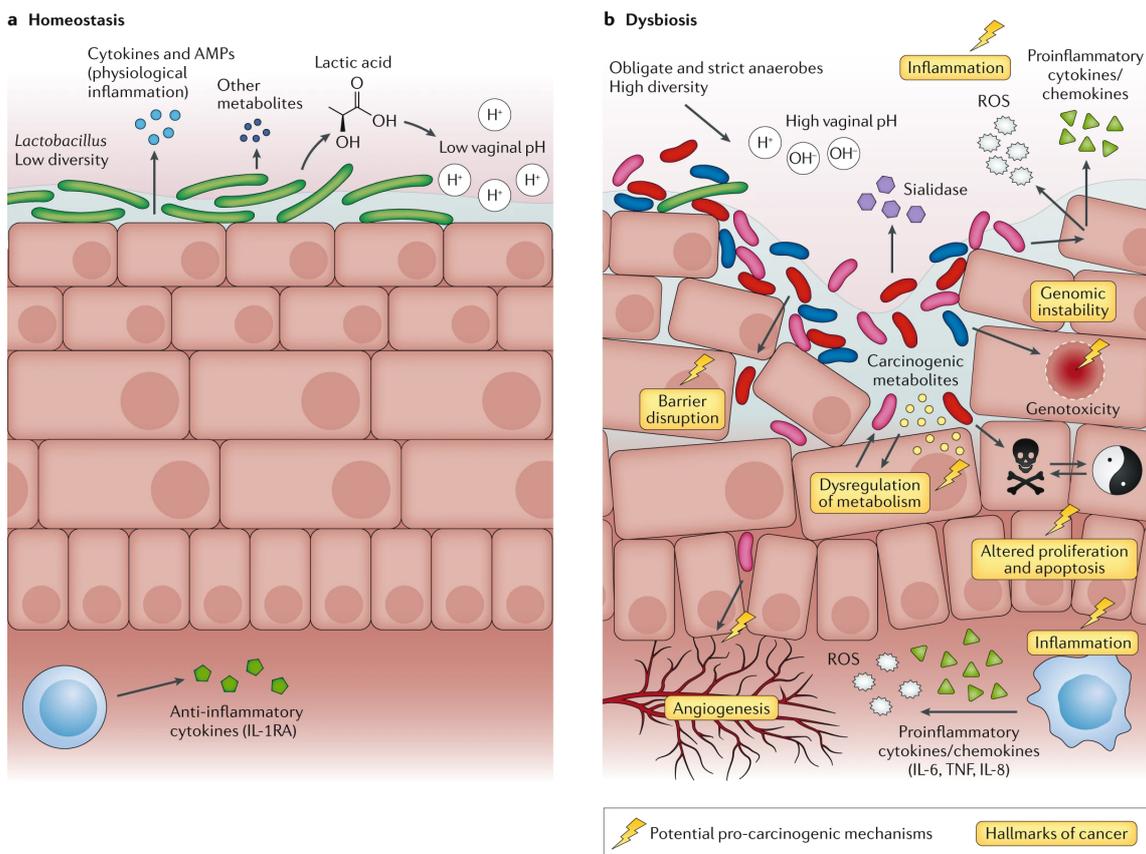


Figura 15 Efectos de la disbiosis en la microbiota de la mucosa cervicovaginal. Imagen tomada de Laniewski 2020 [138].

Existe una asociación entre la alteración del microbioma y el desarrollo de enfermedades en diversas regiones anatómicas, incluidos los cánceres ginecológicos (Figura 15). La disbiosis promueve una alteración de la respuesta inmunitaria y también eventos característicos de la carcinogénesis [140], [141]. Diversos estudios coinciden en que la alteración de la MCV conlleva la creación de un entorno proinflamatorio, la desregulación metabólica y la acumulación de especies reactivas del oxígeno, que producen daños en el DNA y la consecuente

I. INTRODUCCIÓN

inestabilidad genómica [138], [138], [139], [142], [143]. Se puede concluir, por tanto, que dichas alteraciones contribuyen a los cambios fisiológicos que provocan el inicio, la progresión e incluso determinan el pronóstico de los cánceres ginecológicos.

En las patologías genitales asociadas a la infección por VPH, la disbiosis de la MCV se observa desde los primeros estadios de la infección [142], [143], [144]. Diversos estudios identifican una caída de la abundancia relativa del género *Lactobacillus* y el consecuente aumento de otros géneros no protectores e incluso patógenos [138], [139], [142], [143], [145] que se va acentuando con el grado de lesión. Existe variabilidad entre estudios, pero los géneros que se ven más significativamente aumentados en, la más estudiada, patología cervical son *Gardnerella*, *Prevotella*, *Sneathia*, *Fusobacterium*, *Megasphaera*, *Atopibium* y *Dialister* [138], [139], [142], [143], [145].

1.3.5.2. Tipos de comunidades microbianas cervicovaginales (CSTs)

Como se ha descrito anteriormente, la dominancia del género *Lactobacillus* se asocia a un microentorno saludable, sin embargo, cada especie de *Lactobacillus* tiene algunas propiedades propias o se adapta mejor al entorno según la situación. Las 4 principales especies de *Lactobacillus* cuyo tropismo es la cavidad cervicovaginal son *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*, aunque también se pueden encontrar otras especies en menor medida. En un estudio [146] que analizó la microbiota cervicovaginal de 396 mujeres estadounidenses de diferentes etnias, se establecieron 5 tipos de microbiota cervicovaginal para mujeres en edad reproductiva (CST I-V; en inglés, 'Community State Type'). Cada grupo se define por las especies dominantes. Así, los CST-I, II, III y V están dominados por *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* respectivamente. Por su parte, el CST-IV se caracteriza por una composición diversa y una mayor abundancia de especies distintas a *Lactobacillus*.

En la patología cervical asociada al VPH, los cambios en el CST están asociados al desarrollo de lesiones y la progresión a cáncer [147]. Aunque es posible encontrar cualquier CST en todos los grados de lesión, incluso en mujeres sin infección, la proporción de mujeres con cada CST suele variar con el grado de lesión [147]. Se ha observado que la prevalencia de los CST-I y CST-V

I. INTRODUCCIÓN

desciende según crece el grado de lesión, mientras el CST-IV se convierte en el más prevalente [148].

1.3.5.3. El microbioma como herramienta de diagnóstico y tratamiento

Actualmente no está claro si la disbiosis es causa o consecuencia de la infección y las actividades del virus, aunque sí se ha demostrado que el VPH es capaz de alterar el microentorno del epitelio infectado [142]. Algunos estudios establecen una asociación entre la predominancia de un determinado género con el grado de lesión o el riesgo de cáncer de cérvix. Por ejemplo, *Gardnerella* parece ser un marcador de riesgo de cáncer [149]. El género *Sneathia* es predominante en las lesiones precancerosas HSIL, mientras otros como *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Dialister* son más preponderantes en las pacientes con cáncer [147], [150]. La identificación del tipo de microbiota o CST de las mujeres positivas a VPH también puede ser utilizado para establecer el grado de lesión o riesgo de progresión asociado a la infección por VPH [148].

La determinación de la composición de la MCV tiene el potencial para convertirse en una herramienta complementaria para el triaje de las pacientes positivas a VPH en los programas de cribado de cáncer cervical [144], [151]. Algunos estudios han utilizado los remanentes de citologías líquidas para analizar la composición del microbioma [152]. También se han realizado pruebas para optimizar el aislamiento del DNA bacteriano presente en la muestra [153], dado que los métodos utilizados para aislar el DNA de VPH no necesariamente son eficaces para aislar el de algunas especies bacterianas.

Algo adicional a tener en cuenta en este sentido es la introducción del automuestreo en los programas de cribado. Varios dispositivos para la recolección de la muestra cervicovaginal por parte de la propia paciente han demostrado ser eficaces para la detección del DNA de VPH. Además, el automuestreo ha demostrado una buena aceptabilidad y su implantación crecerá en los próximos años [154]. Casi todos los análisis de la MCV, sin embargo, se han realizado en muestras recogidas por un profesional, y habitualmente recogidas y almacenadas con ese propósito. No existen apenas datos publicados que indiquen si el método de recolección de la muestra puede influir en la composición de la MCV, es decir, si los resultados son comparables entre la muestra recogida por el profesional y las automuestras. Este hecho puede

resultar clave para la futura implementación de la MCV como un marcador clínico complementario.

Por otro lado, también se está evaluando el potencial del microbioma cervicovaginal como diana terapéutica. Algunos estudios indican que mediante el tratamiento con probióticos y prebióticos, así como utilizando trasplantes de microbiota, se puede promover el mantenimiento de una composición de la microbiota cervicovaginal saludable [138], [139], [155]. De esta forma se puede contrarrestar el efecto de los factores que la alteran, como el tabaco, el mal funcionamiento del sistema inmune, el uso de anticonceptivos hormonales o el comportamiento sexual [139]. Curiosamente, estos factores coinciden en gran medida con aquellos factores ambientales asociados a un mayor riesgo de progresión a cáncer asociado a la infección por VPH [156]. No obstante, actualmente no existe ningún tratamiento aprobado para el tratamiento de la infección de VPH basado en la modificación de la MCV.

1.3.5.4. El microbioma de la vulva

En el caso de la patología vulvar no existe apenas literatura que evidencie una asociación con el estado de la microbiota, y ningún estudio ha demostrado una relación con la carcinogénesis mediada por VPH. Diversos estudios han analizado el microbioma de la vulva en mujeres sanas y también con diferentes patologías [157], [158], [159]. En la vulva se produce una transición gradual entre las microbiotas cervicovaginal, gastrointestinal y cutánea [159] (Figura 16). De hecho, se observan diferencias significativas en las comunidades microbianas presentes en los labios mayores y los labios menores. Los labios mayores tienen un perfil más parecido a la microbiota fecal, con mayor diversidad de géneros bacterianos, mientras la microbiota de los labios menores es muy similar a la cervicovaginal, con una mayor abundancia de especies de *Lactobacillus* [159]. Esta diferente composición podría tener alguna relación con la mayor incidencia de lesiones y cánceres en los labios mayores que en los menores [39], aunque no se ha descrito por el momento.

Dos estudios han caracterizado la composición del microbioma en lesiones vulvares precancerosas [157], [160]. Ambos analizan la microbiota en lesiones de tipo liquen escleroso, independientes de VPH, y de HSILs positivas a VPH, frente a controles sanos. Los resultados indican un aumento significativo de

I. INTRODUCCIÓN

algunos géneros en los tejidos con lesión HSIL, incluyendo *Prevotella*, y *Fusobacteria*, así como un descenso del género *Lactobacillus* y *Actinobacteria* comparado con el tejido sano adyacente. En el primer estudio [160] también se refleja una alteración de la microbiota fecal en pacientes HSIL, lo que sugiere alteraciones más allá del microentorno de la lesión y un intercambio microbiano entre diferentes nichos. La disbiosis de la microbiota fecal también se ha descrito en pacientes de cáncer cervical [161], [162].

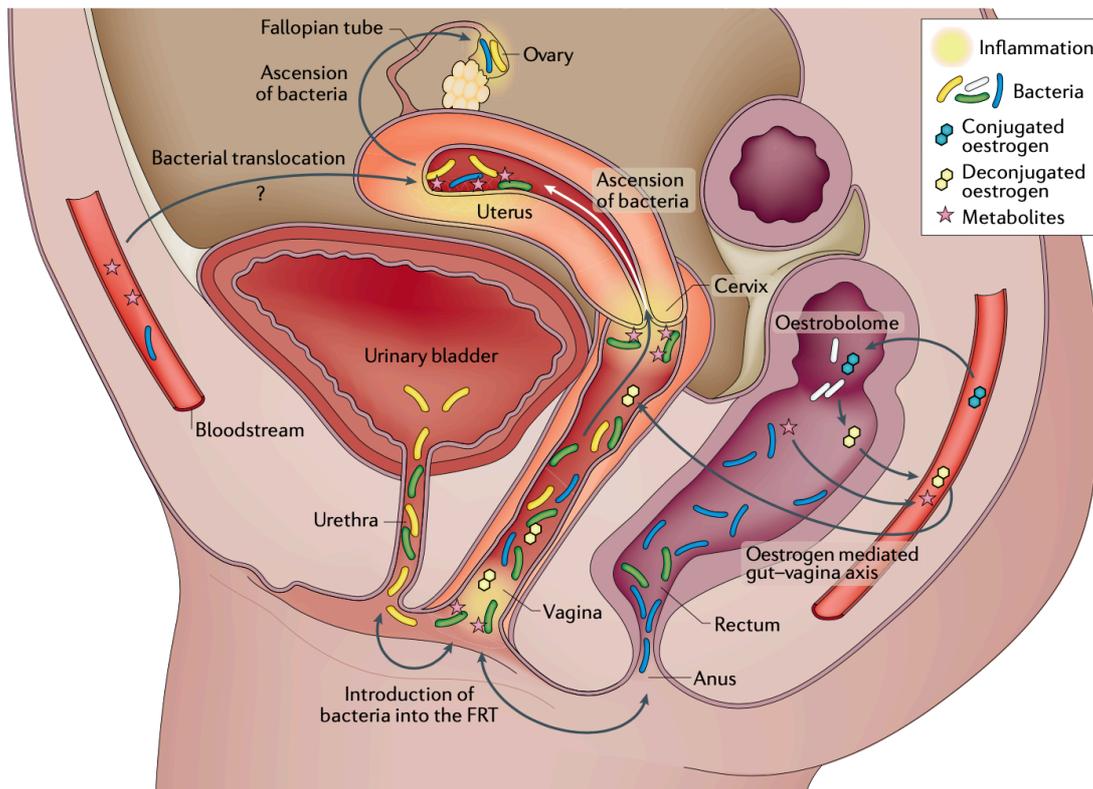


Figura 16 Intercambios entre la microbiota del tracto genital femenino y la microbiota intestinal. La vulva es una zona de transición gradual entre ambas comunidades microbianas. Imagen tomada de Laniewski 2020 [138].

A pesar de la menor disponibilidad de datos y las diferencias en las condiciones ambientales entre la vulva y el interior de la cavidad cervicovaginal, las alteraciones de la microbiota observadas en presencia de VPH son similares. Los estudios citados previamente sugieren cambios fisiológicos provocados por la actividad del VPH, promoviendo el descenso del género *Lactobacillus*, que es reemplazado por otras especies que eliminan la barrera protectora y favorecen el ciclo viral. De hecho, es frecuente encontrar múltiples focos de infección, incluso múltiples lesiones precursoras en pacientes positivas a VPH [56]. Cabe pensar que la alteración de la microbiota debida a la infección por VPH facilite la

I. INTRODUCCIÓN

colonización de nuevas áreas de la cavidad cervicovaginal por parte del virus, o bien provoque cambios fisiológicos que promuevan el desarrollo de lesiones epiteliales en otras zonas ginecológicas aparentemente menos vulnerables que la zona de transición del cérvix.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existen diferentes factores virales, ambientales y de las células hospedadoras que se asocian a un mayor o menor riesgo de progresión a cáncer mediado por la infección de VPH. Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos clave que determinan que un porcentaje de lesiones precursoras de alto grado (HSIL) progresen a un carcinoma invasivo.

El objetivo principal de este proyecto de doctorado ha sido el de identificar factores moleculares determinantes en la progresión a cáncer de lesiones de alto grado asociadas a la infección por el virus del papiloma humano. Para lograrlo se han utilizado dos aproximaciones:

- 1) El análisis de perfiles de expresión de mRNAs y miRNAs en muestras vulvares. Se estableció la hipótesis de que las diferencias en la expresión a nivel de RNA entre muestras HSIL y VSCC permitirán identificar rutas y procesos biológicos involucrados en la carcinogénesis de la vulva mediada por VPH. Además, las alteraciones transcripcionales podrían ser específicas para cada tipo de VPH y para cada variante de VPH16. Los objetivos específicos abordados han sido:
 - a. Identificación de mRNAs diferencialmente expresados en muestras HSIL y VSCC de vulva.
 - b. Identificación de mRNAs específicamente alterados en muestras de vulva positivas a VPH16 y sus diferentes variantes.
 - c. Identificación de miRNAs diferencialmente expresados en muestras HSIL y VSCC de vulva y los procesos biológicos en los que están involucrados.
 - d. Identificación de miRNAs específicamente alterados en muestras de vulva positivas a VPH16 y sus diferentes variantes.
- 2) El análisis de la composición de la microbiota cervicovaginal. Se ha establecido la hipótesis de que la composición de la microbiota cervicovaginal es un factor determinante para el desarrollo de cánceres ginecológicos asociados al VPH, y por tanto su análisis podría utilizarse como biomarcador diagnóstico de riesgo en pacientes positivas a VPH en los programas de cribado de cáncer cervical. Además, tanto las muestras recogidas por el profesional, como las automuestras, son métodos de

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

muestreo válidos y equivalentes para poder realizar la evaluación del estado de la microbiota cervicovaginal de las pacientes. Los objetivos específicos abordados han sido:

- a. Desarrollo de un protocolo para analizar la composición de la microbiota en el remanente de muestras clínicas reales.
- b. Evaluar la eficacia del automuestreo frente a la muestra recogida por el profesional para determinar la composición de la microbiota cervicovaginal.

III. METODOLOGÍA

III.1. Material biológico

III.1.1. Muestras vulvares de la colección VVAP

Para los ensayos de expresión de RNA, se emplearon dos subconjuntos de muestras de vulva embebidas en parafina. Las muestras fueron obtenidas de la colección VVAP [31] entre un total de 159 muestras HSIL y 243 VSCC positivas a VPH16, testadas utilizando la técnica SPF10-DEIA-LIPA y cuyo linaje y sublinaje se había obtenido mediante NGS. Para el cribado de genes diferencialmente expresados utilizando la tecnología nCounter Custom CodeSets (NanoString), se incluyeron en el análisis 32 muestras VPH16 positivas (13 HSIL y 19 VSCC) pertenecientes a diferentes linajes. Este conjunto de muestras se enriqueció con 8 (4 HSIL y 4 VSCC) muestras VPH negativas, 4 (2 HSIL y 2 VSCC) positivas a VPH18 y 4 (2 HSIL y 2 VSCC) positivas a VPH33 con el fin de evaluar diferentes alteraciones en los patrones de expresión de RNA en la carcinogénesis.

De todas las muestras utilizadas en el proyecto se aisló RNA total de cinco secciones de 5 µm del bloque de parafina. Para la obtención del RNA total se utilizó el kit PureLink™ FFPE RNA Isolation (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el RNA en 50 µL de agua libre de nucleasas. 2 µL de cada muestra se utilizaron para medir la concentración del RNA aislado utilizando el fluorímetro Qubit 3.0 (Invitrogen) y el ensayo Qubit RNA BR (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para los ensayos de expresión nCounter se seleccionaron aquellas muestras con un mínimo de 100 ng de moléculas de RNA cuya longitud sea mayor a 200 nucleótidos por muestra, en un máximo de 7 µL. Para determinar el porcentaje de moléculas de RNA pertenecientes a esta fracción, se evaluó la integridad del RNA de las muestras que se iban a emplear utilizando chips RNA ScreenTape Analysis (Agilent) en un dispositivo TapeStation (Agilent).

Las muestras de RNA total aisladas se almacenaron a -80°C hasta realizar los experimentos correspondientes.

III. METODOLOGÍA

En el caso de los miRNAs, se seleccionaron 24 de las 48 muestras utilizadas para el análisis de mRNAs. Igualmente se intentó tener representación suficiente de todos los grupos, incluyendo 4 muestras negativas a VPH (2 HSIL y 2 VSCC), 2 de VPH18 (1 HSIL y 1 VSCC), 2 de VPH33 (1 HSIL y 1 VSCC) y el resto VPH16 de los diferentes linajes tanto HSIL como VSCC.

El segundo subconjunto analizado constó de 110 muestras positivas a VPH16 (61 HSIL y 49 VSCC) de la colección VVAP, y se utilizó para la validación de la expresión diferencial de algunos genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), utilizando ensayos PrimeTime qPCR Probe Assays (IDT).

III.1.2. Células 293TT

Como referencia de los resultados del cribado se analizó la expresión de varios genes individualmente utilizando RT-qPCR. Puesto que los ensayos se debían llevar a cabo en diferentes rondas de amplificación, se decidió aislar RNA total de células 293TT (ATCC; Ref.- CRL-3467), negativas a VPH, cultivadas en nuestro laboratorio, con el fin de utilizarlas como muestra calibradora de cada placa y así corregir la variabilidad entre experimentos.

Estas muestras calibradoras, procesadas del mismo modo que las muestras parafinadas, se almacenaron a -80°C hasta que se realizaron las reacciones de transcripción reversa y posteriores ensayos de expresión (RT-qPCR) junto a las muestras a analizar.

III.1.3. Comunidad microbiana comercial

Para desarrollar el protocolo de determinación de la composición de la microbiota mediante secuenciación del gen 16S rRNA, se adquirió una comunidad microbiana comercial, Microbial Community DNA Standard (ZymoBIOMICS; Ref. D3605). Esta solución comercial contiene el DNA aislado de 8 especies bacterianas y 2 especies de levaduras. Las proporciones de cada especie son un 12% de cada bacteria y un 2% de cada levadura (Figura 17).

III. METODOLOGÍA

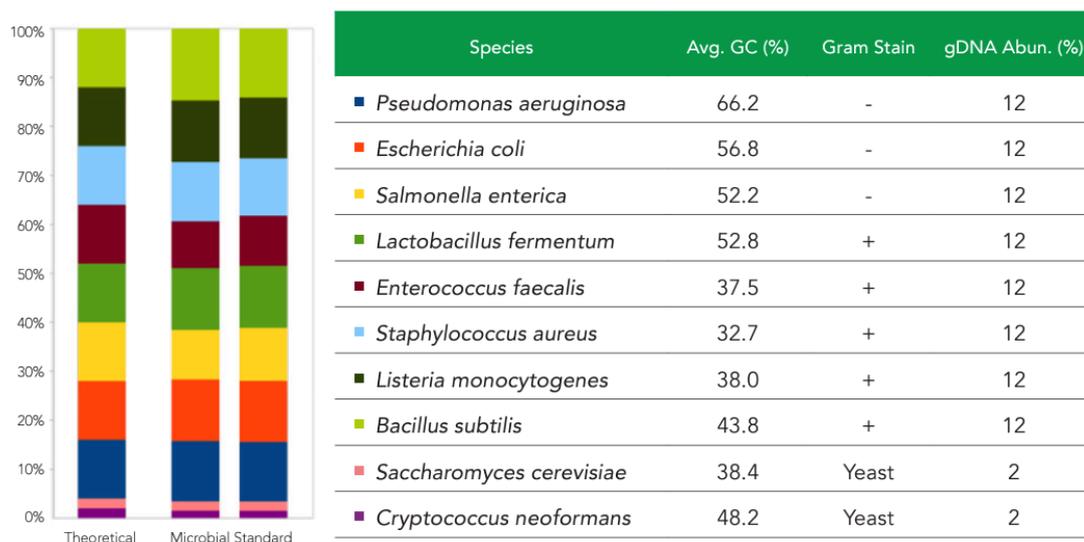


Figura 17 Composición teórica de la comunidad microbiana utilizada para desarrollar el protocolo de determinación de la microbiota cervicovaginal. Obtenida del sitio web del fabricante: <https://zymoresearch.eu/>

III.1.4. Muestras cervicovaginales obtenidas por el profesional y automuestras utilizadas para el análisis del microbioma

Se han utilizado los remanentes de un conjunto de muestras procedentes de un ensayo dirigido a evaluar la aceptabilidad de la automuestra como alternativa de la muestra cervicovaginal tomada por el profesional para la realización del test de VPH en mujeres que atienden de manera habitual programa de cribado de cáncer cervical [154] (ClinicalTrials.gov: NCT05314907).

A las mujeres participantes en el estudio se les tomó una muestra cervicovaginal (citología líquida) por parte del profesional en consulta, utilizando un dispositivo Cervex-Brush (Rovers Medical Devices). Posteriormente cada mujer se tomó otra muestra (automuestra) utilizando un dispositivo Evalyn Brush (Rovers Medical Devices). Ambos tipos de muestra se preservaron en medio PreservCyt (Hologic) y se sometieron a la prueba de VPH siguiendo el circuito establecido para el programa de cribado de Cataluña.

El aislamiento de DNA de las muestras y la prueba de detección de VPH se realizó utilizando la tecnología Cobas (Roche Molecular Diagnostics), que detecta individualmente los genotipos VPH16 y VPH18, y de manera conjunta los otros genotipos de VPH de alto riesgo. Los remanentes de DNA permanecieron congelados a -20°C hasta su uso en los ensayos realizados en este proyecto.

III. METODOLOGÍA

Todas las muestras clínicas utilizadas fueron debidamente anonimizadas. Su uso para investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitari de Bellvitge (PR382/23) y las participantes firmaron un consentimiento informado antes de la toma de muestras.

III.2. Metodología experimental

III.2.1. Ensayos de expresión en mRNAs

III.2.1.1. Selección del panel de genes

Se realizó una revisión bibliográfica para seleccionar genes potencialmente alterados en la carcinogénesis de la vulva mediada por el VPH. En el panel se incluyeron genes descritos como desregulados en cánceres ginecológicos asociados a la infección por VPH o en líneas celulares que expresan las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. En total, se seleccionaron 79 genes humanos como candidatos. En el panel también se incorporaron sondas para detectar los genes de VPH E4 y E6 de los genotipos VPH16, -18 y -33, junto con 6 genes de expresión constitutiva y estable para poder normalizar los datos y comparar la expresión entre las muestras.

III.2.1.2. Análisis de expresión de mRNA mediante nCounter Custom CodeSets

Al analizar muestras de una colección retrospectiva, algunas de ellas muy antiguas, la degradación del RNA podría ser un factor limitante para analizar los perfiles de expresión. Por este motivo, se decidió realizar primero un cribado de genes diferencialmente expresados en un subconjunto de 48 muestras utilizando la tecnología nCounter Custom CodeSets de NanoString, y después validar la desregulación de algunos de los genes diferencialmente expresados mediante RT-qPCR en el resto de muestras válidas disponibles. De esta forma se pudieron optimizar los recursos disponibles empleando un volumen razonable de las muestras.

Los ensayos nCounter de NanoString [163] son una de las mejores opciones para analizar muestras parafinadas o con poca concentración, permitiendo analizar hasta 798 dianas en unos pocos nanogramos de RNA. Es un método libre de PCR, lo cual evita hacer la transcripción reversa y potenciales sesgos en la cuantificación por las diferencias en la eficiencia de amplificación.

nCounter Digital Nucleic Acid Counting

The nCounter Analysis System is a platform for performing highly multiplexed, digital quantification of hundreds of different nucleic acid species in a single reaction¹. The system is being developed for use as a platform for *in vitro* diagnostic applications.



Workflow

CodeSets are color-coded “barcodes” with two 50bp probes that hybridize to the mRNA target in solution. The Reporter Probe carries the fluorescent barcode signal and the Capture Probe immobilizes the hybridized complex for data collection. Detection is direct, digital, and the assay does not require cDNA synthesis or amplification.

1 Hybridize

1. Buffer
2. CodeSet
3. Sample

Sample material is mixed with excess CodeSet and hybridized overnight.

2 Purify

The Prep Station removes excess CodeSet and immobilizes CodeSet/RNA complexes in the nCounter Cartridge for data collection.

3 Count

Sample cartridges are placed in the Digital Analyzer for data collection. Fluorescent barcodes on the surface of the cartridge are counted and a running total of each target is tabulated.

Barcode	Counts	Identity
	3	XLSA
	2	FOX5
	1	INSULIN

Figura 18 Resumen del flujo de los ensayos nCounter de NanoString. Imagen tomada del sitio web: <https://unityhealth.to>

La tecnología nCounter está basada en la hibridación directa de dos sondas de 50 nucleótidos a un fragmento de su RNA diana para cuantificarlo. La primera sonda, de captura, está biotinilada en su extremo 5' y permitirá inmovilizar el RNA diana en la matriz del cartucho donde se realiza el ensayo. La segunda sonda, reportera, contiene en su extremo 3' una secuencia de 6 fluoróforos que actúan a modo de código de barras, asociando una secuencia de colores a cada

III. METODOLOGÍA

diana de RNA. Una vez hibridados los RNAs diana a sus sondas, se hace un paso de limpieza para eliminar los RNAs y sondas que no han hibridado. Posteriormente, el software que controla el instrumento toma imágenes y procesa las señales fluorescentes emitidas por los códigos de barras, proporcionando las lecturas cuantificadas para cada diana (Figura 18).

Dentro de la tecnología nCounter, se utilizaron los ensayos Custom CodeSets, que permiten elegir los mRNAs humanos a analizar y también incluir otros transcritos no humanos proporcionando la secuencia de interés. De esta manera se pudieron incluir en el panel los genes virales *E4* y *E6* de VPH16, VPH18 y VPH33.

Además de las sondas del estudio, los ensayos incluyen 8 sondas con dianas no humanas como control negativo y 6 sondas y sus dianas de RNA en diferentes cantidades preestablecidas como control positivo. Los controles sirven para evaluar el correcto funcionamiento del ensayo, normalizar los datos crudos y establecer una línea base que elimine el ruido de potenciales lecturas inespecíficas.

Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema de análisis NanoString nCounter MAX, cuyo software exporta los resultados con las lecturas de cada diana y los controles en un archivo CSV. Los experimentos se realizaron en colaboración con el Grupo de Genética, Vacunas e Infecciones en Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

III.2.1.3. Validación de la expresión de mRNAs candidatos mediante RT-qPCR

Una vez realizado el cribado de genes diferencialmente expresados, la desregulación de algunos de los más representativos fue validada mediante el análisis por RT-qPCR en el segundo subconjunto, de 110 muestras positivas a VPH16.

El RNA de las muestras a analizar y el de las células 293TT usadas como calibrador fue sometido a transcripción reversa utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada muestra, se añadió a la reacción 1 µg de RNA total en 25 µL de agua libre de nucleasas, 5 µL de tampón de RT (10x), 2 µL de la mezcla de dNTPs (25x), 5 µL de cebadores (10x), 2,5 µL de enzima retrotranscriptasa y 10,5 µL de agua libre de nucleasas.

III. METODOLOGÍA

El protocolo de retrotranscripción usado fue el recomendado por el proveedor del kit: 10 minutos a 25°C; 120 minutos a 37°C; 5 minutos a 85°C.

Para los experimentos de qPCR se emplearon ensayos de sondas PrimeTime (IDT) prediseñadas para cuantificar los genes *APOBEC3A*, *CALML5*, *KLF4* y el gen *ACTB* como control endógeno estable. Los identificadores y secuencias de los ensayos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Características de los ensayos prediseñados utilizados en los experimentos de validación mediante RT-qPCR

ID ensayo	Gen		Secuencias oligos (5' ->3')
Hs.PT.58.45279514.g	<i>APOBEC3A</i>	Directo	AGA TGG AGT CTG GTA CTG TCG
		Reverso	GAG GCA GGA GAG TAG CGT
		Sonda	TGC AGT AGC GCA ATC TCG GCT C
Hs.PT.58.24938401.g	<i>CALML5</i>	Directo	CTC CTG GGC ATT GAT GGT G
		Reverso	GGT GAG CTG ACT CCT GAG G
		Sonda	CCA GTA CAA AAA GGC TTT CTC CGC G
Hs.PT.58.45775069.g	<i>KLF4</i>	Directo	GTC TTC CCC TCT TTG GCT TG
		Reverso	CCC AAT TAC CCA TCC TTC CT
		Sonda	CCC GAT CAG ATG CAG CCG C
Hs.PT.39a.22214847	<i>ACTB</i>	Directo	CCT TGC ACA TGC CGG AG
		Reverso	ACA GAG CCT CGC CTT TG
		Sonda	TCA TCC ATG GTG AGC TGG CGG

La abundancia relativa de cada gen diana se cuantificó por triplicado en reacciones qPCR de 20 µL, compuestas por 2 µL de cDNA, 10 µL de 2x EagleTaq Universal Master Mix (Roche), 1 µL de ensayo de sonda PrimeTime (IDT) y 7 µL de agua libre de nucleasas. Las reacciones se llevaron a cabo en un dispositivo CFX96 (BioRad) controlado por el software propio del fabricante.

El protocolo de PCR usado fue el recomendado para EagleTaq Universal Master Mix (Roche): 10 minutos a 95°C y 45 ciclos de (15 segundos a 95°C; 60 segundos a 60°C; 1 segundo a 72°C).

Los valores de Ct, el ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral determinado, fueron determinados por el software de BioRad y utilizados posteriormente para analizar la expresión relativa de cada una de las dianas a estudio.

III. METODOLOGÍA

III.2.2. Ensayos de expresión de miRNAs

III.2.2.1. Panel de miRNAs analizado

En la literatura científica se describen un buen número de miRNAs alterados por la actividad oncogénica de E6 y E7. Sin embargo, para evaluar el perfil de expresión de los miRNAs en este estudio se decidió utilizar un panel cerrado de 798 miRNAs que ofrece NanoString, el nCounter Human v3 miRNA expression panel.

III.2.2.2. Ensayos nCounter de miRNAs

La tecnología nCounter de NanoString también puede aplicarse para la cuantificación de miRNAs pese a su pequeño tamaño. El principio experimental es el mismo, basado en la hibridación con las sondas de captura y reporteras, y la posterior lectura de los códigos de colores específicos de cada diana.

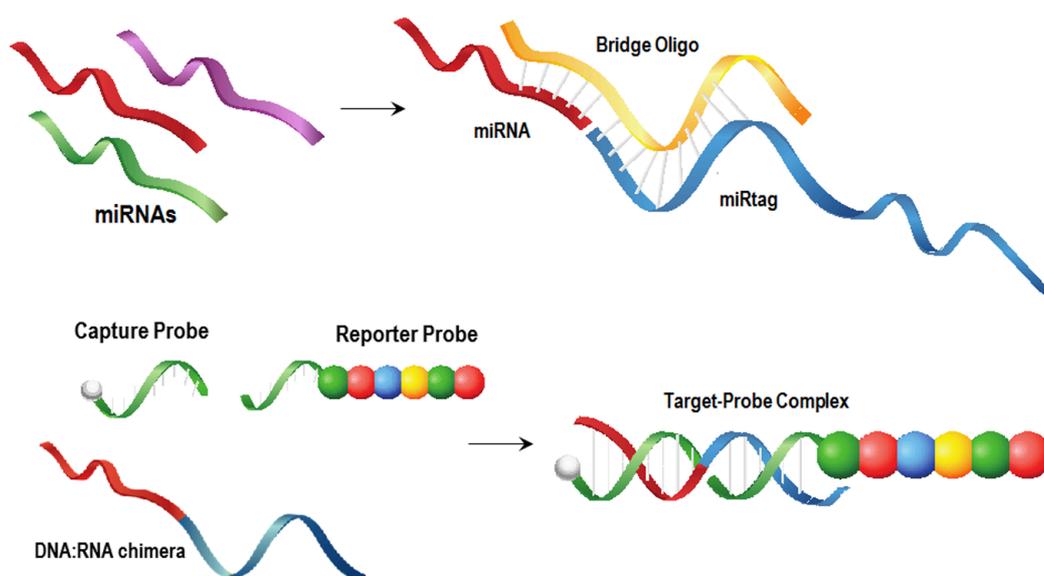


Figure 1. miRNA-specific preparation to utilize the general nCounter technology downstream

Figura 19 Química de los ensayos nCounter (NanoString) para la cuantificación de miRNAs. Figura obtenida del sitio web del fabricante: <https://www.nanostring.com>

Sin embargo, los miRNAs son más cortos que las sondas. Para poder detectarlos, se introduce un paso extra en el protocolo antes de la hibridación. En este paso, a cada miRNA diana se le añade una secuencia específica de DNA ('miRtag') en su extremo 3', que será la reconocida por la sonda reportera y un fragmento de la sonda de captura. La unión apropiada de cada miRNA y su miRtag se produce gracias a la hibridación de sus extremos con una molécula

III. METODOLOGÍA

de RNA puente (*'Bridge oligo'*) por complementariedad de secuencia (Figura 19). La unión de la quimera RNA:DNA se fija mediante una reacción enzimática de ligación. Posteriormente se sigue el mismo protocolo indicado para los mRNAs.

Además de los controles positivos también incluidos en los ensayos de mRNAs, los ensayos de miRNAs contienen 6 controles de la ligación. También contiene 5 tipos de moléculas de RNA no humano (llamados *spike-in*) en cantidades preestablecidas y las sondas para detectarlos, y las sondas para detectar 5 genes endógenos de expresión constitutiva y estable. Esto ofrece diferentes opciones para normalizar los resultados en función de los niveles de expresión global de los miRNAs analizados sin introducir sesgos significativos.

Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema de análisis NanoString nCounter MAX, cuyo software exporta los resultados con las lecturas de cada diana y los controles en un archivo CSV.

III.2.3. Secuenciación del gen 16S rRNA

Existen diferentes métodos para determinar la composición de la microbiota presente en una muestra. Una de las formas más sencillas y automatizables es mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, o un fragmento de este, de las bacterias presentes. El gen 16S rRNA contiene regiones muy conservadas entre la mayoría de las especies bacterianas, y otras muy variables, que permiten identificar cada una y establecer relaciones evolutivas. Existen diferentes tecnologías que ofrecen protocolos estandarizados para la secuenciación del gen 16S rRNA. En este proyecto se decidió utilizar la tecnología de Oxford Nanopore, que ofrece diferentes kits para amplificar y secuenciar el gen 16S rRNA completo (~1500 pares de bases, pb). El kit utilizado en este estudio fue el 16S Barcoding kit (SQK-RAB204, Oxford Nanopore), que permite secuenciar hasta 12 muestras en el mismo experimento (Figura 20).

El kit 16S Barcoding kit está pensado para utilizarse con muestras de distinta naturaleza. Por este motivo, se requiere optimizar el protocolo en función de las necesidades del usuario. En este caso se tuvo que optimizar al proceso de amplificación mediante PCR y el flujo de análisis bioinformático para adaptarlo a las muestras procedentes del programa de cribado.

III. METODOLOGÍA

III.2.3.1. Amplificación del gen 16S rRNA

El kit 16S Barcoding kit proporciona los cebadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (CGGTTACCTTGTTACGACTT), que permiten amplificar mediante PCR el gen 16S rRNA completo (~1500 pb). Los extremos 3' de cada cebador contienen una secuencia específica para cada muestra, a modo de código de barras que permite identificar las lecturas pertenecientes a cada muestra al secuenciar varias a la vez.

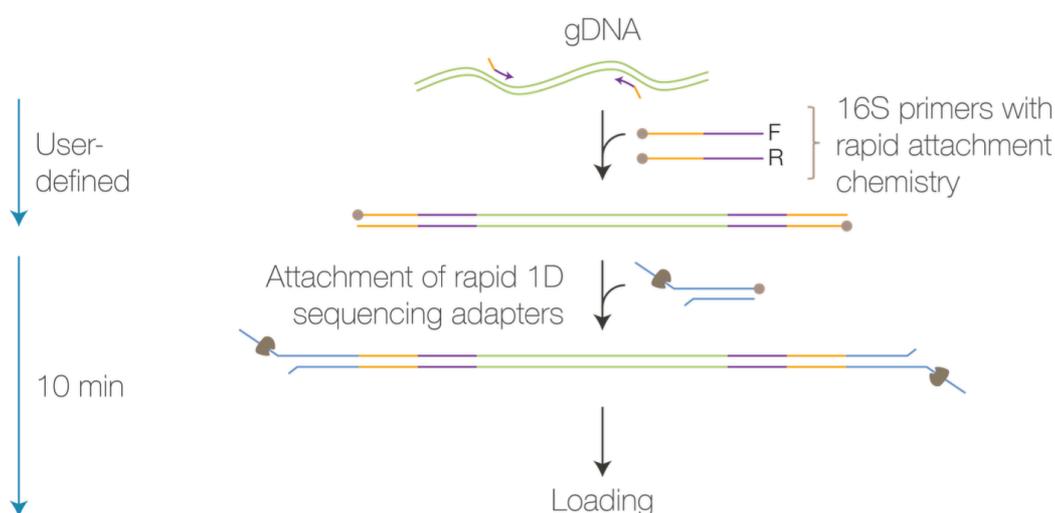


Figura 20 Representación esquemática de la preparación de librerías de secuenciación con el kit 16S Barcoding kit de Nanopore. Imagen obtenida del protocolo ofrecido por Oxford Nanopore Technologies

Para optimizar el protocolo se evaluó la eficiencia de 3 mezclas de PCR que contienen una DNA polimerasa termoestable, mezcla de dNTPs y su tampón de PCR correspondiente. Para la preselección se tuvieron en cuenta la elevada longitud de los fragmentos y la necesidad de utilizar polimerasas con capacidad de corrección de errores.

Las mezclas comerciales de PCR probadas fueron: Phusion® Hot Start Flex 2X Master Mix (M0536, New England Biolabs), KAPA HiFi HotStart Ready 2X Mix (KK2601, Roche Diagnostics) y LongAmp® Taq 2X Master Mix (M0287, New England Biolabs). Los tiempos y temperaturas en los pasos de desnaturalización y extensión de las reacciones de PCR fueron los recomendados por cada fabricante.

En el protocolo finalmente establecido para el estudio, la composición de cada reacción de PCR (50 µL) fue: 10 µL de muestra (10 ng de DNA), 1 µL de la

III. METODOLOGÍA

mezcla de cebadores (27F + 1492R), 25 μ L de LongAmp Taq 2X Master Mix y 14 μ L de agua libre de nucleasas. El protocolo de amplificación establecido fue: 2 minutos a 94°C y 30 ciclos de (30 segundos a 94°C; 60 segundos a 55°C; 120 segundos a 65°C) con un paso de extensión final de 5 minutos a 65°C.

Los productos de PCR se chequearon mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en tampón TAE Ultrapure (15558042, Thermo Scientific) diluido a 1X. A cada gel se les añadió 1 μ L de SYBR™ Safe (S33102, Thermo Scientific) para poder observar y tomar imágenes de las bandas obtenidas en un transiluminador con luz ultravioleta. Se analizaron 5 μ L de cada producto de PCR mezclado con 1 μ L de buffer de carga 6X (R0611, Thermo Scientific). Para calcular el tamaño de los fragmentos amplificados, se añadió a cada gel 2 μ L de GeneRuler 1Kb (SM0311, Thermo Scientific), un estándar de pesos moleculares.

III.2.3.2. Preparación de librerías de secuenciación

Los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del fragmento del gen 16S rRNA fueron sometidos a un proceso de lavado con 30 μ L de esferas magnéticas AMPure XP (A63881, Beckman) para eliminar los cebadores y dNTPs sobrantes de la reacción. Tras la purificación se midió la concentración de DNA resultante en cada muestra mediante fluorescencia con Qubit 3.0 y el ensayo Qubit DNA BR (Invitrogen).

Posteriormente se preparó una mezcla de cantidades equimolares de cada muestra, hasta 100 fmol en 10 μ L, el máximo admitido por la técnica para una ronda de secuenciación. 100 fmol de fragmentos de 1500 pares de bases corresponde aproximadamente a 100 ng, por lo que se incluyeron 8,3 ng de cada muestra. El resto de los reactivos necesarios para terminar la librería de secuenciación se añadieron siguiendo el protocolo del fabricante, antes de cargar las muestras en las células de secuenciación (Flow Cell, versión R9.4.1, Oxford Nanopore) y proceder al ensayo.

III.2.3.3. Secuenciación del gen 16S rRNA

Los ensayos de secuenciación se llevaron a cabo en un dispositivo MinION controlado por el software MinKNOW. El software procesa los cambios en la señal eléctrica que se producen en los nanoporos de la Flow Cell al pasar cada nucleótido del fragmento de DNA, creando archivos de texto en formato FASTA

III. METODOLOGÍA

en los que se guarda la secuencia de cada fragmento para el posterior análisis. El software además es capaz de identificar los códigos de barras añadidos en la PCR, por lo que es posible saber cuántas moléculas de DNA se han secuenciado de cada muestra presente en la mezcla, así como su tamaño aproximado en tiempo real.

Antes de cargar la muestras en la Flow Cell, esta se somete a un proceso de control para conocer si tiene suficientes poros funcionales y se le añade un tampón de secuenciación.

Las diferentes rondas de secuenciación completadas en este proyecto tuvieron una duración de entre 4 y 6 horas, hasta que todas las muestras de la mezcla alcanzaran las 20.000 lecturas detectadas por el software MinKNOW, salvo aquellas en las que se detectara un problema de falta de material y fueran descartadas.

III.3. Metodología computacional y análisis estadístico

III.3.1. Filtrado y normalización de lecturas en ensayos nCounter

Las lecturas obtenidas en los ensayos de expresión, tanto de genes como de miRNAs fueron sometidos a un control de calidad de la técnica, al filtrado de las dianas no expresadas y a la normalización de los resultados para poder comparar la expresión entre las muestras. El flujo de trabajo se basó en un protocolo previamente publicado por otros autores [164].

El control de calidad se realizó utilizando el software propio de NanoString. Basado en las lecturas obtenidas para los controles positivos (y de ligación en el caso de los miRNAs), el software determina si el experimento ha funcionado técnicamente de forma correcta. Las media de las lecturas obtenidas para los controles negativos en todas las muestras ayudan a establecer un valor umbral por debajo del cual se considera ruido, es decir, hibridaciones inespecíficas y por tanto se debe sustraer de las dianas a estudio. En los ensayos realizados, el ruido de secuenciación se estableció en el valor del umbral más 2 desviaciones estándar. Las muestras cuya calidad no superase todos los controles fueron eliminadas del análisis.

III. METODOLOGÍA

Después del control de calidad, los datos fueron sometidos a un proceso de filtrado. Todas las dianas que no tuvieran más de 5 lecturas en al menos dos muestras fueron eliminadas de los siguientes análisis.

Existen diferentes métodos para normalizar los resultados y eliminar la variación no deseada entre muestras. Por la cantidad de dianas y los niveles de expresión obtenidos, en este proyecto se decidió normalizar las lecturas, tanto de genes como de miRNAs, en los niveles de los genes de expresión constitutiva y estable incluidos en ambos ensayos. Para la normalización, se utilizó la función RUVg del paquete RUVseq en R [165].

Tras la primera normalización, se evaluó si la expresión de cada gen constitutivo era realmente estable mediante un análisis de expresión diferencial entre las muestras HSIL y VSCC con edgeR. Aquellos genes constitutivos cuyo log₂-ratio entre los dos grupos fue mayor a 0,5 fueron eliminados. Posteriormente se repitió la normalización en los genes constitutivos realmente estables.

III.3.2. Análisis de expresión RNA no supervisado

Los resultados normalizados con RUVseq se sometieron a dos análisis de expresión no supervisados para comprobar si los perfiles de expresión son capaces de discriminar las diferentes muestras en función de algún valor fenotípico, como el estadio de enfermedad o la positividad a VPH.

Por un lado se realizó un análisis de componente principal (PCA, siglas en inglés de *Principal Component Analysis*), En los PCA un conjunto grande de variables se reduce a 2, llamadas componentes principales, que explican la máxima variabilidad entre el conjunto de muestras analizado. De esta manera, las muestras quedan distribuidas en una gráfica de puntos de dos dimensiones, cuyos ejes son los 2 componentes principales. Si existe una o más variables cuyo valor correlacione con algún valor fenotípico, las muestras de ese grupo se encontrarán cerca en el gráfico, a la vez que separadas de los otros grupos con otro fenotipo.

También se realizaron análisis de agrupación jerárquica. Este tipo de análisis establece el grado de similitud entre las muestras en función de los niveles de expresión de cada diana de forma individual. El resultado se representa en un cladograma que separa las muestras en función de su grado de similitud, de

III. METODOLOGÍA

forma similar a los árboles filogenéticos. A la vez, se representa el nivel de expresión de cada gen en cada muestra mediante un mapa de calor. Este análisis ofrece, de manera visual, la posibilidad de identificar las variables (expresión de genes o miRNAs) que definen a un grupo o fenotipo concreto.

III.3.3. Análisis de expresión diferencial de genes y miRNAs (nCounter)

La identificación de genes y miRNAs diferencialmente expresados entre grupos, de acuerdo con alguna de las variables fenotípicas estudiadas, se realizó utilizando el paquete edgeR de Bioconductor [166]. edgeR utiliza un modelo lineal generalizado negativo binomial (GLM-NB) para tener en cuenta la variabilidad global de los datos de expresión. Esta aproximación permite tener en cuenta la variabilidad biológica y técnica inherente en los datos de expresión RNA, lo que mejora la precisión al determinar qué genes están significativamente diferencialmente expresados entre las condiciones comparadas.

Los parámetros establecidos para definir un gen o miRNA como significativamente diferencialmente expresado fueron: i) una variación logarítmica en base 2 de la expresión (o $\log_2\text{-ratio}$) ≥ 1 ; y ii) una tasa de falsos positivos (o FDR) $< 0,05$.

III.3.4. Análisis de expresión diferencial de genes (RT-qPCR)

Para la validación de los genes diferencialmente expresados, se comparó la expresión relativa de cada diana mediante RT-qPCR con el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ [167].

Los ensayos de RT-qPCR dan como resultado, para cada diana y muestra analizada, el ciclo (Ct) en el que la fluorescencia supera un umbral de señal, que se asocia con el comienzo de la fase exponencial de la amplificación. El método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ se basa en la comparación de los valores de Ct para determinar el cambio en la expresión relativa entre dos grupos o condiciones, en este caso HSIL y VSCC

De esta forma, en cada muestra se calculó el ΔCt restando el Ct de cada diana al Ct del gen de referencia (*ACTB*). Posteriormente, los valores de ΔCt de cada muestra se restaron al de la muestra calibradora, obteniendo el valor de $\Delta\Delta Ct$ y $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para determinar si las diferencias de expresión relativas entre las muestras HSIL y VSCC eran estadísticamente significativa. Un P -valor $<0,05$ fue considerado como significativo.

III.3.5. Asociación de miRNAs desregulados y sus funciones biológicas

Los miRNAs no codifican proteínas, sino que desempeñan funciones reguladoras y de señalización, modulando la expresión de los genes codificantes. Por este motivo es importante identificar las dianas de los miRNAs identificados como diferencialmente expresados, para así determinar las rutas metabólicas y funciones biológicas en las que participan.

Para esta parte del análisis se decidió incluir todos los miRNAs cuyo \log_2 -ratio fue mayor de 1, y su P -valor, menos restrictivo que el FDR, menor de 0,05, en la comparativa entre HSIL y VSCC de las muestras positivas a VPH16. Esto nos permitió obtener más información sobre las interacciones y la alteración de procesos regulatorios que ocurren en la carcinogénesis asociada a la infección por VPH16.

Se utilizó miRTarBase para identificar los genes diana de los miRNAs alterados y establecer una relación con los resultados obtenidos en los ensayos de expresión génica. miRTarBase [168] es una base de datos curada que registra las interacciones entre miRNAs y sus genes diana validadas experimentalmente. En ella hay registradas, de forma diferenciada, interacciones validadas experimentalmente y también identificadas por predicciones computacionales. En este estudio se han registrado el número de interacciones totales de cada miRNA alterado y señalando aquellas con validación robusta. Para cada miRNA, además, se han anotado los genes significativamente alterados entre HSIL y VSCC con los que interacciona.

Además, se utilizó la herramienta TAM2.0 [169] para, con la lista de miRNAs alterados, identificar funciones biológicas y enfermedades en las que existe una sobrerepresentación significativa de los mismos (mínimo 2 miRNAs). También los factores de transcripción con los que pueden estar interaccionando (mínimo 1 miRNA). Esta herramienta además proporciona varios valores estadísticos a cada uno de los eventos. En este caso, se ha considerado significativo un valor de FDR $<0,05$ como estadísticamente significativo.

III. METODOLOGÍA

III.3.6. Determinación de la composición de la microbiota cervicovaginal

Las secuencias de DNA del gen 16S rRNA obtenidas se sometieron a un procesamiento bioinformático para minimizar el ruido y los potenciales sesgos de la amplificación por PCR. De esta manera se puede obtener la composición de la microbiota de cada muestra cervicovaginal de una forma más fidedigna.

El primer paso fue la eliminación con Porechop (v0.2.4) [170] de todas las secuencias que no portaban los adaptadores de secuenciación y las secuencias identificadoras de cada muestra en los extremos. Se eliminaron las secuencias cuya longitud no era la esperada, entre 1400 y 1600 pares de bases, con NanoFilt (v2.7.1) [171]. Posteriormente se utilizó FASTQC (v0.11.9) [172] para hacer un control de calidad de las secuencias, excluyendo aquellas con un resultado menor a 9 de los análisis posteriores.

Tras los pasos de filtrado y control de calidad, todas las muestras con menos de 10000 lecturas fueron excluidas del análisis. En las muestras restantes se asignó el grupo taxonómico (OTU, del inglés *Operational Taxonomic Unit*) a cada secuencia utilizando Kraken2 (v2.1.2) [173] y una base de datos de referencia del gen 16S rRNA (SILVA 138 SSU Parc database) [174]. Con la asignación taxonómica se asignó un género bacteriano a cada secuencia analizada.

III.3.7. Clasificación por tipos de microbiota (CSTs)

Para asignar el tipo de microbiota cervicovaginal, o CST (*Community State Type*) a cada muestra [146], se creó una base de datos con las secuencias de referencia del gen 16S rRNA de 7 especies de *Lactobacillus* encontrados en las muestras cervicovaginales: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus* y *L. salivarius*. También se incluyeron las secuencias de referencia de *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri* y *Limosilactobacillus vaginalis*, como control negativo, y de *Lactobacillus fermentum*, como control positivo al estar presente en la comunidad microbiana comercial utilizada para desarrollar el protocolo.

Posteriormente se seleccionaron las lecturas que habían sido asignadas como género *Lactobacillus* en la clasificación taxonómica y se clasificaron dentro de las 11 especies de la base de datos utilizando el algoritmo de BLASTn. La

clasificación se repitió 10 veces por cada lectura y se asignó aquella especie con mayor porcentaje de identidad.

Utilizando la herramienta VALENCIA [175] y las 13.231 muestras de su base de datos, se entrenó un modelo de tipo '*random forest*' para hacer la clasificación por CST. Una vez entrenado el algoritmo, se asignó el CST de las muestras secuenciadas en este estudio.

III.3.8. Análisis estadístico de la alteración de la microbiota cervicovaginal

Se utilizaron diferentes funciones y paquetes de R para analizar estadísticamente las alteraciones en la composición de la microbiota de las muestras. Para reducir el ruido producido por errores de secuenciación y la asignación taxonómica se filtraron todos los géneros que no tuvieran más de 100 lecturas en al menos 2 muestras. Se utilizó Phyloseq (v1.42.0) [176] para ajustar las diferencias en el número de lecturas, utilizando 10241 lecturas por muestra, tras un proceso de rarefacción. De esta forma los datos quedaron normalizados para poder analizar la diversidad microbiana dentro de (α -diversidad) y entre las muestras (β -diversidad).

Se utilizó el índice de diversidad de Shannon para medir la α -diversidad, que evalúa la diversidad dentro de cada muestra teniendo en cuenta el número de géneros presentes y su abundancia relativa.

Para analizar las diferencias entre muestras o β -diversidad, se normalizaron los datos mediante rarefacción, y se midieron las distancias euclidianas mediante PCA, representando los resultados en un gráfico de puntos.

Para analizar estadísticamente las diferencias entre los CSTs asignados a cada grupo de muestras se utilizó la prueba χ^2 . Un P -valor $<0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Por último, se utilizó el paquete LinDA [177] para evaluar si existen diferencias significativas en la abundancia relativa de algunos géneros entre los diferentes grupos establecidos. Un p -valor $<0,05$ fue considerado como significativo.

IV. RESULTADOS

IV.1. Análisis de expresión génica en muestras HSIL y VSCC de vulva

IV.1.1. Población de estudio

Para el cribado de genes diferencialmente expresados utilizando ensayos nCounter Custom CodeSets (Nanostring) se seleccionaron 48 muestras de vulva de la colección VVAP. El objetivo de estos ensayos fue identificar genes alterados entre muestras HSIL y VSCC, y también determinar las alteraciones específicas de los tipos y variantes de VPH más frecuentes en la carcinogénesis de vulva.

Siguiendo este criterio, la composición del conjunto de 48 muestras analizadas fue la mostrada en la Tabla 2.

Todas las muestras seleccionadas cumplieron con los criterios de concentración e integridad del RNA requeridos para el ensayo.

Tabla 2 Población de estudio para el análisis de expresión génica con el ensayo nCounter Custom CodeSets

		HSIL	VSCC	
VPH-16	A-1/2/3	6	6	12
	A-4	1	2	3
	B	0	2	2
	C	2	5	7
	D	4	3	7
VPH-18		2	2	4
VPH-33		2	2	4
VPH-neg		4	4	8
Total		21	27	48

IV.1.2. Panel de genes analizado

A partir de la revisión de la bibliografía se identificaron 79 genes humanos alterados en cánceres ginecológicos asociados a la infección por VPH, o en ensayos *in vitro* con cultivos celulares con expresión ectópica de las oncoproteínas E6 y E7. La mayoría de los genes analizados en muestras clínicas

IV. RESULTADOS

corresponden a observaciones realizadas en pacientes de cáncer de cérvix, aunque también se incluyeron genes relevantes en la carcinogénesis de vulva.

El panel de genes candidatos seleccionado puede observarse en la Tabla 3 junto con su símbolo, nombre completo, el identificador de RefSeq utilizado para el diseño de la sonda de detección y las referencias bibliográficas donde se seleccionaron.

Los genes seleccionados están mayoritariamente involucrados en funciones biológicas que habitualmente están alteradas en el desarrollo de muchos tipos de cáncer, como son la regulación del ciclo celular, supresión de tumores, la regulación de la respuesta inmune, proliferación celular, invasión, migración y la apoptosis. También cabe destacar los 6 genes de la familia APOBEC3.

El panel de genes a analizar se completó con sondas para detectar y cuantificar la expresión de los genes *E4* y *E6* de VPH, específicas para los genotipos 16, 18 y 33 de VPH. El gen *E4* está relacionado con la replicación del virus y la producción de nuevas partículas víricas, mientras el gen *E6* tiende a expresarse en estadios más avanzados de la infección.

Se incluyeron también sondas para detectar 10 genes humanos de expresión constitutiva (*ACTB*, *B2M*, *CNOT4*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *SF3A3*, *SLC41A1*, *TBP*, *UBB*) cuyos niveles de expresión deberían mantenerse estables independientemente de las condiciones analizadas, con el fin de poder normalizar los niveles de expresión de los genes diana y eliminar diferencias debidas al manejo de la muestra o rendimiento del ensayo de Nanostring.

Tabla 3 Panel de genes para análisis de expresión de ARN

Gen	Nombre completo	RefSeq	Referencias
<i>APOBEC3A</i>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3A	NM_181773.5	[178]
<i>APOBEC3B</i>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3B	NM_004900.5	[179], [180]
<i>APOBEC3C</i>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3C	NM_014508.3	[180], [181]
<i>APOBEC3D</i>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3D	NM_152426.4	[181]
<i>APOBEC3G</i>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G	NM_021822.4	[181]

IV. RESULTADOS

<i>APOBEC3H</i>	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3H	NM_145699.4	[181]
<i>CCNA1</i>	Cyclin A1	NM_003914.1	[182]
<i>ECT2</i>	Epithelial cell transforming 2	NM_018098.6	[183]
<i>SFN</i>	Stratifin	NM_006142.5	[56]
<i>CCND1</i>	Cyclin D1	NM_053056.3	[55]
<i>CCND2</i>	Cyclin D2	NM_001759.4	[55]
<i>KNTC1</i>	Kinetochores Associated 1	NM_014708.6	[184]
<i>RB1</i>	RB transcriptional corepressor 1	NM_000321.3	[185]
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	NM_000546.6	[185]
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1	NM_005225.3	[183]
<i>MYC</i>	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor	NM_002467.6	[180]
<i>CDKN2A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	NM_000077.5	[183]
<i>FHIT</i>	Fragile histidine triad diadenosine triphosphatase	NM_002012.4	[182]
<i>APC</i>	APC regulator of WNT signaling pathway	NM_000038.6	[182]
<i>APM1</i>	Zinc Finger and BTB Domain Containing 7C	NM_001039360.3	[186]
<i>CASZ1</i>	Castor Zinc Finger 1	NM_017766.5	[180]
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog	NM_000314.8	[185]
<i>MYBL2</i>	MYB proto-oncogene like 2	NM_002466.4	[183]
<i>TP73</i>	Tumor protein p73	NM_005427.4	[180]
<i>DAPK1</i>	Death Associated Protein Kinase 1	NM_004938.4	[187]
<i>TIMP3</i>	TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3	NM_000362.5	[188]
<i>CALML5</i>	Calmodulin Like 5	NM_017422.5	[189]
<i>KLF4</i>	Kruppel Like Factor 4	NM_004235.6	[189]
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	NM_006218.4	[185]
<i>APOC1</i>	Apolipoprotein C1	NM_001636.1	[183]
<i>SOX2</i>	SRY-Box Transcription Factor 2	NM_003106.4	[190]
<i>RARβ2</i>	Retinoic acid receptor beta	NM_000965.5	[55]
<i>AR</i>	Androgen Receptor	NM_000044.6	[55]
<i>ESR1</i>	Estrogen Receptor 1	NM_000125.4	[55]
<i>KRT17</i>	Keratin 17	NM_000422.3	[191]
<i>KIF14</i>	Kinesin Family Member 14	NM_001305792.1	[192]
<i>HOXA1</i>	Homeobox A1	NM_153620.3	[193]
<i>HOXA10</i>	Homeobox A10	NM_018951.4	[193]
<i>HOXA11</i>	Homeobox A11	NM_005523.6	[193]
<i>PAX1</i>	Paired Box Gene 1	NM_006192.5	[194]
<i>ASCL1</i>	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1	NM_004316.4	[195]
<i>LHX8</i>	LIM Homeobox 8	NM_001256114.2	[195]
<i>RASSF1A</i>	Ras association domain family member 1	NM_170714.2	[180]

IV. RESULTADOS

<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412.5	[182]
<i>FANCA</i>	FA complementation group A	NM_000135.4	[55]
<i>FANCE</i>	FA Complementation Group E	NM_021922.3	[55]
<i>FANCD2</i>	FA Complementation Group D2	NM_033084.6	[55]
<i>BRCA1</i>	BRCA1 DNA Repair Associated	NM_007297.4	[55]
<i>ARID1B</i>	AT-Rich Interaction Domain 1B	NM_017519.3	[196]
<i>SMARCB1</i>	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily B, Member 1	NM_003073.5	[196]
<i>MCM2</i>	Minichromosome maintenance complex component 2	NM_004526.4	[183]
<i>CHAF1B</i>	Chromatin Assembly Factor 1 Subunit B	NM_005441.3	[197]
<i>CHAF1A</i>	Chromatin Assembly Factor 1 Subunit A	NM_005483.3	[197]
<i>ZNF582</i>	Zinc Finger Protein 582	NM_144690.3	[198]
<i>ANT3</i>	Solute Carrier Family 25 Member 6	NM_001636.4	[199]
<i>FURIN</i>	Furin, Paired Basic Amino Acid Cleaving Enzyme	NM_002569.4	[200]
<i>TNF</i>	Tumor Necrosis Factor	NM_000594.4	[56]
<i>CADM1</i>	Cell adhesion molecule 1	NM_014333.4	[182]
<i>SLIT2</i>	Slit Guidance Ligand 2	NM_004787.4	[55]
<i>ITGA8</i>	Integrin Subunit Alpha 8	NM_003638.3	[55]
<i>FN1</i>	Fibronectin 1	NM_212482.4	[55]
<i>EPDR1</i>	Ependymin Related 1	NM_017549.5	[55]
<i>FBLN1</i>	Fibulin 1	NM_006487.3	[199]
<i>CRISP2</i>	Cysteine Rich Secretory Protein 2	NM_003296.4	[191]
<i>SLC19A3</i>	Solute Carrier Family 19 Member 3	NM_025243.4	[200]
<i>SLC22A3</i>	Solute Carrier Family 22 Member 3	NM_021977.4	[200]
<i>DES</i>	Desmin	NM_001927.4	[200]
<i>MMP9</i>	Matrix metalloproteinase 9	NM_004994.3	[183]
<i>DPAGT1</i>	Dolichyl-Phosphate N- Acetylglucosaminophosphotransferase 1	NM_001382.4	[200]
<i>PD-L1</i>	CD274 Molecule	NM_014143.4	[201]
<i>CCL17</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 17	NM_002987.3	[200]
<i>IFNA2</i>	Interferon Alpha 2	NM_000605.4	[56]
<i>IFNG</i>	Interferon Gamma	NM_000619.3	[56]
<i>IRF7</i>	Interferon Regulatory Factor 7	NM_004029.4	[56]
<i>IRF4</i>	Interferon Regulatory Factor 4	NM_002460.4	[202]
<i>DNMT1</i>	DNA Methyltransferase 1	NM_001379.4	[197]
<i>PRL</i>	Prolactin	NM_000948.6	[56]
<i>TSR1</i>	TSR1 ribosome maturation factor	NM_018128.5	[56]
<i>HOTAIR</i>	HOX Transcript Antisense RNA	NR_047518.1	[203]
<i>MALAT1</i>	Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1	NR_144568.1	[203]
<i>CASC15</i>	Cancer Susceptibility 15	NR_015410.2	[204]
<i>HAND2-AS1</i>	HAND2 Antisense RNA 1	NR_136197.1	[188]

<i>LIPE-AS1</i>	LIPE Antisense RNA 1	NR_073179.1	[200]
<i>CCHE1</i>	Cervical Carcinoma Expressed PCNA Regulatory LncRNA	NR_131782.1	[205]

IV.1.3. Control de calidad y normalización de los ensayos con nCounter Custom CodeSets

El control de calidad técnico, basado en las lecturas totales y la señal de los controles positivos del ensayo NanoString, determinó que una de las muestras HSIL negativas a VPH no tenía suficiente cantidad de RNA y debió ser excluida de los análisis posteriores.

En el resto de las muestras se calculó la señal de ruido en base a las lecturas de los controles negativos y se substrajo de los recuentos del resto de genes diana cuantificados. El proceso de filtrado no identificó ningún gen que no tuviera más de 5 lecturas en al menos 2 muestras.

El primer paso de la normalización con RUVseq identificó que 2 de los genes constitutivos, *HPRT1* y *B2M* no presentaban unos niveles de expresión estables ($\log_2\text{-ratio} > 0,5$) entre las muestras HSIL y VSCC, motivo por el cual se excluyeron del análisis y la normalización de los datos se llevó a cabo con el resto de los genes de expresión constitutiva que si presentaban unos niveles de expresión similares en HSIL y VSCC.

IV.1.4. Análisis no supervisado de expresión de mRNAs

Una vez normalizados los datos, el análisis de componentes principales (PCA) en las 47 muestras basado en el perfil de expresión del panel de genes seleccionados, se observó una distribución separada de las muestras de VSCC respecto de las de HSIL (Figura 21-A). Al observarlo por positividad a VPH, las muestras positivas a VPH16 tendieron a formar un grupo separado de los otros genotipos y las muestras negativas (Figura 21-B).

IV. RESULTADOS

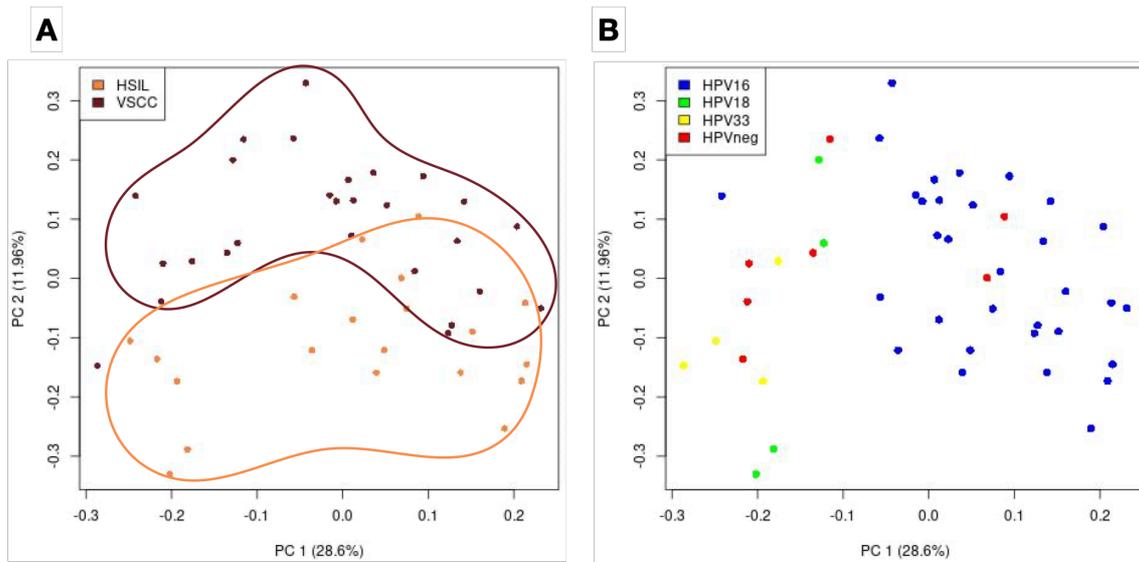


Figura 21 PCAs en base a los perfiles de expresión de 79 genes en 20 muestras HSIL y 27 muestras VSCC. A) Muestras coloreadas en función del grado de enfermedad; HSIL en naranja, VSCC en granate. B) Muestras coloreadas en función de positividad a VPH: VPH16 en azul, VPH18 en verde, VPH33 en amarillo, VPH-negativo en rojo.

El análisis de clasificación jerárquica y mapa de calor (conocidos habitualmente como 'Heatmaps') clasificó las 47 muestras en diferentes grupos o 'clusters' en función del perfil de expresión del panel de genes seleccionado (Figura 22). En un primer *cluster* se agruparon casi todas las muestras no VPH16 positivas. Este *cluster* a su vez se dividió en dos sub-*clusters*, uno dominado por muestras de HSIL de VPH33 y VPH18, y el otro dominado por muestras de VSCC, entre las que se agruparon las 4 muestras de VSCC negativas a VPH. El segundo *cluster* agrupó principalmente muestras positivas a VPH16, separándolas a su vez en 3 sub-*clusters*. El primero y el segundo de ellos dominado por muestras de VSCC, aunque con un perfil de expresión algo diferente según los patrones de color del mapa de calor (Figura 22), El tercer sub-*cluster* agrupó muestras de HSIL positivas a VPH16, además de dos de las negativas a VPH.

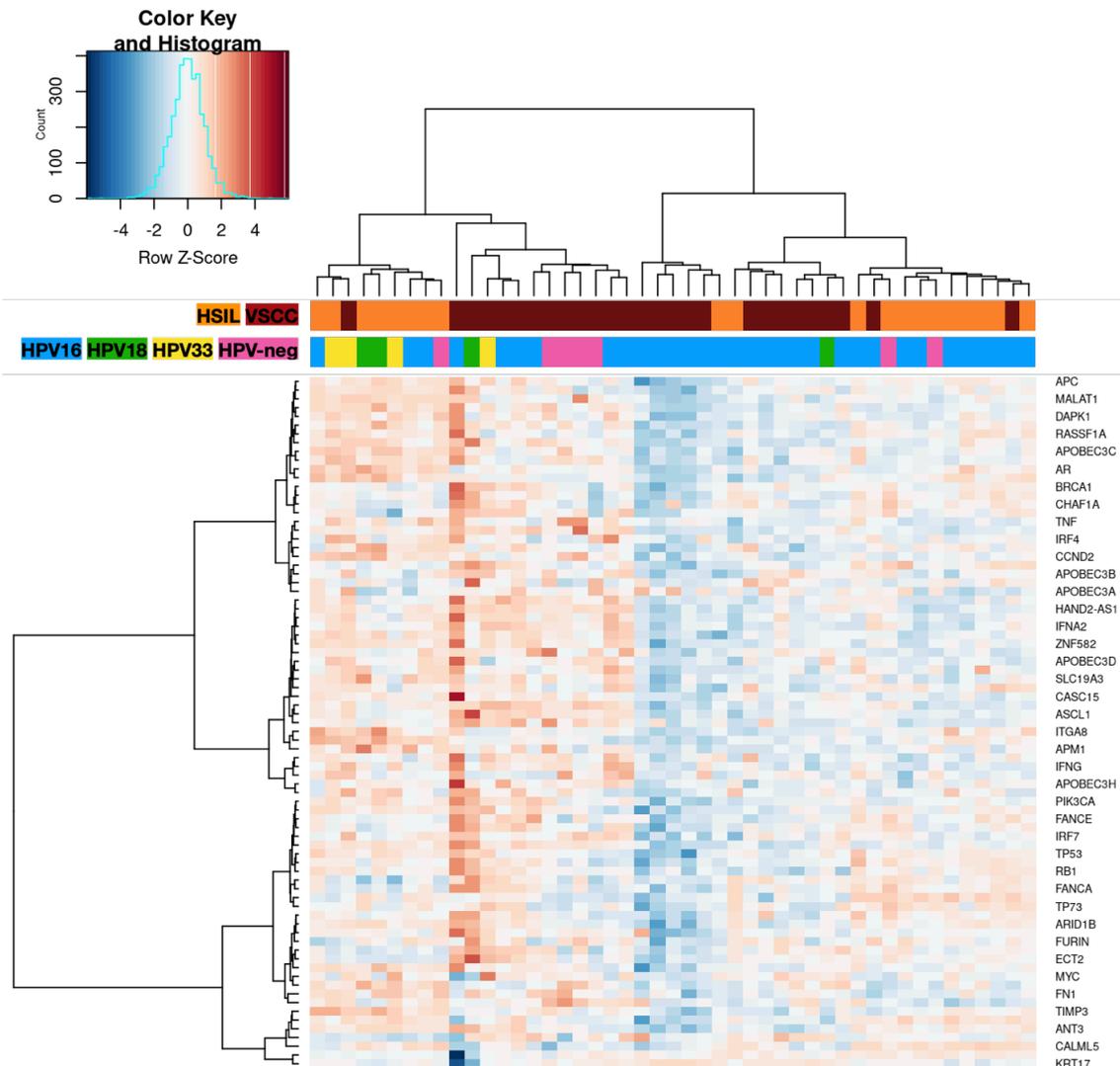


Figura 22 Clasificación jerárquica y mapa de calor de la expresión génica de las muestras analizadas con nCounter Custom CodeSets. Leyenda barra superior: Granate – VSCC, Naranja – HSIL

IV.1.5. Análisis de expresión génica diferencial entre HSIL y VSCC

El análisis de expresión génica diferencial con EdgeR de las 47 muestras vulvares mostró diferencias significativas en la expresión al comparar la expresión en 27 muestras de VSCC (23 positivas 4 negativas para VPH) y 20 HSIL (17 positivas y 3 negativas para VPH). En el gráfico de volcán se observa que en general hay predominancia de genes sobreexpresados en VSCC, en el panel analizado (Figura 23). Se identificaron un total de 17 genes cuya expresión estaba significativamente alterada ($\log_2\text{-ratio} > 1$; $\text{FDR} < 0,05$) (Tabla S.1).

IV. RESULTADOS

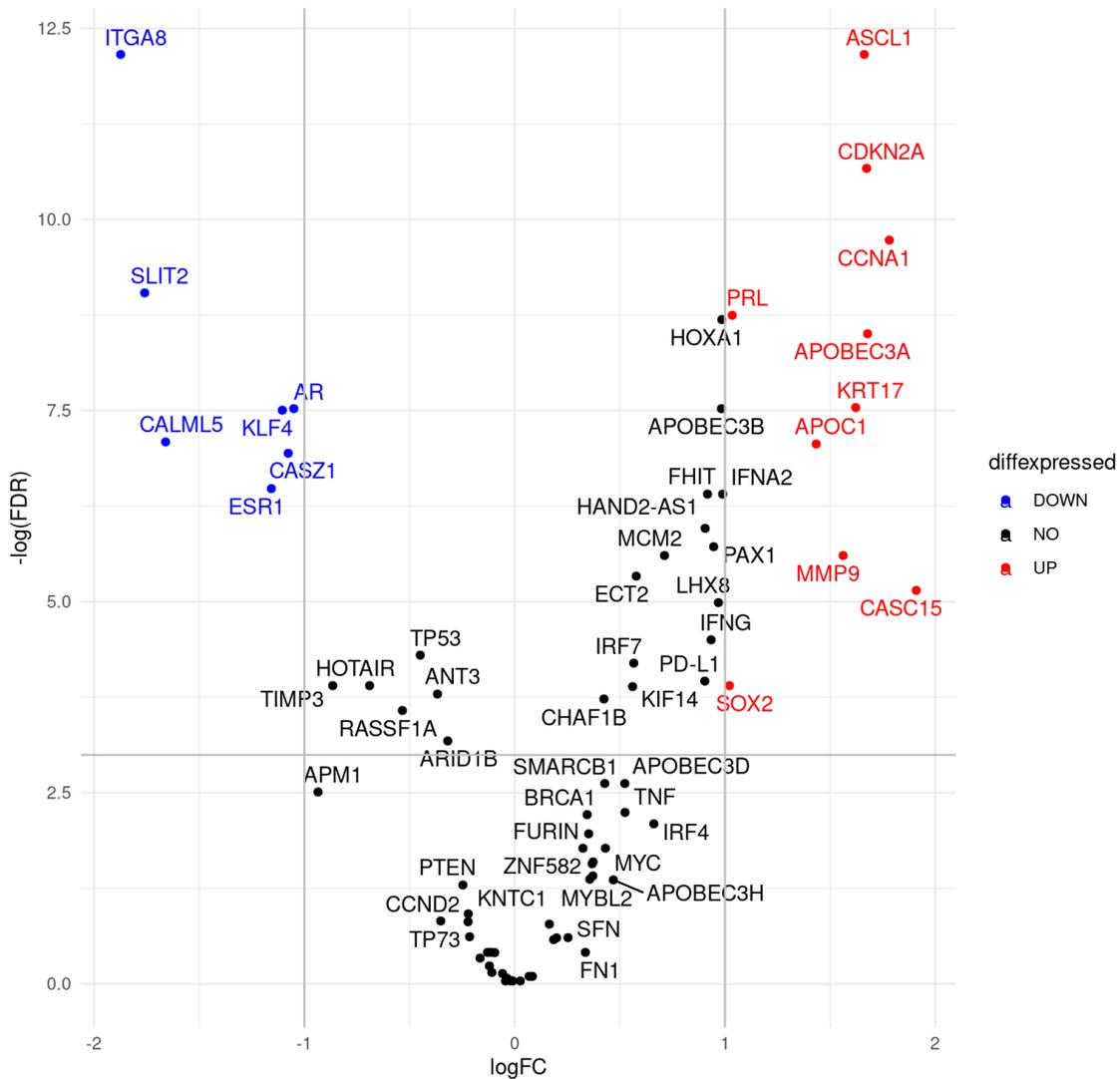


Figura 23 Gráfico de volcán con los resultados del análisis de expresión diferencial entre 20 muestras HSIL y 27 muestras VSCC. En rojo, genes sobreexpresados; en azul, genes infraexpresados significativamente en el grupo VSCC.

Concretamente, 10 genes (*CASC15*, *CCNA1*, *APOBEC3A*, *CDKN2A*, *ASCL1*, *KRT17*, *MMP9*, *APOC1*, *PRL* y *SOX2*) fueron identificados como significativamente sobreexpresados ($\log_2\text{-ratio} > 1$, $\text{FDR} < 0,05$) en las muestras VSCC, mientras que 7 genes (*ITGA8*, *SLIT2*, *CALML5*, *ESR1*, *KLF4*, *CASZ1* y *AR*) están significativamente infraexpresados en las muestras VSCC (Tabla 4).

IV. RESULTADOS

Tabla 4 Genes con expresión diferencial significativa entre 20 muestras HSIL y 27 muestras VSCC

Gen *	log2-ratio	P-value	FDR
CASC15	1,9094	1,76E-03	5,81E-03
CCNA1	1,7814	3,00E-06	5,94E-05
APOBEC3A	1,6779	2,05E-05	2,02E-04
CDKN2A	1,6733	9,00E-07	2,33E-05
ASCL1	1,6622	1,00E-07	5,20E-06
KRT17	1,6213	6,05E-05	5,31E-04
MMP9	1,5615	1,03E-03	3,68E-03
APOC1	1,4338	1,52E-04	8,56E-04
PRL	1,0342	1,21E-05	1,59E-04
SOX2	1,0213	8,18E-03	2,02E-02
AR	-1,0504	7,27E-05	5,39E-04
CASZ1	-1,0770	1,84E-04	9,66E-04
KLF4	-1,1050	8,36E-05	5,50E-04
ESR1	-1,1572	3,11E-04	1,53E-03
CALML5	-1,6598	1,37E-04	8,33E-04
SLIT2	-1,7595	7,50E-06	1,19E-04
ITGA8	-1,8738	1,00E-07	5,20E-06

* En rojo, sobreexpresión en VSCC; en azul, infraexpresión en VSCC

El análisis de clasificación jerárquica en base a la expresión de los 17 genes significativamente desregulados identificó 2 *clusters* principales (Figura 24). En el primer *cluster* se agruparon 8 VSCC positivos a VPH. El segundo *cluster* principal, se dividió a su vez en 3 sub-*clusters*. El primer sub-*cluster* agrupó 13 VSCC, incluyendo a la mayoría de las no positivas a VPH16. En el segundo y tercer sub-*cluster* se agruparon todas las lesiones HSIL analizadas y 5 VSCC. Además, se mantuvo la tendencia a agrupar las muestras en función de su genotipo.

IV. RESULTADOS

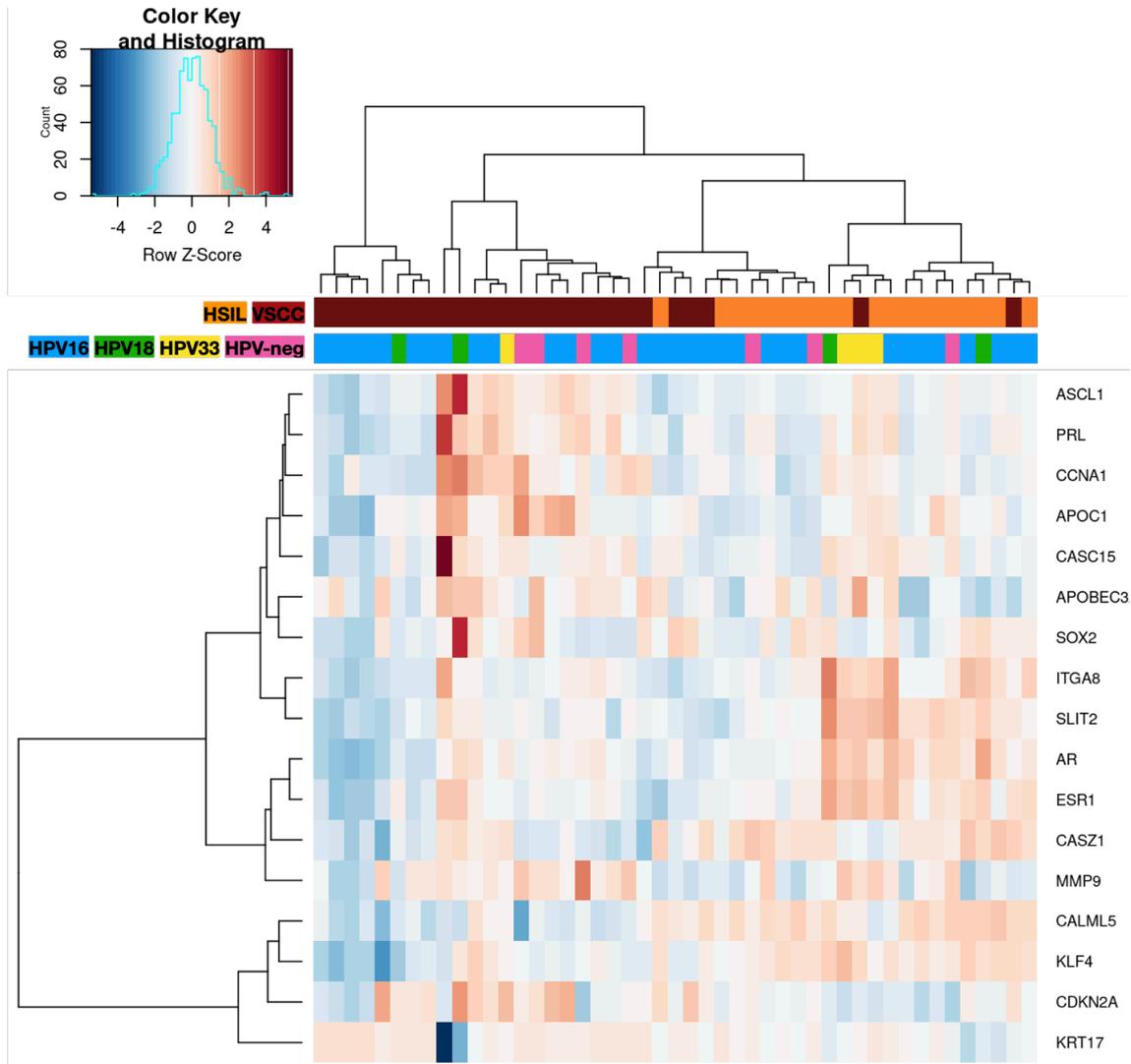


Figura 24 Clasificación jerárquica y mapa de calor en base a la expresión de los genes diferencialmente expresados entre las 20 muestras HSIL y las 27 muestras VSCC.

Debido al número limitado de lesiones de vulva negativas a VPH analizadas no se identificaron diferencias significativas en el perfil de expresión al comparar lesiones VPH positivas con lesiones VPH negativas (Figura 25).

IV. RESULTADOS

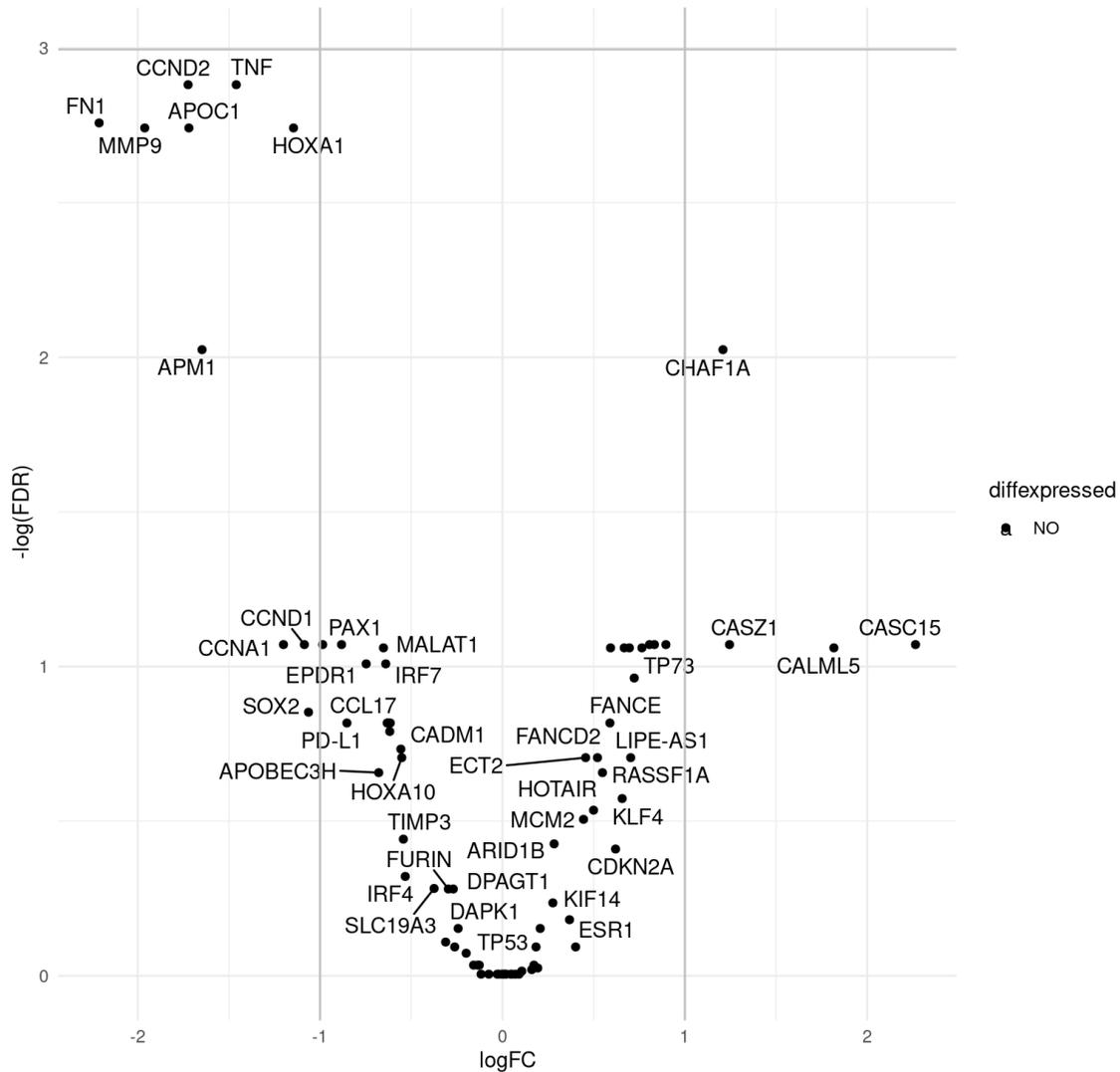


Figura 25 Gráfico de volcán con los resultados del análisis de expresión diferencial entre 4 muestras VSCC negativas y 23 muestras VSCC positivas a VPH. A la derecha, genes sobreexpresados en muestras negativas; a la izquierda, genes sobreexpresados en muestras positivas a VPH.

Con el objetivo de analizar si el grupo de genes identificado eran específicos de la carcinogénesis mediada por VPH se realizó un análisis de expresión génica, excluyendo las muestras VPH negativas, comparando las 23 muestras VSCC y las 17 muestras HSIL positivas a VPH.

IV. RESULTADOS

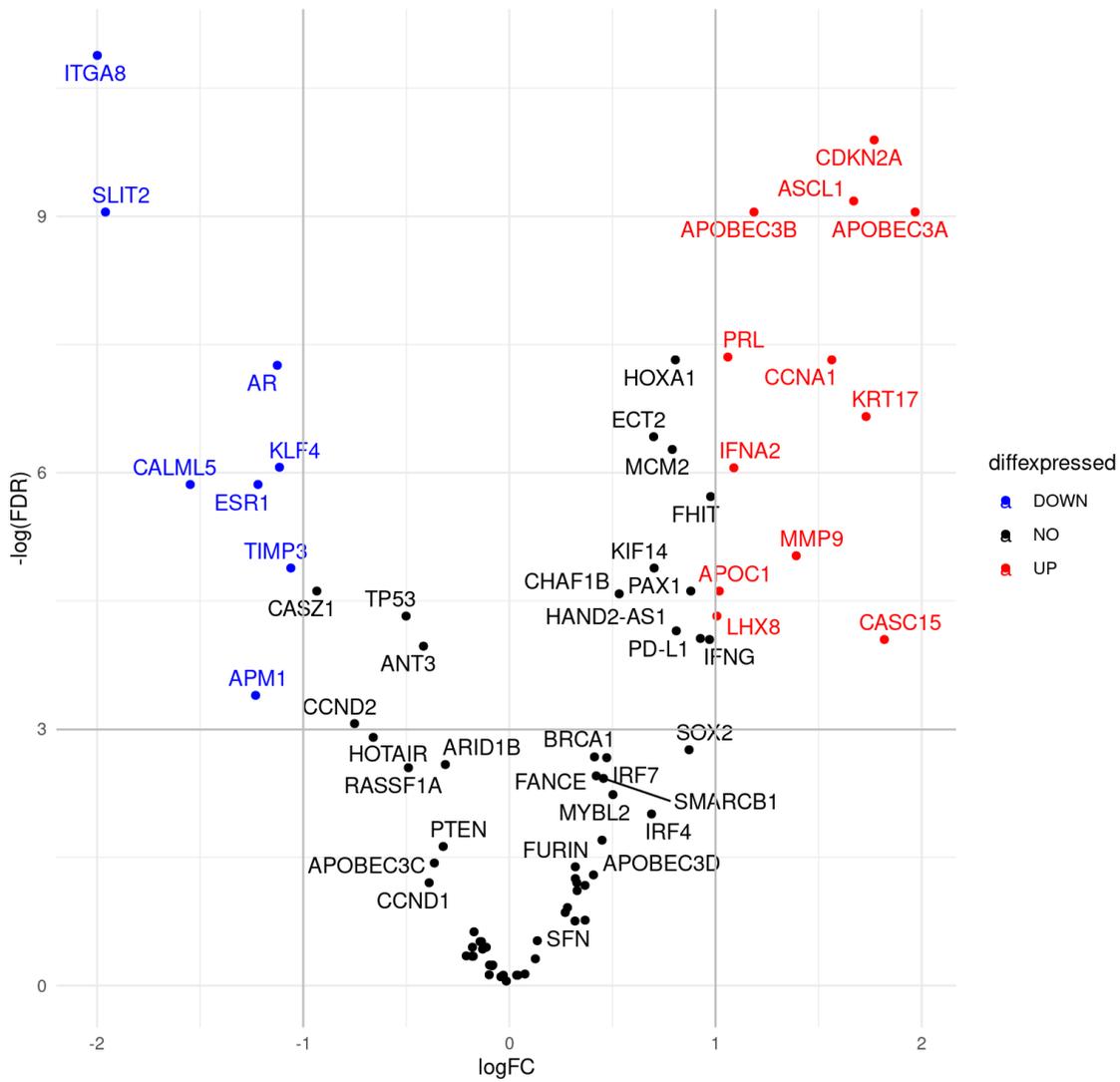


Figura 26 Gráfico de volcán con los resultados del análisis de expresión diferencial entre 17 muestras HSIL y 23 muestras VSCC positivas a VPH. En rojo, genes sobreexpresados; en azul, genes infraexpresados significativamente en el grupo VSCC

Se identificaron 20 genes cuya expresión era significativamente diferente al comparar HSIL y VSCC VPH positivos (Figura 26). 9 de los 10 genes sobreexpresados y 6 de los 7 genes infraexpresados en la comparativa con todas las muestras, se mantuvieron significativamente alterados ($\log_2\text{-ratio} > 1$; $\text{FDR} < 0,05$) al analizar la expresión diferencial en las muestras positivas a VPH. Adicionalmente, *APOBEC3B*, *IFNA2* y *LHX8* aparecieron en este caso como significativamente sobreexpresados en VSCC, mientras que *TIMP3* y *APM1* resultaron significativamente inhibidos al centrar el análisis en muestras VPH positivas (Tabla 5. Resultados completos en Tabla S.2).

IV. RESULTADOS

Tabla 5 Genes con expresión diferencial significativa entre 17 muestras HSIL y 23 muestras VSCC positivas a VPH.

Gen *	log2-ratio	P-value	FDR
<i>APOBEC3A</i>	1,9682	8,50E-06	1,17E-04
<i>CASC15</i>	1,8187	6,85E-03	1,74E-02
<i>CDKN2A</i>	1,7696	1,30E-06	5,05E-05
<i>KRT17</i>	1,7301	1,79E-04	1,28E-03
<i>ASCL1</i>	1,6701	3,90E-06	1,03E-04
<i>CCNA1</i>	1,5636	7,15E-05	6,62E-04
<i>MMP9</i>	1,3913	1,57E-03	6,55E-03
<i>APOBEC3B</i>	1,1864	8,90E-06	1,17E-04
<i>IFNA2</i>	1,0887	4,44E-04	2,34E-03
<i>PRL</i>	1,0598	5,68E-05	6,41E-04
<i>APOC1</i>	1,0182	2,96E-03	9,90E-03
<i>LHX8</i>	1,0065	4,44E-03	1,33E-02
<i>TIMP3</i>	-1,0603	1,96E-03	7,56E-03
<i>KLF4</i>	-1,1153	4,12E-04	2,32E-03
<i>AR</i>	-1,1259	8,93E-05	7,06E-04
<i>ESR1</i>	-1,2195	5,84E-04	2,84E-03
<i>APM1</i>	-1,2311	1,40E-02	3,35E-02
<i>CALML5</i>	-1,5482	6,12E-04	2,84E-03
<i>SLIT2</i>	-1,9596	7,00E-06	1,17E-04
<i>ITGA8</i>	-1,9991	2,00E-07	1,88E-05

* En rojo, sobreexpresión en VSCC; en azul, infraexpresión en VSCC

IV.1.6. Expresión génica diferencial entre HSIL y VSCC en muestras positivas a VPH16

Con el fin de identificar genes específicamente alterados en la carcinogénesis mediada por el VPH16, se compararon los perfiles de expresión entre las 32 muestras positivas a VPH16 (13 HSIL y 19 VSCC) incluidas en los ensayos realizados con la tecnología NanoString. El análisis de expresión diferencial con EdgeR mostró un mayor número de genes sobreexpresados en el grupo de VSCC que infraexpresados (Figura 27).

IV. RESULTADOS

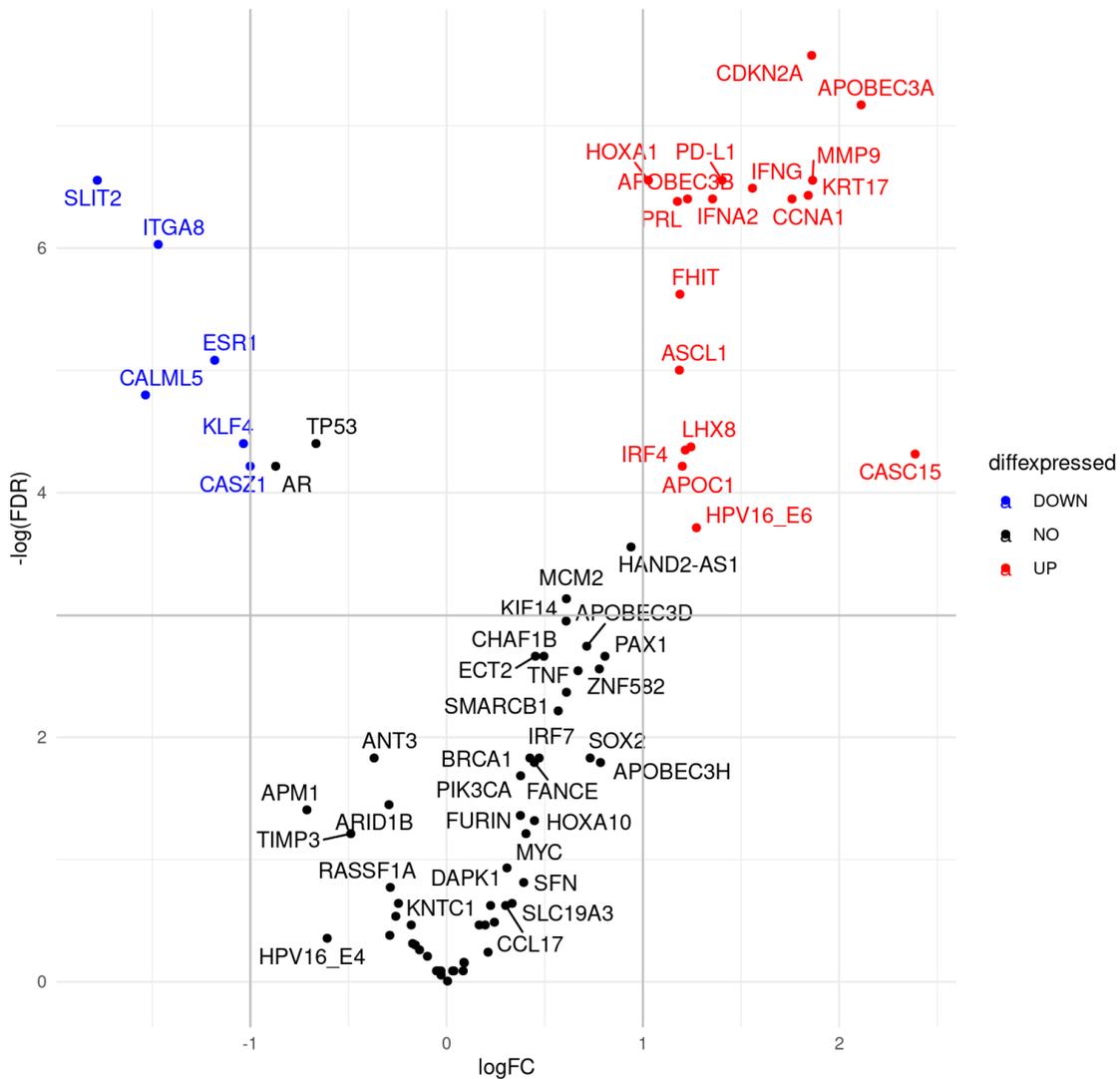


Figura 27 Gráfico de volcán con los resultados del análisis de expresión diferencial entre 13 muestras HSIL y 19 muestras VSCC positivas a VPH16. En rojo, genes sobreexpresados; en azul, genes infraexpresados significativamente en el grupo VSCC.

Se identificaron 24 genes (*CASC15*, *APOBEC3A*, *MMP9*, *CDKN2A*, *KRT17*, *CCNA1*, *IFNG*, *PD-L1*, *IFNA2*, *HPV16_E6*, *LHX8*, *APOBEC3B*, *IRF4*, *APOC1*, *FHIT*, *ASCL1*, *PRL* y *HOXA1*) como significativamente sobre- o infraexpresados ($\log_2\text{-ratio} > 1$, $\text{FDR} < 0,05$) en el grupo de VSCC (Tabla 6, resultados completos en Tabla S.3). Cabe destacar que 12 de los genes sobreexpresados coinciden con los observados al comparar todas las muestras positivas a VPH. Por lo tanto, se identificaron 5 genes exclusivamente sobreexpresados en las muestras positivas a VPH16. Además de los genes humanos, se observó una mayor expresión en VSCC del gen viral *E6*. También se observó que el gen *E4* está más expresado en las muestras HSIL, aunque no de forma significativa (Figura 27).

IV. RESULTADOS

Tabla 6 Genes con expresión diferencial significativa entre 13 muestras HSIL y 19 muestras VSCC positivas a VPH16

Gen *	log2-ratio	P-value	FDR
<i>CASC15</i>	2,3873	3,63E-03	1,34E-02
<i>APOBEC3A</i>	2,1122	1,90E-05	7,69E-04
<i>MMP9</i>	1,8647	1,06E-04	1,42E-03
<i>CDKN2A</i>	1,8599	6,30E-06	5,13E-04
<i>KRT17</i>	1,8424	1,59E-04	1,61E-03
<i>CCNA1</i>	1,7599	2,21E-04	1,66E-03
<i>IFNG</i>	1,5584	1,31E-04	1,52E-03
<i>PD-L1</i>	1,4038	9,91E-05	1,42E-03
<i>IFNA2</i>	1,3551	2,25E-04	1,66E-03
<i>HPV16_E6</i>	1,2730	7,83E-03	2,44E-02
<i>LHX8</i>	1,2447	3,11E-03	1,26E-02
<i>APOBEC3B</i>	1,2276	2,02E-04	1,66E-03
<i>IRF4</i>	1,2161	3,35E-03	1,29E-02
<i>APOC1</i>	1,2010	4,34E-03	1,48E-02
<i>FHIT</i>	1,1889	6,25E-04	3,62E-03
<i>ASCL1</i>	1,1861	1,33E-03	6,72E-03
<i>PRL</i>	1,1761	2,51E-04	1,69E-03
<i>HOXA1</i>	1,0281	5,33E-05	1,42E-03
<i>CASZ1</i>	-1,0010	4,49E-03	1,48E-02
<i>KLF4</i>	-1,0352	2,88E-03	1,23E-02
<i>ESR1</i>	-1,1816	1,15E-03	6,20E-03
<i>ITGA8</i>	-1,4698	3,86E-04	2,41E-03
<i>CALML5</i>	-1,5345	1,73E-03	8,24E-03
<i>SLIT2</i>	-1,7801	8,89E-05	1,42E-03

* En rojo, sobreexpresión en VSCC; en azul, infraexpresión en VSCC

Por otro lado, se identificaron 6 genes (*CASZ1*, *KLF4*, *ESR1*, *ITGA8*, *CALML5* y *SLIT2*) significativamente infraexpresados ($\log_2\text{-ratio} > 1$, $\text{FDR} < 0,05$) en el grupo de VSCC (Figura 27), 5 son coincidentes con los identificados al comparar todas las muestras positivas a VPH.

En el análisis de clasificación jerárquica de las 32 muestras positivas a VPH16, pero basada en la expresión de los genes significativamente desregulados, el

IV. RESULTADOS

análisis reveló dos *clusters* principales, uno compuesto por 5 muestras de VSCC, de las cuales 4 eran positivas a la variante C de VPH16 y una a la variante D. El otro *cluster* principal se dividió a su vez en otros 3 sub-*clusters*. El primero de ellos también agrupó principalmente muestras de VSCC, el segundo muestras de HSIL, incluyendo a la mayoría que eran positivas a linajes diferentes del A. El tercer sub-*cluster* por su parte agrupó muestras de los linajes A y D, incluyendo muestras de HSIL y de VSCC (Figura 28).

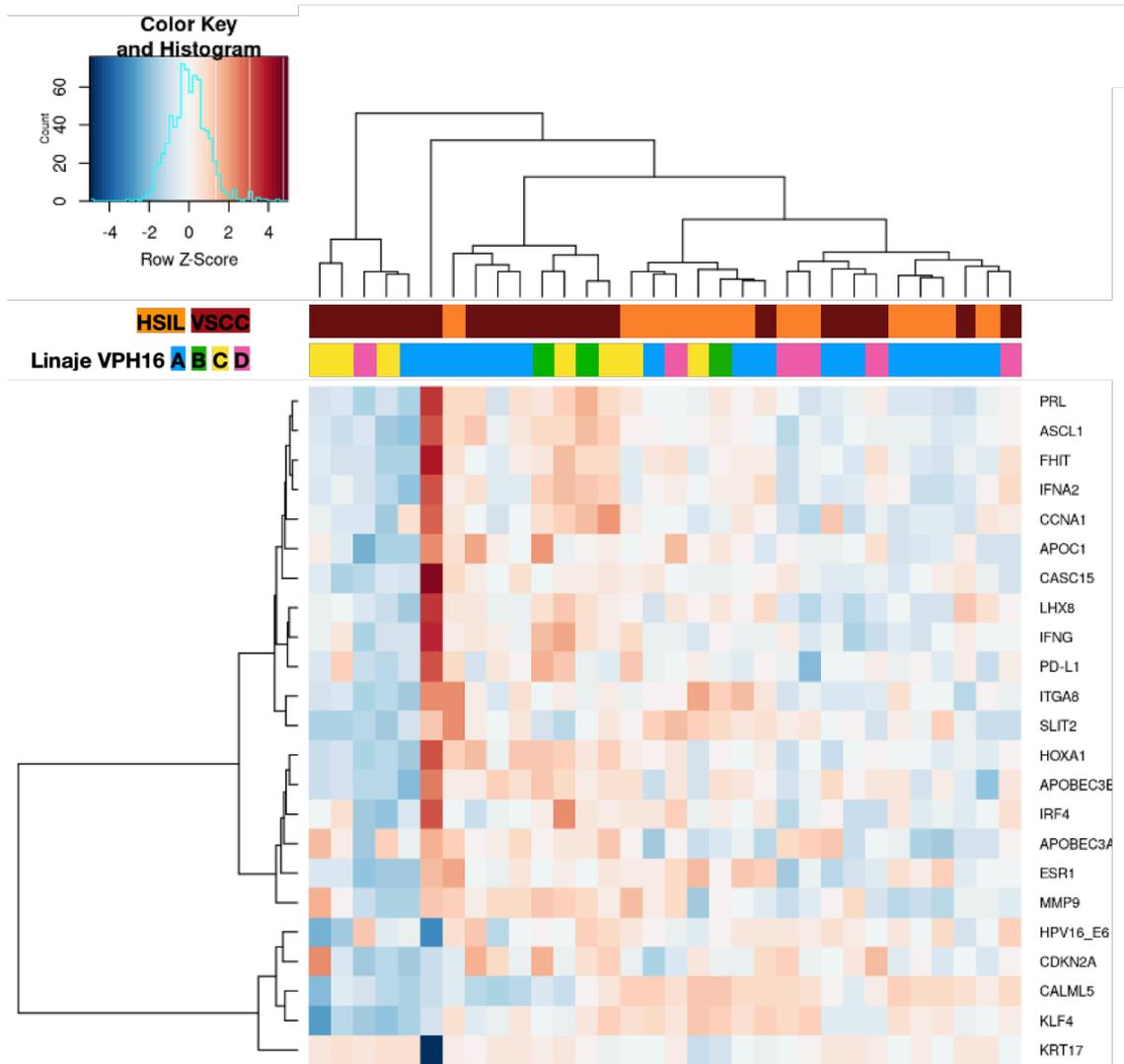


Figura 28 Clasificación jerárquica y mapa de calor en base a la expresión de los genes diferencialmente alterados entre las 13 muestras HSIL y las 19 muestras VSCC positivas a VPH16.

Para validar los resultados obtenidos, se utilizó un conjunto independiente de 110 muestras positivas a VPH16 (61 HSIL y 49 VSCC) de la misma colección, en las que se analizó, mediante ensayos individuales de RT-qPCR, la expresión relativa de 3 genes diferencialmente expresados entre HSIL y VSCC

IV. RESULTADOS

(*APOBEC3A*, *KLF4* y *CALML5*). Los resultados confirmaron que *APOBEC3A* está sobreexpresado en muestras VSCC (P -valor = 0,035, Mann-Whitney), mientras que la expresión de *KLF4* (P -valor = $5,6 \cdot 10^{-13}$, Mann-Whitney) y *CALML5* (P -valor = $1,73 \cdot 10^{-8}$, Mann-Whitney) están significativamente más expresados en HSIL (Figura 29).

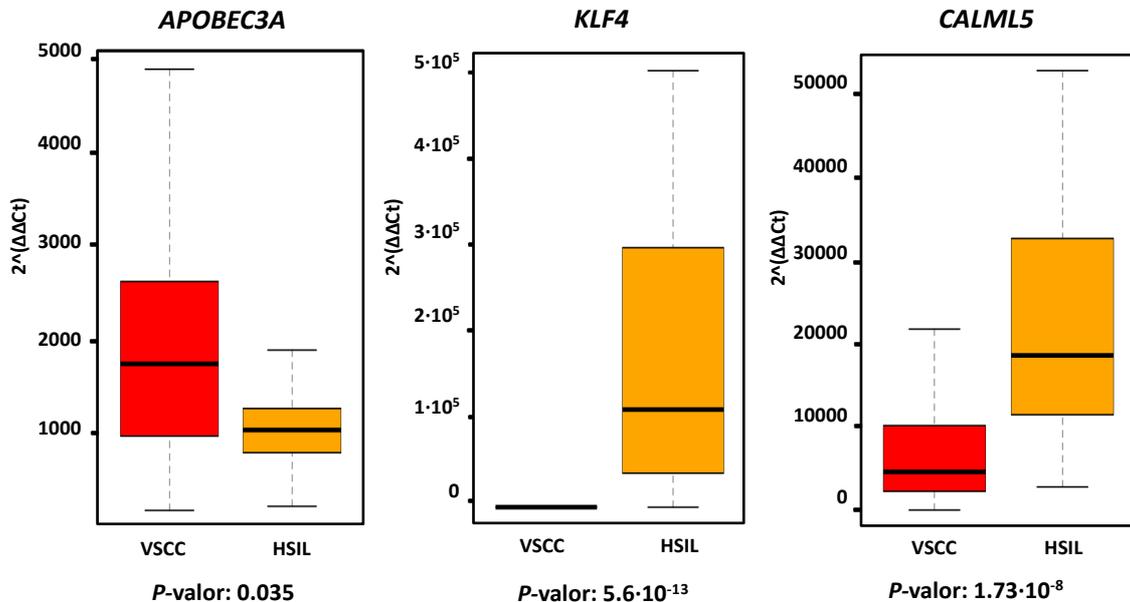


Figura 29 Resultados de la validación, mediante RT-qPCR, de la expresión diferencial de los genes *APOBEC3A*, *CALML5*, *KLF4*. Los diagramas de cajas representan los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las muestras de cada grupo, VSCC en rojo y HSIL en naranja. Los valores considerados como outliers se han eliminado de la figura. Los valores de P representan la significancia estadística de las diferencias entre grupos (Prueba U de Mann-Whitney). Un P -valor $< 0,05$ fue considerado significativo.

IV.1.7. Expresión diferencial entre variantes de VPH16

Se analizó también la expresión diferencial entre las diferentes variantes de VPH16 con el fin de identificar la existencia de genes diferencialmente expresados entre ellas, con el fin de encontrar genes cuya expresión ayude a explicar las diferencias en el riesgo de progresión a cáncer, demostradas al menos en el caso del cérvix. Al comparar la expresión génica de las 16 muestras del linaje A con las 16 muestras del linaje B, C y D, consideradas de mayor riesgo, se identificó únicamente el gen *CASC15* como sobreexpresado en las muestras positivas al linaje A de VPH16 (\log_2 -ratio = 3,04; FDR = $8,5 \cdot 10^{-3}$, resultados completos en Tabla S.4). El mismo resultado se obtuvo al analizar exclusivamente las muestras VSCC, 9 positivas a VPH16-A y 10 positivas a VPH16-B/C/D (\log_2 -ratio = 3,70; FDR = $7,9 \cdot 10^{-3}$) (Figura 30).

IV. RESULTADOS

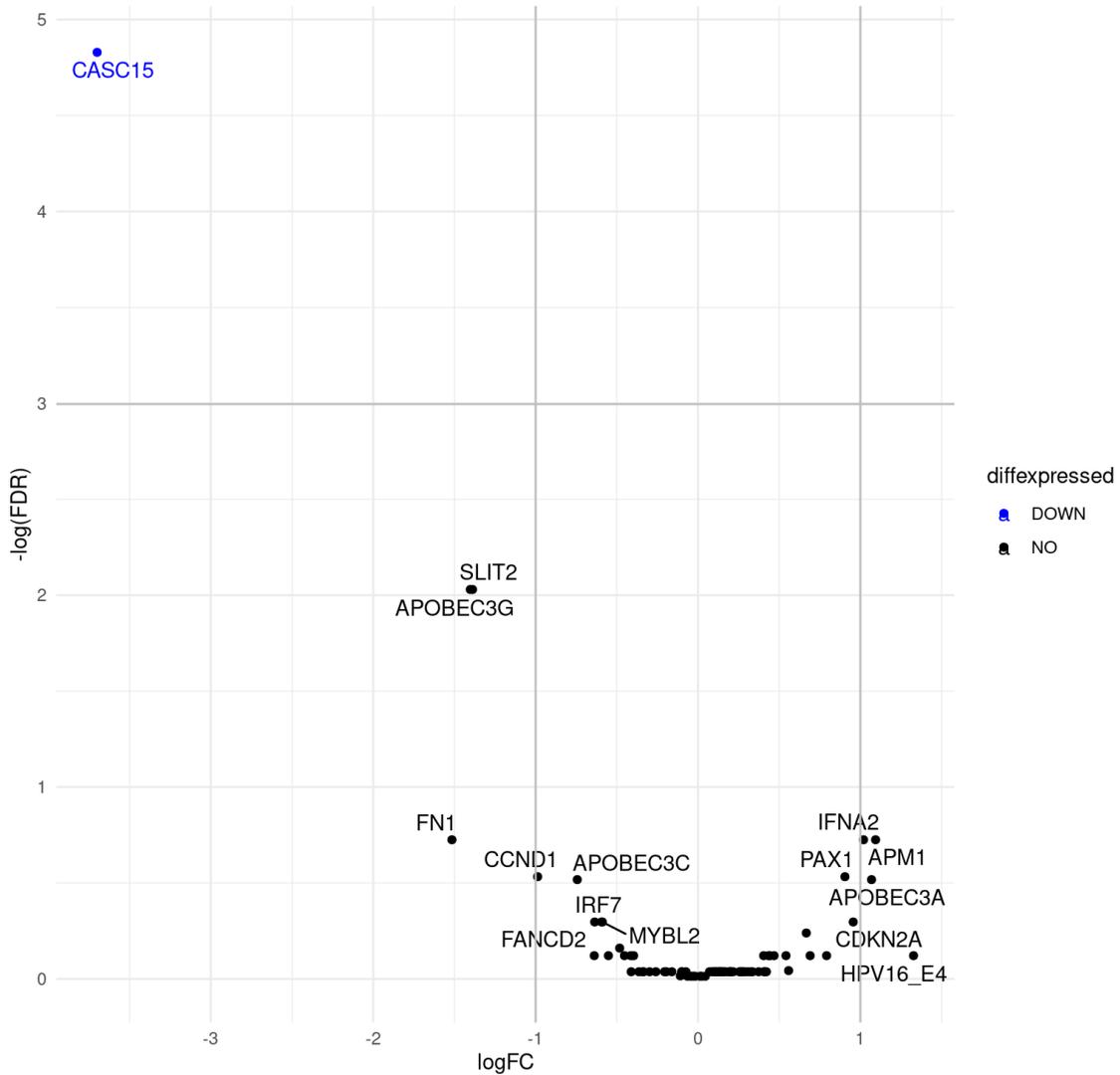


Figura 30 Gráfico de volcán con los resultados del análisis de expresión diferencial entre 9 muestras VSCC positivas a VPH16-A y 10 muestras VSCC positivas a VPH16-B/C/D. En azul, genes significativamente sobreexpresado en muestras positivas a VPH16-A.

IV.2. Análisis de expresión de miRNAs en muestras HSIL y VSCC de vulva

IV.2.1. Población de estudio

24 de las 48 muestras utilizadas para analizar la expresión del panel de mRNAs se utilizaron para evaluar también la expresión de un panel de 798 miRNAs. El conjunto incluyó 11 muestras HSIL y 13 muestras VSCC, y sus características se muestran en la Tabla 7.

IV. RESULTADOS

Tabla 7 Características fenotípicas del conjunto de muestras utilizado para el análisis de expresión de miRNAs

		HSIL	VSCC	
VPH-16	A-1/2/3	2	2	4
	A-4	1	2	3
	B	0	1	1
	C	2	2	4
	D	2	2	3
VPH-18		1	1	2
VPH-33		1	1	2
VPH-neg		2	2	4
Total		11	13	24

El grado de integridad del RNA de todas las muestras fue suficiente de acuerdo con los resultados obtenidos mediante el análisis en el dispositivo TapeStation (Agilent).

IV.2.2. Control de calidad y normalización de datos

Tras completar los experimentos de expresión con el nCounter Human v3 miRNA expression panel (NanoString), los resultados se sometieron a un control de calidad de la técnica realizado por el software de NanoString que toma las imágenes de las sondas marcadas con fluoróforos que se han hibridado con sus secuencias diana. Todas las muestras superaron positivamente el control de calidad.

Igual que para los mRNAs, se calculó la señal de ruido en base a las lecturas de los controles negativos y se substrajo de los recuentos del resto de genes diana cuantificados.

En el proceso de filtrado se eliminaron 81 miRNAs que no alcanzaron un mínimo de 15 lecturas en al menos dos muestras, quedando un total de 717 miRNAs, aparte de los controles positivos y negativos, así como los genes de expresión constitutiva utilizados para la normalización de las lecturas.

Las lecturas crudas se normalizaron, utilizando el paquete RUVseq, en base a las lecturas de los 5 genes de expresión constitutiva incluidos en el ensayo (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *RPLP19*, *RPLP0*). Un primer análisis de expresión

IV. RESULTADOS

diferencial determinó que los 5 genes utilizados para la normalización eran estables ($\log_2\text{-ratio} < 0,05$) y válidos para realizar la normalización de los datos.

IV.2.3. Análisis no supervisado de expresión de miRNAs

Los datos normalizados de expresión de miRNAs se sometieron a un análisis no supervisado utilizando el método de Análisis de Componentes Principales (PCA). En los gráficos de PCA de la Figura 31 no se observan grupos de muestras claramente separados según el grado de enfermedad (Figura 31-A), ni tampoco por la positividad a VPH (Figura 31-B).

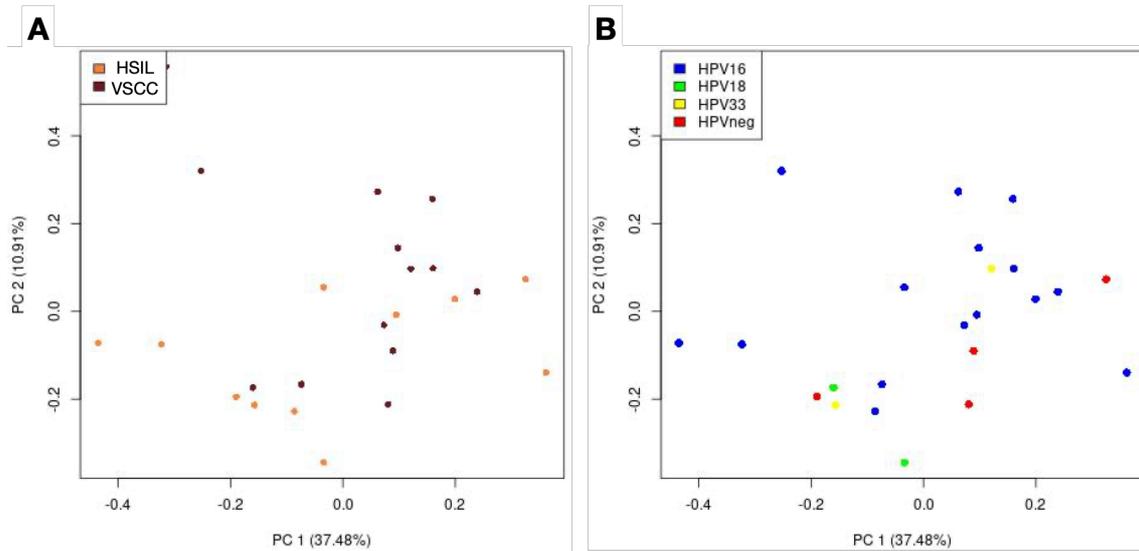


Figura 31 Análisis no supervisado por PCA en base a la expresión de 717 miRNAs en las 24 muestras analizadas. A) Muestras coloreadas en función del grado de enfermedad; HSIL en naranja, VSCC en granate. B) Muestras coloreadas en función de positividad a VPH: VPH16 en azul, VPH18 en verde, VPH33 en amarillo, VPH-negativo en rojo.

IV.2.4. Expresión diferencial de miRNAs entre muestras HSIL y VSCC

Se analizó con EdgeR la expresión de los 717 miRNAs en las 24 muestras con el fin de identificar miRNAs diferencialmente expresados entre las 11 muestras HSIL y las 13 muestras VSCC.

IV. RESULTADOS

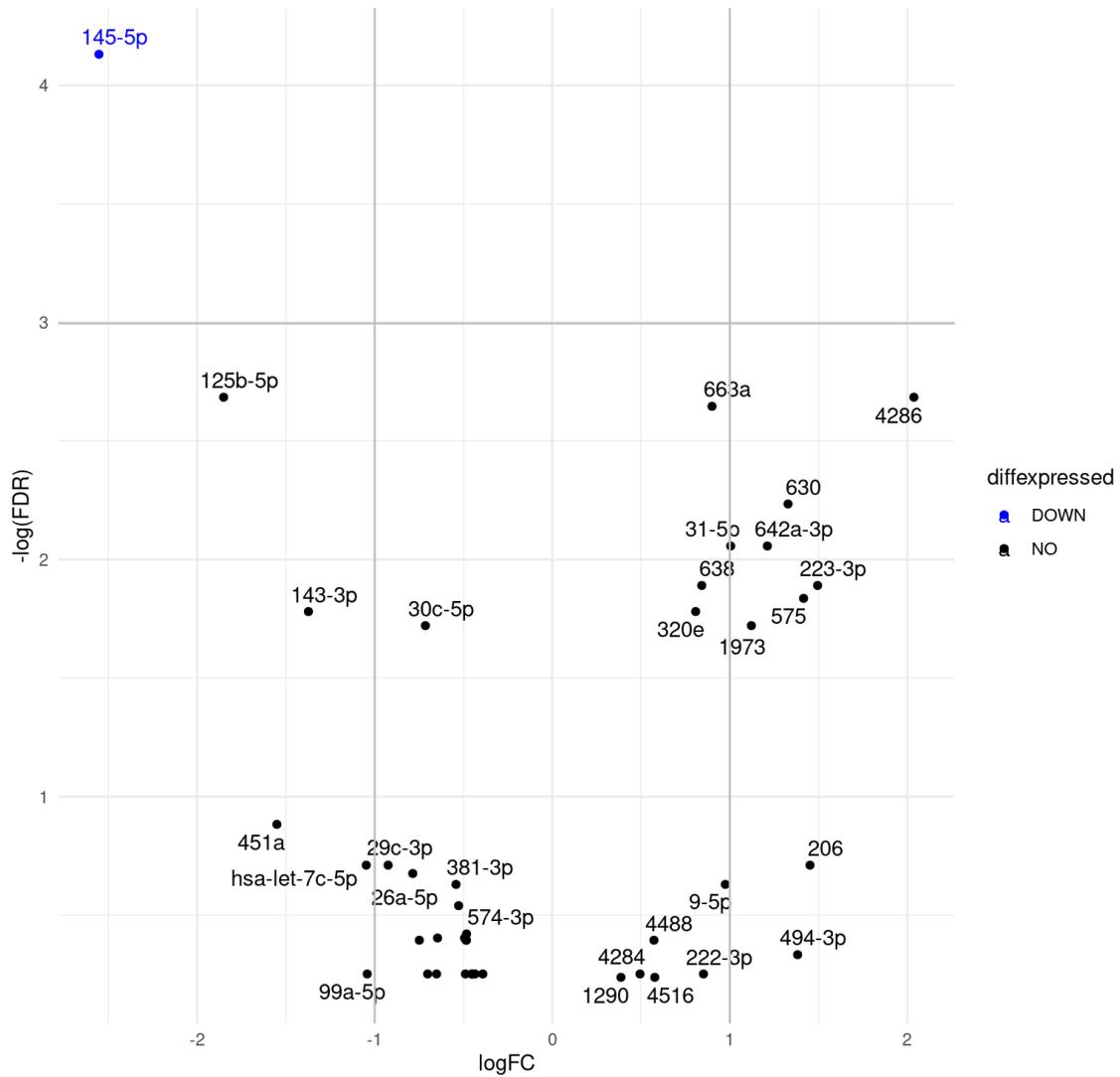


Figura 32 Expresión diferencial de miRNAs entre las 13 muestras VSCC y 11 muestras HSIL analizadas. En azul, miRNA significativamente infraexpresado en VSCC

A pesar de que 14 miRNAs mostraron una expresión diferencial por encima del umbral ($\log_2\text{-ratio} > 1$) y $P\text{-valor} < 0,05$ (Tabla 8, resultados completos en Tabla S.5), únicamente el miR-145-5p presentó diferencias significativas con un $FDR < 0,05$ (Figura 32).

IV. RESULTADOS

Tabla 8 miRNAs diferencialmente expresados ($\log_2\text{-ratio} >1$, $P\text{-valor} <0,05$) entre 11 muestras HSIL y 13 muestras VSCC

miRNA *	$\log_2\text{-ratio}$	$P\text{-value}$	FDR **
miR-4286	2,0367	2,58E-04	6,83E-02
miR-223-3p	1,4944	1,71E-03	1,51E-01
miR-206	1,4517	1,12E-02	4,91E-01
miR-575	1,4155	2,22E-03	1,59E-01
miR-494-3p	1,3819	3,00E-02	7,16E-01
miR-630	1,3277	7,47E-04	1,07E-01
miR-642a-3p	1,2116	1,25E-03	1,28E-01
miR-1973	1,1215	3,30E-03	1,79E-01
miR-31-5p	1,0051	1,18E-03	1,28E-01
miR-99a-5p	-1,0421	3,92E-02	7,77E-01
let-7c-5p	-1,0475	1,23E-02	4,91E-01
miR-143-3p	-1,3730	2,69E-03	1,69E-01
miR-451a	-1,5508	8,65E-03	4,13E-01
miR-125b-5p	-1,8508	2,86E-04	6,83E-02
miR-145-5p	-2,5530	2,24E-05	1,61E-02

*En rojo, sobreexpresión en VSCC; en azul, infraexpresión en VSCC

**Reseña en verde indica valor de FDR estadísticamente significativo

Al repetir el análisis incluyendo únicamente las 9 muestras HSIL y 11 muestras VSCC positivas a VPH, se observó que 4 miRNAs (miR-575, miR-630, miR-642a-3p y miR-663a) estaban significativamente sobreexpresados ($\log_2\text{-ratio} >1$, $FDR <0,05$) en el grupo VSCC, mientras 2 miRNAs (miR-145-5p y miR-125b-5p) resultaron significativamente infraexpresados (Figura 33).

IV. RESULTADOS

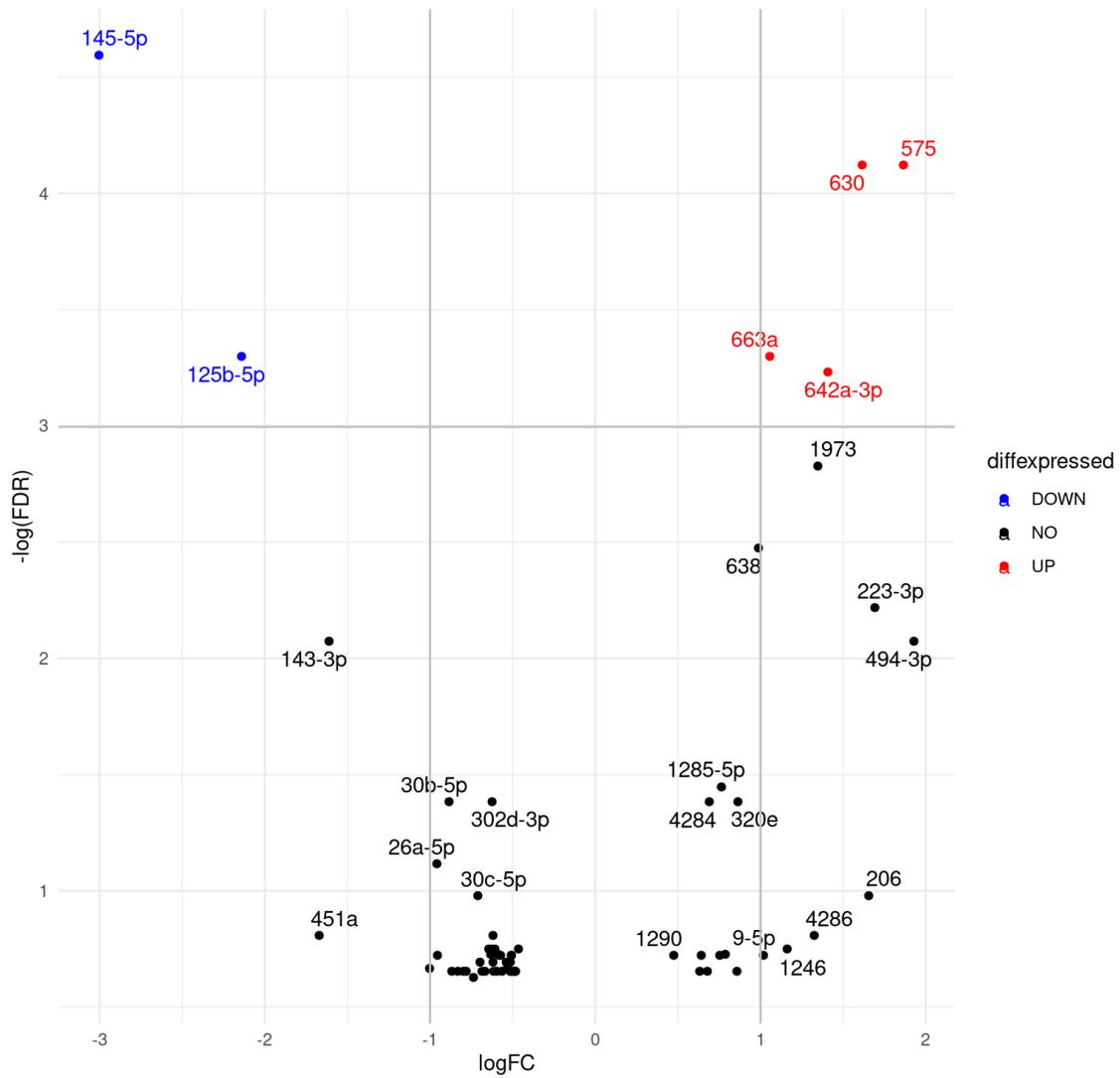


Figura 33 Expresión diferencial de miRNAs entre las 11 muestras VSCC y 9 muestras HSIL positivas a VPH analizadas. En rojo, miRNAs significativamente sobreexpresados en VSCC; en azul, miRNAs significativamente inhibidos en VSCC.

Además, otros 10 miRNAs mostraron una expresión diferencial por encima del umbral ($\log_2\text{-ratio} > 1$) y P -valor menor a 0,05 (Tabla 9, resultados completos en Tabla S.6).

IV. RESULTADOS

Tabla 9 miRNAs diferencialmente expresados ($\log_2\text{-ratio} > 1$, $P\text{-valor} < 0,05$) entre 9 muestras HSIL y 11 muestras VSCC positivas a VPH.

miRNA *	$\log_2\text{-ratio}$	P-value	FDR **
miR-494-3p	1,9283	1,93E-03	1,26E-01
miR-575	1,8648	4,86E-05	1,62E-02
miR-223-3p	1,6921	1,37E-03	1,09E-01
miR-206	1,6550	9,86E-03	3,75E-01
miR-630	1,6150	6,78E-05	1,62E-02
miR-642a-3p	1,4075	3,30E-04	3,95E-02
miR-1973	1,3468	5,78E-04	5,92E-02
miR-4286	1,3249	1,32E-02	4,45E-01
miR-1246	1,1614	1,72E-02	4,72E-01
miR-663a	1,0559	2,58E-04	3,69E-02
miR-9-5p	1,0178	2,37E-02	4,85E-01
let-7c-5p	-1,0032	3,24E-02	5,13E-01
miR-143-3p	-1,6113	1,83E-03	1,26E-01
miR-451a	-1,6711	1,37E-02	4,45E-01
miR-125b-5p	-2,1410	2,07E-04	3,69E-02
miR-145-5p	-3,0040	1,41E-05	1,01E-02

*En rojo, sobreexpresión en VSCC; en azul, infraexpresión en VSCC

**Reseña en verde indica valor de FDR estadísticamente significativo

A partir de los valores de lecturas normalizadas de los miRNAs significativamente desregulados, se realizaron análisis mediante PCA (Figura 34) y de clasificación jerárquica (Figura 35). La expresión de los miRNAs diferencialmente expresados es capaz de diferenciar el grupo HSIL del grupo VSCC en muestras positivas a VPH.

IV. RESULTADOS

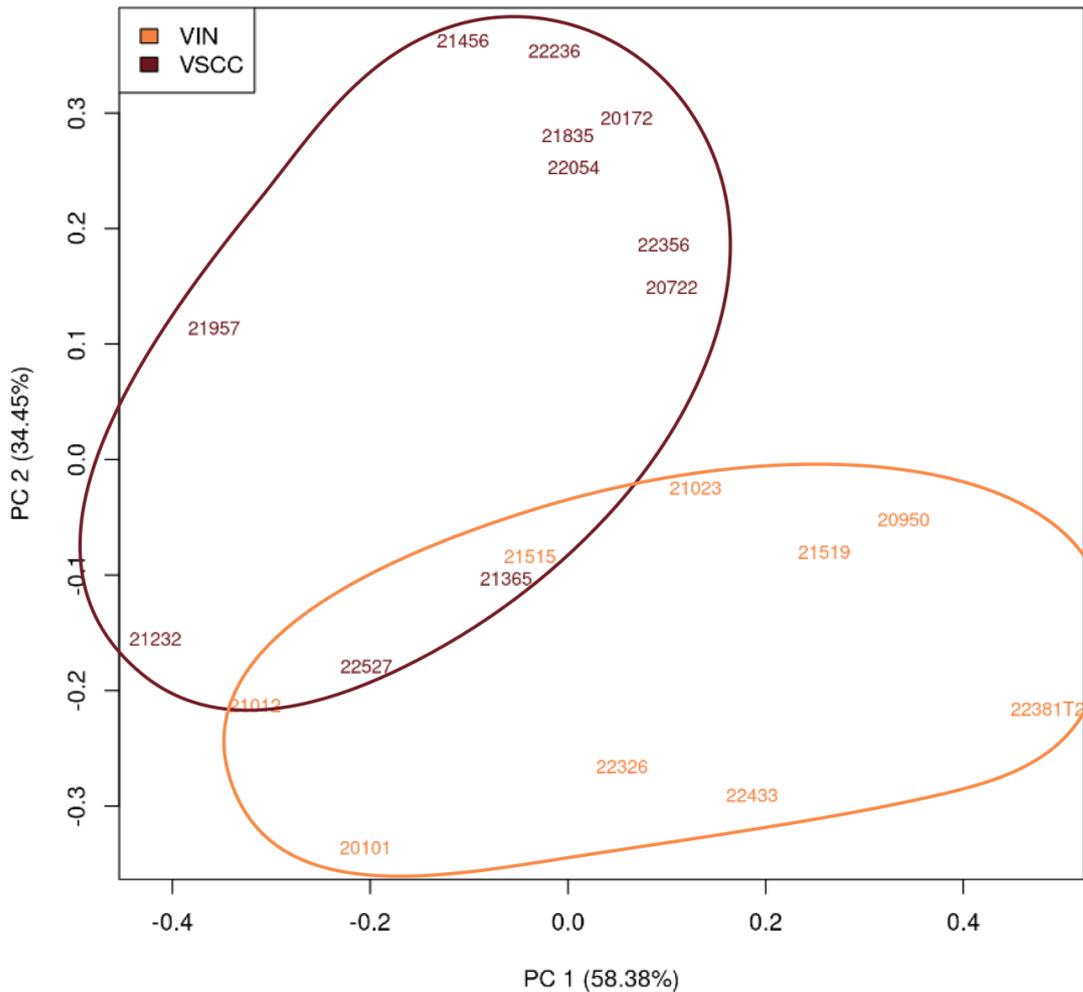


Figura 34 PCA en base a los 6 miRNAs diferencialmente expresados entre las 9 muestras HSIL y las 11 muestras VSCC. En naranja, muestras HSIL; en granate, muestras VSCC. Los números corresponden a los identificadores de cada muestra analizada.

En la clasificación jerárquica, se observan dos *clusters* principales de muestras. El primer *cluster* agrupó únicamente muestras HSIL, mientras que el segundo agrupó en su mayoría muestras de VSCC (Figura 35).

IV. RESULTADOS

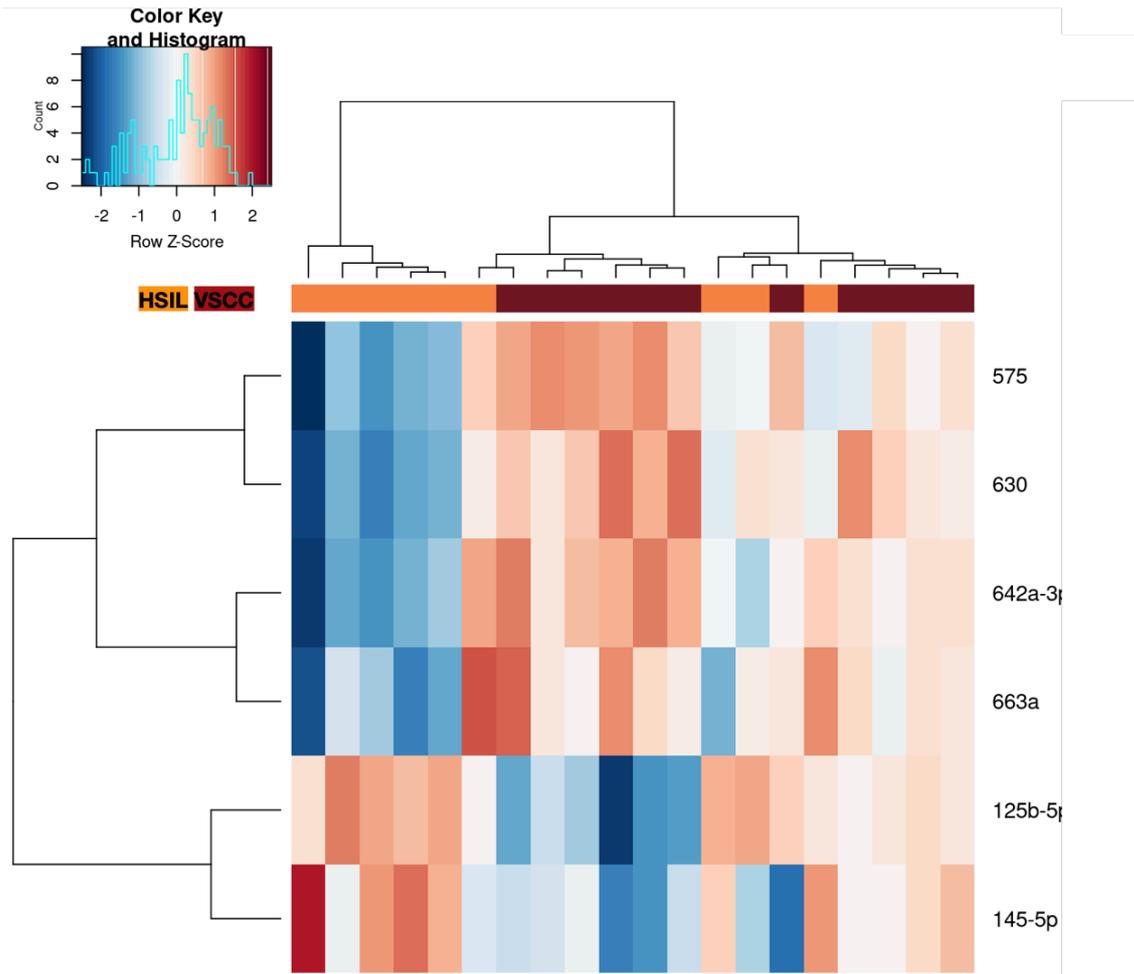


Figura 35 Clasificación jerárquica y mapa de calor en función de la expresión de los 6 miRNAs diferencialmente expresados entre 9 muestras HSIL (naranja) y 11 muestras VSCC (granate).

Los diferentes resultados observados al excluir las muestras negativas a VPH del análisis de expresión diferencial sugieren que tienen un perfil de expresión de miRNAs diferente a las positivas. Sin embargo, el análisis con EdgeR entre muestras positivas (N=20) y negativas a VPH (N=4) no identificó ningún miRNA con expresión diferencial significativa. Tampoco al comparar exclusivamente muestras de VSCC (dato no mostrado).

IV.2.5. Expresión diferencial de miRNAs entre HSIL y VSCC en muestras positivas a VPH16

Con el objetivo de comprobar si existen miRNAs alterados específicamente en las muestras positivas a VPH16, se hizo una nueva comparativa de la expresión de miRNAs entre las 7 muestras HSIL y las 9 VSCC positivas a VPH16. En el análisis con EdgeR se identificaron 17 miRNAs con expresión diferencial por encima del umbral ($\log_2\text{-ratio} > 1$) y P -valor menor a 0,05 (Tabla 10, resultados

IV. RESULTADOS

completos en Tabla S.7). Sin embargo, únicamente el miR-575 mostró valor de FDR estadísticamente significativo ($\log_2\text{-ratio} = 1,89$, $\text{FDR} = 0,04$) (Figura 36).

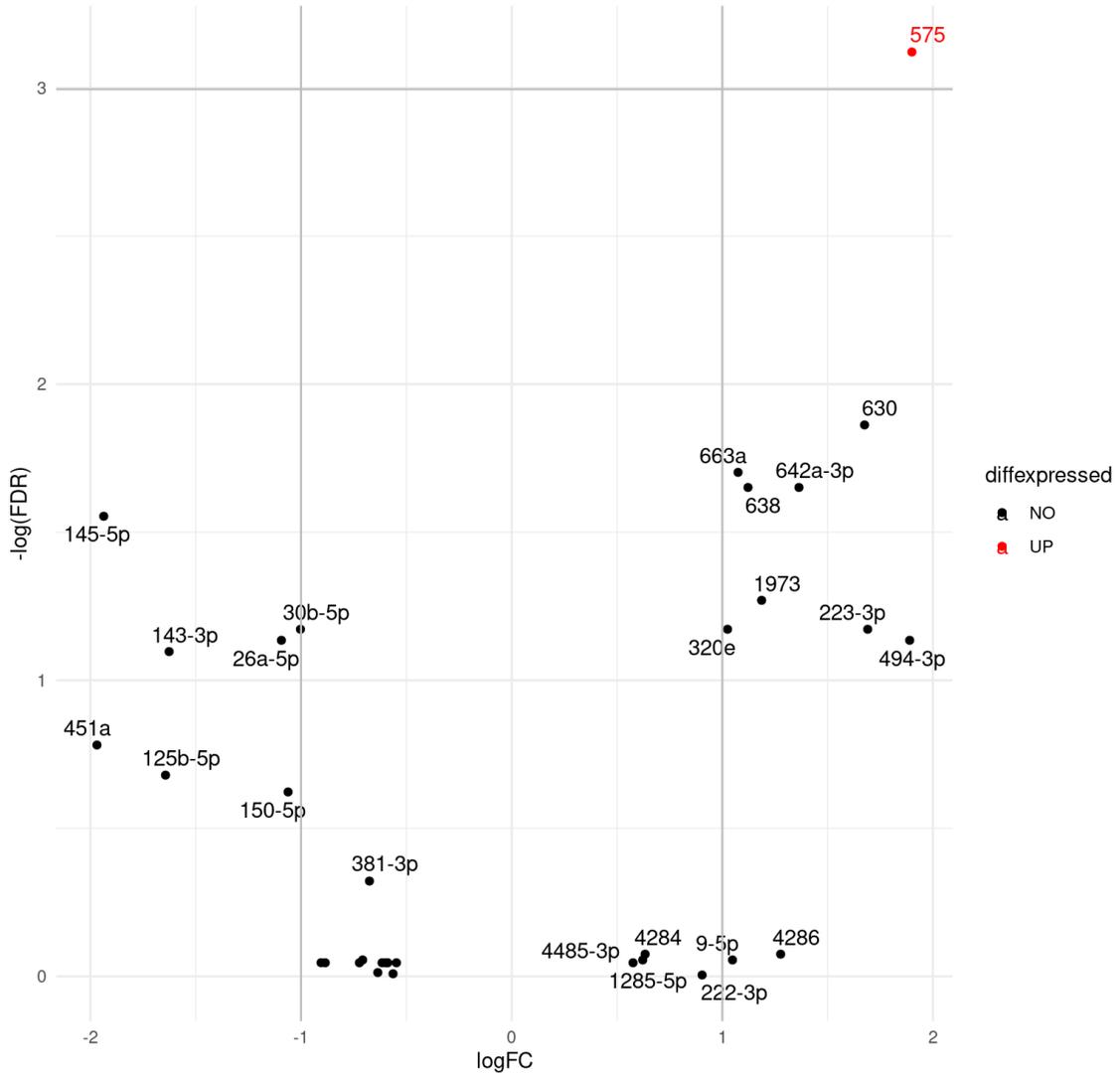


Figura 36 Expresión diferencial de miRNAs entre las 9 muestras VSCC y 7 muestras HSIL positivas a VPH analizadas. En rojo, miRNA significativamente sobreexpresado en muestras VSCC.

IV. RESULTADOS

Tabla 10 miRNAs diferencialmente expresados ($\log_2\text{-ratio} >1$, $P\text{-valor} <0,05$) entre 7 muestras HSIL y 9 muestras VSCC positivas a VPH16.

miRNA *	$\log_2\text{-ratio}$	$P\text{-value}$	FDR **
miR-494-3p	1,8879	5,10E-03	3,28E-01
miR-575	1,8652	5,15E-05	3,74E-02
miR-223-3p	1,7232	3,20E-03	2,90E-01
miR-630	1,6640	3,70E-04	1,34E-01
miR-642a-3p	1,3402	1,35E-03	2,16E-01
miR-4286	1,2569	2,57E-02	8,93E-01
miR-1973	1,1440	3,10E-03	2,90E-01
miR-638	1,0916	1,55E-03	2,16E-01
miR-9-5p	1,0442	3,00E-02	8,93E-01
miR-663a	1,0369	1,17E-03	2,16E-01
miR-320e	1,0034	3,97E-03	2,91E-01
miR-30b-5p	-1,0018	4,01E-03	2,91E-01
miR-150-5p	-1,0494	1,26E-02	5,70E-01
miR-26a-5p	-1,0845	5,64E-03	3,28E-01
miR-125b-5p	-1,6178	1,18E-02	5,70E-01
miR-143-3p	-1,6262	5,89E-03	3,28E-01
miR-145-5p	-1,9311	1,79E-03	2,16E-01
miR-451a	-1,9651	9,59E-03	4,96E-01

*En rojo, sobreexpresión en VSCC; en azul, infraexpresión en VSCC

**Reseña en verde indica valor de FDR estadísticamente significativo

El análisis de expresión diferencial entre las muestras positivas al linaje A de VPH16 y los linajes B, C y D agrupados no identificó ningún miRNA con expresión diferencial significativa. Tampoco al comparar muestras VSCC en exclusiva (dato no mostrado).

IV.2.6. Análisis de dianas de miRNAs y funciones biológicas alteradas

Con el fin de identificar procesos biológicos que puedan estar asociados al proceso de transformación desde las HSIL vulvares a VSCC, se utilizaron herramientas bioinformáticas para identificar los genes diana del grupo de miRNAs diferencialmente expresados, así como las funciones biológicas y enfermedades en el que dicho conjunto pueda estar sobrerrepresentado de forma significativa. Este análisis se realizó sobre los miRNAs que en el análisis de expresión diferencial entre muestras positivas a VPH16 presentaron un $P\text{-valor} <0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.2.6.1. Genes diana de los miRNAs alterados entre HSIL y VSCC

La búsqueda en miRTarBase identificó las dianas de los miRNAs alterados entre HSIL y VSCC. El número de dianas de cada uno, cuántas de ellas están validadas experimentalmente de forma robusta, así como los genes que resultaron alterados en los ensayos de expresión génica e interaccionan con cada miRNA están representados en la tabla 11.

Tabla 11 Genes diana de los miRNAs alterados entre los grupos HSIL y VSCC en muestras positivas a VPH16

miRNA	Nº dianas	Validación Robusta	Genes Difer. Expres.
hsa-miR-494-3p	129	29	
hsa-miR-575	121	2	
hsa-miR-223-3p	113	70	
hsa-miR-630	71	6	
hsa-miR-642a-3p	78	0	
hsa-miR-4286	105	2	
hsa-miR-1973	5	0	
hsa-miR-638	48	8	SOX2*
hsa-miR-9-5p	321	85	MMP9*, CALML5, ESR1*
hsa-miR-663a	111	20	KLF4*
hsa-miR-320e	49	0	
hsa-miR-30b-5p	406	30	
hsa-miR-150-5p	511	42	
hsa-miR-26a-5p	442	78	IRF4, ESR1
hsa-miR-125b-5p	466	112	CDKN2A*, IRF4
hsa-miR-143-3p	188	58	MMP9*, SOX2*, FHIT, KLF4*
hsa-miR-145-5p	248	152	MMP9*, SOX2*, KLF4*, ESR1*
hsa-miR-451a	39	33	MMP9*

* Dianas con validación experimental robusta

IV.2.6.2. Análisis de enriquecimiento de funciones

Cabe destacar que no todos los genes y miRNAs se expresan en todos los tejidos o tipos celulares, por tanto, conocer las dianas de cada miRNA, siendo interesante, no es suficiente para explicar el proceso de carcinogénesis de la vulva y cuáles son los procesos biológicos involucrados.

IV. RESULTADOS

Para identificar las funciones que puedan estar más alteradas y, por tanto, ser determinantes en la carcinogénesis asociada al VPH, se analizó la lista de 18 miRNAs alterados con TAM2.0.

El resultado obtenido fueron un total de 30 funciones biológicas en las que participan al menos 2 miRNAs de la lista, y suponen una sobrerrepresentación estadísticamente significativa (Tabla S.8). Entre las funciones con una sobrerrepresentación más significativa y un mayor número de miRNAs implicados se encontraron varias relacionadas con la regulación del ciclo celular, la proliferación celular, la respuesta inmunitaria o la apoptosis (Tabla 12).

Tabla 12 Lista de las funciones biológicas con sobrerrepresentación más significativa de los miRNAs alterados

Función biológica	Nº miRNAs	FDR
Ciclo celular	8	7,01E-08
Proliferación celular	7	7,22E-07
Inflamación	8	1,17E-06
Envejecimiento	6	1,27E-06
Motilidad celular	4	5,09E-06
Regulación de células troncales	6	6,99E-06
Apoptosis	7	7,16E-06
Diferenciación celular	5	7,38E-06
Inmunidad Innata	5	1,33E-05
miRNAs supresores de tumores	6	1,71E-05
Replicación latente de virus	3	3,73E-05
Respuesta inmunitaria	5	1,68E-04
Muerte celular	6	5,03E-04
Hematopoyesis	5	7,83E-04
Diferenciación de células plasmáticas	2	1,52E-03

Las diferentes funciones obtenidas se agruparon, bajo el criterio del autor, en diferentes grupos de procesos biológicos, identificando sobrerrepresentación significativa de los 18 miRNAs en 12 funciones relacionadas con proliferación celular y diferenciación, 7 con respuesta inmune e inflamación, 5 con la regulación del ciclo celular, 3 con la apoptosis y la respuesta a estrés, 2 con

IV. RESULTADOS

migración celular e invasión y una función que no concuerda con ninguno de estos grupos (Figura 37).

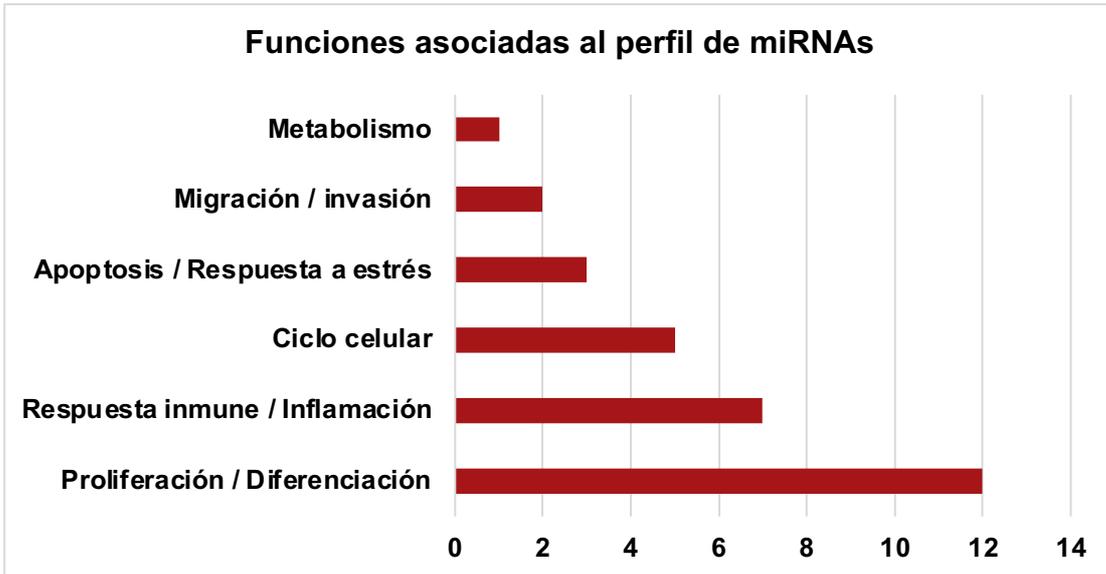


Figura 37 Gráfico de barras representando el número de funciones con sobrerrepresentación estadísticamente significativa (FDR < 0,05) de los 18 miRNAs alterados, por cada grupo establecido.

También se analizó la frecuencia con la que aparece cada miRNA en los diferentes grupos de funciones proporcionados por TAM2.0. En la (Tabla 13) se observa que algunos miRNAs como miR-125b-5p, miR-145-5p y miR-143-3p están involucrados en prácticamente todos los grupos de funciones. Los datos de la Tabla 13 mostraron que los miRNAs involucrados en más funciones son, en general, los que tienen más genes diana (Tabla 12).

IV. RESULTADOS

Tabla 13 Frecuencia de la presencia de cada miRNA en los diferentes grupos de funciones en los que están significativamente sobrerrepresentados

miRNA	Proliferación / Diferenciación	R. inmune / Inflamación	Ciclo celular	Apoptosis / Resp. a estrés	Migración / invasión	Metabolismo	Total
miR-494-3p	2		1	2		1	6
miR-575							0
miR-223-3p	5	6	3			1	15
miR-630				1			1
miR-642a-3p							0
miR-4286							0
miR-1973	1						1
miR-638							0
miR-9-5p	5	2	2	1	1		11
miR-663a							0
miR-320e	1	1	1				3
miR-30b-5p	2	3	1	2	1		9
miR-150-5p	3	3	1	2			9
miR-26a-5p	2	2	2	2			8
miR-125b-5p	6	6	2	1	1		16
miR-143-3p	8	4	2	2	1		17
miR-145-5p	7	4	3	3	2	1	20
miR-451a	3	2	1				6

IV.2.6.3. Análisis de enriquecimiento de enfermedades

De manera similar al enriquecimiento de funciones, se utilizó la herramienta TAM2.0 para evaluar el tipo de enfermedades en el que está significativamente sobrerrepresentado el conjunto de 18 miRNAs alterados entre el grupo HSIL y VSCC en muestras positivas a VPH16.

El análisis de enriquecimiento de enfermedades resultó en un total de 132 enfermedades con sobrerrepresentación estadísticamente significativa (FDR <0,05) del conjunto de 18 miRNAs analizado (Tabla Suplementaria S.9). Cabe destacar que 9 de las 15 enfermedades con una sobrerrepresentación más significativa y un mayor número de miRNAs implicados corresponden a carcinomas (Tabla 14).

IV. RESULTADOS

Tabla 14 Lista de las 15 enfermedades con sobrerrepresentación más significativa de los 18 miRNAs analizados

Enfermedad	Nº miRNAs	FDR
Carcinoma de colon	14	1,78E-297
Carcinoma de mama	13	1,78E-297
Carcinoma hepatocellular	13	1,78E-297
Carcinoma gástrico	12	1,78E-297
Carcinoma de prostata	10	1,78E-297
Carcinoma de pulmón	15	4,93E-13
Carcinoma de vejiga	10	1,00E-09
Leucemia linfocítica crónica	6	1,57E-09
Carcinoma de cérvix	10	5,66E-09
Cardiomiopatía hipertrófica	6	3,01E-08
Melanoma	9	5,34E-08
Carcinoma escamoso oral	7	7,01E-08
Glioblastoma	10	7,15E-08
Neoplasmas (inespecífico)	11	7,33E-08
Enfermedad de Machado-Joseph	3	8,49E-08

Las enfermedades se agruparon por tipos para identificar aquellos más frecuentes (Figura 38). El grupo más numeroso, con 31 eventos, es el de los carcinomas, el tipo de cáncer de las muestras VSCC analizadas. La suma total de las enfermedades relacionados con cáncer es de 68. Es llamativo el elevado número de enfermedades cardiovasculares y las relacionadas con el sistema nervioso (Figura 38).

IV. RESULTADOS

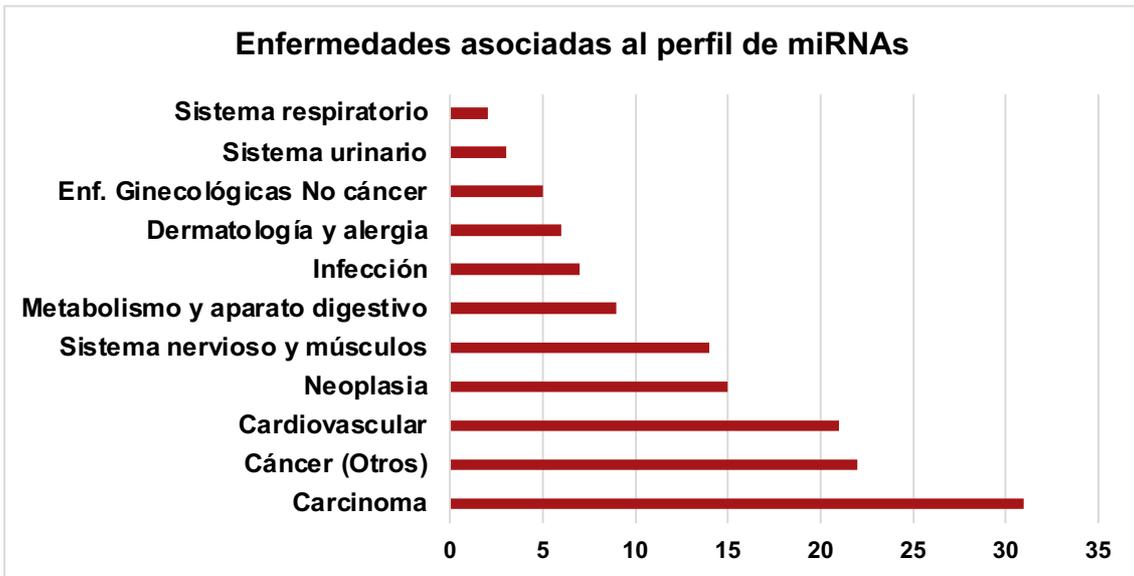


Figura 38 Gráfico de barras representando el número de enfermedades con sobrerepresentación estadísticamente significativa (FDR <0,05) de los 18 miRNAs alterados, por cada grupo establecido.

IV.2.6.4. Análisis de enriquecimiento de factores de transcripción

La herramienta TAM2.0 también tiene registradas interacciones entre miRNAs y factores de transcripción y permite identificar la sobrerepresentación de un conjunto de miRNAs controlando la expresión de un factor de transcripción determinado.

Dado su papel regulador, un buen número de miRNAs tienen como diana factores de transcripción, encargados de controlar las rutas metabólicas y vías de señalización completas, en lugar de genes concretos. El objetivo de este análisis fue identificar factores de transcripción cuya actividad pueda alterarse debido a la desregulación de algún miRNA durante la carcinogénesis. Puesto que la alteración en el nivel de un solo miRNA puede alterar la transcripción de una vía de señalización completa, para este análisis se ha establecido el mínimo de miRNAs involucrados en 1, en lugar de los 2 establecidos en los anteriores análisis de enriquecimiento de funciones y enfermedades.

Así, según los datos disponibles en TAM2.0, el conjunto de miRNAs analizado interactúa de forma significativa (FDR <0,05) con 15 factores de transcripción (Tabla 15).

IV. RESULTADOS

Tabla 15 Factores de transcripción con los que interacciona de forma significativa el conjunto de 18 miRNAs analizado

Factor de transcripción	Nº miRNAs	FDR	miRNAs
<i>NFKB1</i>	2	2,39E-04	miR-9,miR-125b
<i>TP53</i>	3	1,31E-03	miR-125b, miR-145, miR-143
<i>MYC</i>	2	1,49E-03	miR-9, miR-26a
<i>CDX2</i>	1	2,28E-03	miR-125b
<i>IFNBETA</i>	2	2,28E-03	miR-145, miR-143
<i>IFNGAMMA</i>	2	2,28E-03	miR-145, miR-143
<i>JAG1</i>	2	2,28E-03	miR-145, miR-143
<i>KLF2</i>	2	2,28E-03	miR-145, miR-143
<i>SRC</i>	2	2,28E-03	miR-145, miR-143
<i>HIF1A</i>	1	3,44E-03	miR-9
<i>SMAD4</i>	2	5,38E-03	miR-145, miR-143
<i>TP73</i>	2	5,38E-03	miR-145, miR-143
<i>SMAD3</i>	2	9,43E-03	miR-145, miR-143
<i>STAT3</i>	1	1,43E-02	miR-125b
<i>AKT1</i>	1	2,00E-02	miR-125b

Es llamativa la frecuencia con la que aparecen el miR-145-5p y el miR-143-3p actuando de forma conjunta, interaccionando con 9 de los 15 factores de transcripción significativos. Por su parte, también es destacable la presencia de los miRNAs miR-9-5p, miR-125-5p y miR-26a-5p, mientras el resto de los 18 miRNAs analizados no parecen interaccionar de forma significativa con ningún factor de transcripción, según los datos registrados en TAM2.0.

IV.3. Análisis de la composición de la microbiota cervicovaginal en muestras del programa de cribado de VPH

IV.3.1. Diseño y optimización del protocolo para determinar la composición de la microbiota cervicovaginal

IV.3.1.1. Amplificación del gen 16S rRNA completo

Se decidió establecer un protocolo basado en la secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano para determinar el perfil microbiano de las muestras procedentes del cribado de cáncer cervical. Un protocolo potencialmente escalable y automatizable podría llegar a ser utilizado como una herramienta complementaria en el triaje de las pacientes positivas a genotipos de alto riesgo de VPH (AR-VPH).

IV. RESULTADOS

La base del protocolo desarrollado en este proyecto es la secuenciación utilizando la tecnología Nanopore y sus kits específicos para amplificar y secuenciar el gen 16S rRNA completo. Estos kits permiten etiquetar los fragmentos amplificados de cada muestra y de esta forma poder secuenciar hasta 96 muestras en una sola ronda de secuenciación.

De las 3 mezclas de PCR evaluadas, Phusion®, KAPA HiFi y LongAmp®, esta última fue la que mayor eficiencia mostró para amplificar el fragmento deseado, tanto en la comunidad microbiana comercial utilizada para desarrollar el protocolo, como en las muestras clínicas reales. Además, se establecieron 30 ciclos y 5 μ L de DNA como condiciones óptimas para obtener suficiente producto de PCR para la secuenciación en la mayoría de muestras clínicas, tanto de automuestra (AM) como citologías líquidas tomadas por el profesional (CL). (Figura 39)

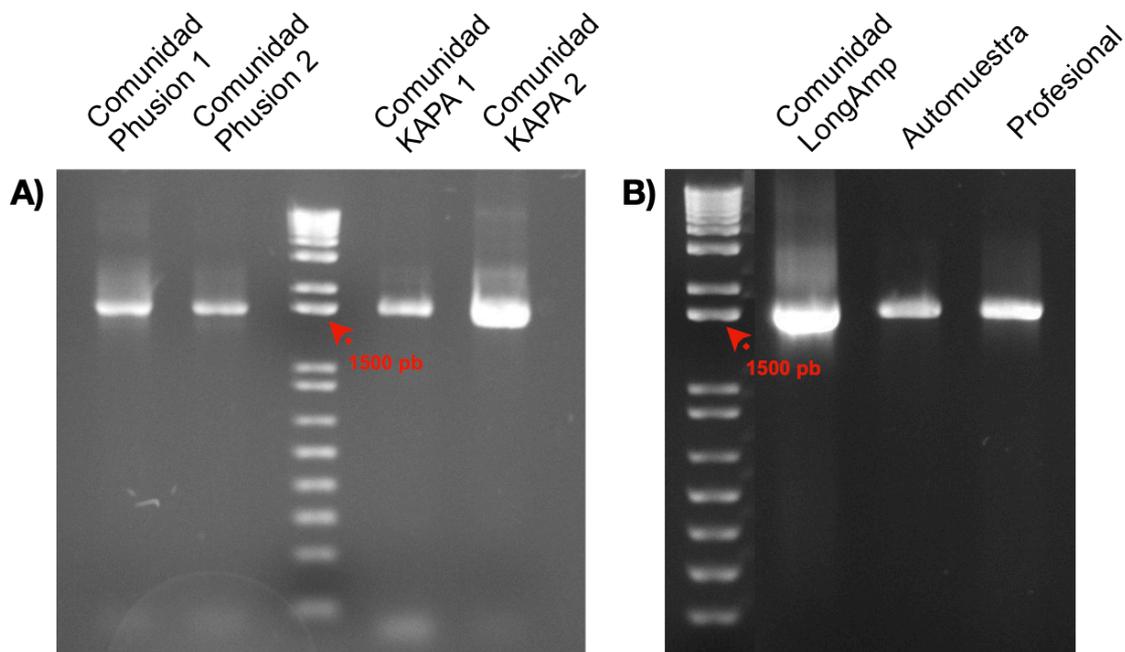


Figura 39 Ejemplos de productos de PCR observados en gel de agarosa con luz UV. Fragmentos obtenidos a partir 10 ng de la comunidad microbiana comercial con las mezclas de PCR A) Phusion, KAPA HiFi y B) LongAmp. En B) también producto de PCR de 5 μ L de dos muestras clínicas con LongAmp. 2 μ L de GeneRuler como marcador de pesos.

IV. RESULTADOS

IV.3.1.2. Secuenciación Nanopore y determinación de la composición microbiana

Se llevó a cabo una ronda de secuenciación de los amplicones de la comunidad microbiana comercial obtenidos con las 3 mezclas maestras evaluadas. Se secuenciaron dos réplicas amplificadas con cada mezcla de PCR.

Tras aplicar los pasos del protocolo bioinformático, se obtuvieron los géneros bacterianos presentes usando Kraken2. En todos los casos se observaron diferencias respecto a la composición teórica de la comunidad, con géneros más eficientemente amplificados en la PCR que otros. Las amplificadas con la mezcla de PCR LongAmp demostraron mayor consistencia entre réplicas y la capacidad de amplificar el gen 16S rRNA de todos los géneros presentes (Figura 40), introduciendo menos diferencias debido a la amplificación.

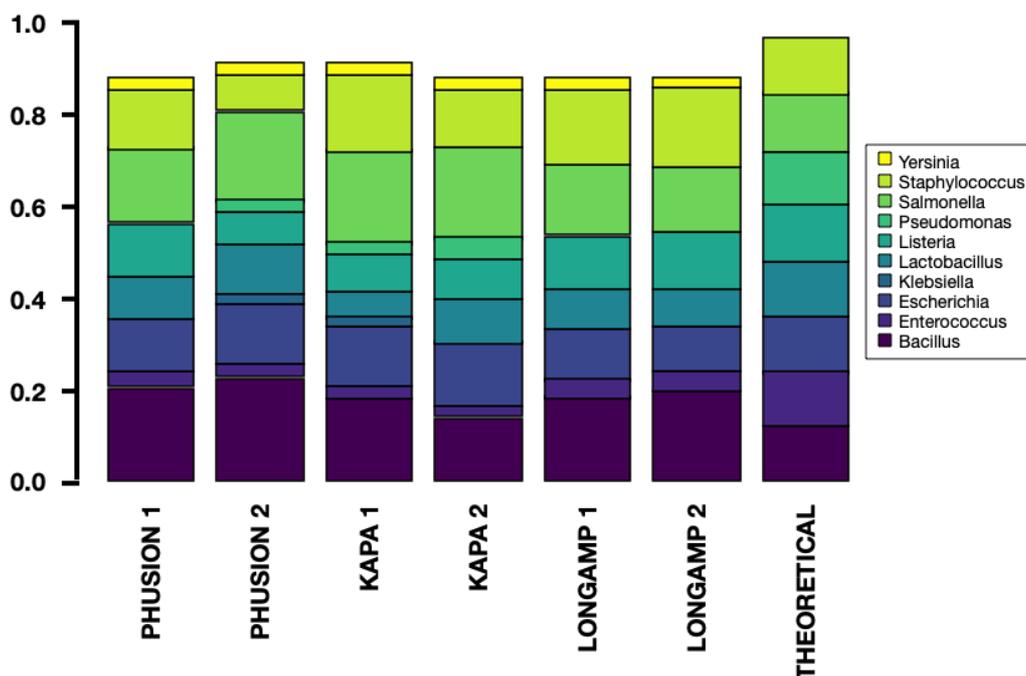


Figura 40 Composición microbiana de la comunidad comercial amplificada con las diferentes mezclas de PCR y composición teórica.

IV.3.2. Validación del protocolo en citologías líquidas y automuestras procedentes del programa de cribado

El protocolo se puso a prueba en un pequeño estudio con un conjunto de muestras procedentes de un piloto del programa de cribado de cáncer cervical. Este estudio se concibió como validación del protocolo y para evaluar si el método de muestreo, citología líquida tomada por un profesional (CL) y la

IV. RESULTADOS

automuestra (AM) son equivalentes en la determinación del perfil de la microbiota cervicovaginal. La amplificación del gen 16S rRNA se realizó con la mezcla de PCR LongAmp y las condiciones previamente establecidas.

IV.3.2.1. Población de estudio y amplificación del gen 16S rRNA

En el análisis se incluyeron inicialmente las muestras apareadas de 21 pacientes, una CL y una AM. De las 21 pacientes, 11 eran positivas a VPH y 10 eran negativas en el momento de la prueba de VPH.

De las 21 parejas de muestras se amplificó el fragmento esperado con éxito en 9 de las 11 (81%) parejas positivas a AR-VPH y en 8 de las 10 (80%) parejas negativas a VPH. En las parejas restantes solo se amplificó con éxito una de las dos, bien la recogida por el profesional o bien la automuestra. En cuanto al tipo de muestreo, amplificaron con éxito 20 de las 21 citologías líquidas (95%) y 18 de las 21 automuestras (85%).

IV.3.2.2. Secuenciación, control de calidad y asignación taxonómica

La secuenciación con Nanopore resultó en un total de $1,06 \cdot 10^6$ lecturas, con una longitud mediana de 1498 pares de bases. Tras aplicar los pasos de filtrado y control de calidad, se eliminaron las 4 muestras que no superaron las 10000 lecturas válidas (Figura 41-A).

En las muestras que cumplieron los criterios requeridos se realizó la asignación taxonómica a nivel de género y se normalizaron las lecturas obtenidas mediante rarefacción. De esta forma se obtuvo la composición de la microbiota de cada muestra de forma comparable con el resto. Tras el filtrado, se detectaron 122 géneros diferentes, con una mediana de 21 por muestra (figura 41-B).

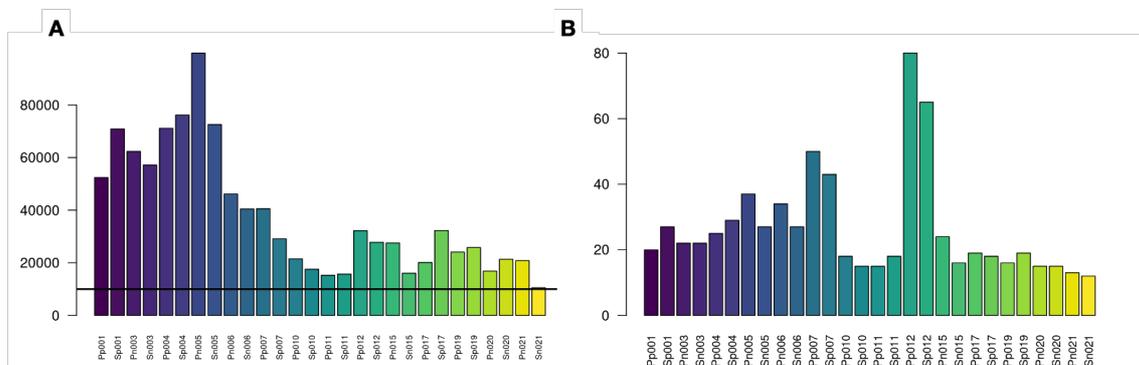


Figura 41 Datos de rendimiento de la secuenciación. A) Lecturas totales obtenidas por cada muestra. B) Total de géneros detectados por muestra tras normalización y filtrado de las

IV. RESULTADOS

lecturas. El identificador de cada muestra (abajo) permite identificar si esta ha sido recogida por el profesional (P) o automuestra (S); si es positiva a VPH (p) o negativa (n). Los números coincidentes implican muestras pareadas.

Tras el análisis descriptivo, se eliminaron las muestras sin pareja de las posteriores comparativas, que se realizaron sobre las 8 parejas positivas a AR-VPH y las 6 parejas negativas a VPH completas.

IV.3.2.3. Diversidad intramuestral (α -diversidad)

La α -diversidad es una medida de la diversidad bacteriana presente en una muestra que se puede calcular con varias fórmulas, en función de si se otorga más peso al número de géneros presentes o a su abundancia relativa.

Aquí se ha utilizado la observación directa del número de géneros presentes en cada muestra para comparar grupos de acuerdo con la positividad de VPH y al método de muestreo. También se ha estimado la α -diversidad mediante el índice de Shannon, que tiene en cuenta la abundancia relativa de cada uno, dada la dominancia del género *Lactobacillus*.

Los análisis de α -diversidad mostraron una mayor diversidad de géneros en las muestras positivas a AR-VPH, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Observados, $P = 0,10$; Shannon, $P = 0,39$) (Figura 42-A).

Se encontró mayor similitud en la diversidad microbiana entre las muestras tomadas por el profesional y las automuestras (Observados, $P = 0,41$; Shannon, $P = 0,73$) (Figuras 42-B).

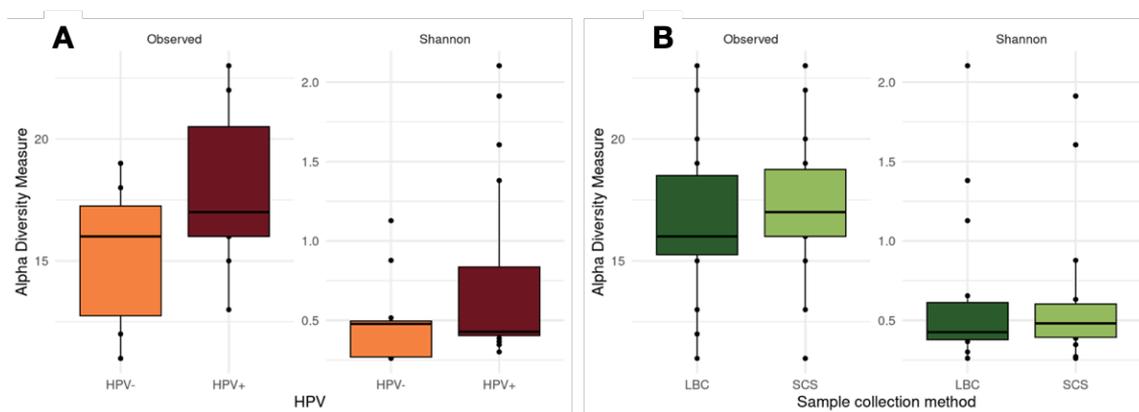


Figura 42 Resultados de α -diversidad mediante observación directa y el método de Shannon. A) Comparativa entre muestras negativas (naranja) y positivas (granate) a VPH. B) Comparativa entre citologías líquidas recogidas por el profesional (LBC, verde oscuro) y automuestras (SCS, verde claro).

IV. RESULTADOS

IV.3.2.4. Diversidad intermuestral (β -diversidad)

La β -diversidad mide las diferencias en la composición microbiana entre diferentes muestras o condiciones. Igual que para medir la diversidad intramuestral, se suele tener en cuenta tanto el número de géneros presentes como su abundancia relativa para evaluarla.

El análisis no supervisado mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) mostró que la mayoría de muestras están agrupadas en el gráfico independientemente de su positividad a VPH, excepto las muestras de 2 pacientes positivas a VPH (Figura 43). También se observa que la mayoría de muestras apareadas se encuentran muy cercanas en el gráfico, indicando mayor similitud en el perfil microbiano entre ellas que con las demás.

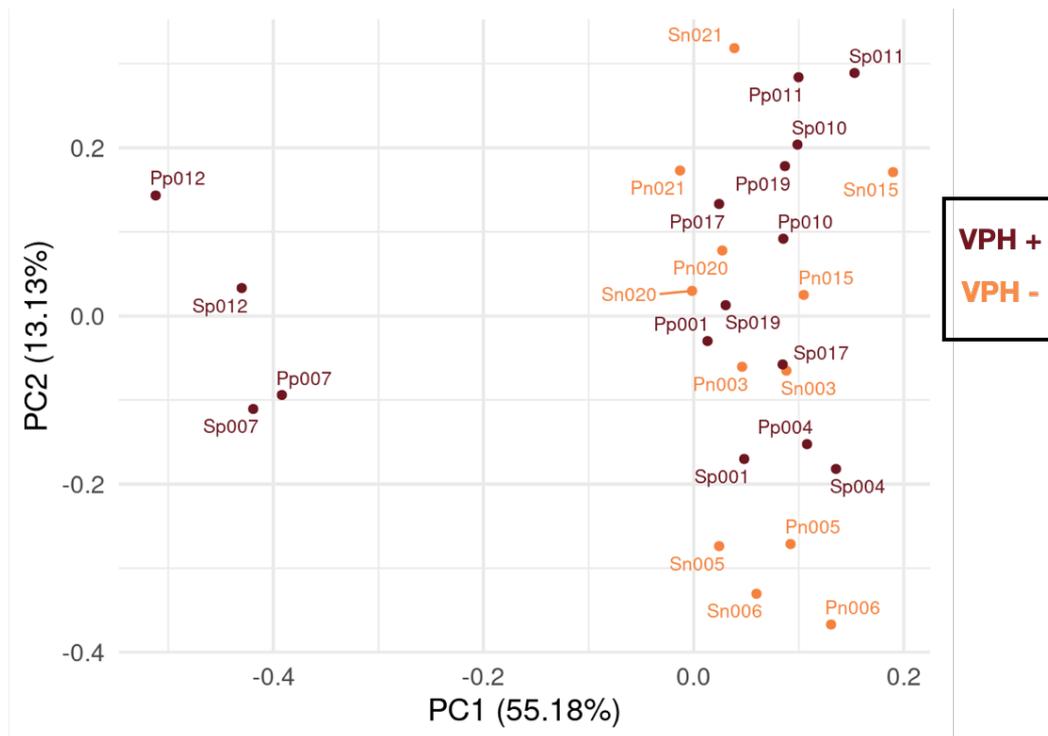


Figura 43 Análisis PCA de las muestras analizadas en función de la abundancia relativa de géneros bacterianos presentes. El identificador de cada muestra permite identificar si esta ha sido recogida por el profesional (P) o automuestra (S); si es positiva a VPH (p, granate) o negativa (n, naranja). Los números coincidentes implican muestras apareadas.

También se midieron las distancias euclidianas entre cada pareja de muestras y con el resto. Tras 1000 iteraciones aleatorias, las distancias euclidianas fueron más cortas entre las parejas en el 90% de los casos ($P < 0,001$) (Figura 44).

IV. RESULTADOS

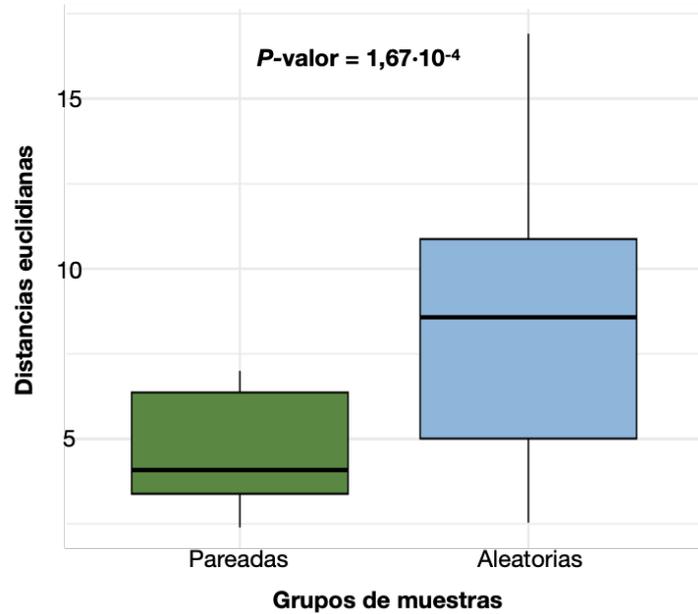


Figura 44 Comparativa de distancias euclidianas entre muestras pareadas (verde) y tras 1000 emparejamientos aleatorios (azul). Prueba estadística: χ^2 . Un P-valor $<0,05$ se consideró como significativo.

IV.3.2.5. Alteraciones de la composición de la microbiota debidos a la infección por VPH

En la mayoría de las muestras analizadas se observa una dominancia del género *Lactobacillus*. Esta es mayor en las muestras negativas a VPH, lo que favorece la mayor diversidad identificada en las muestras positivas a AR-VPH (Figura 45).

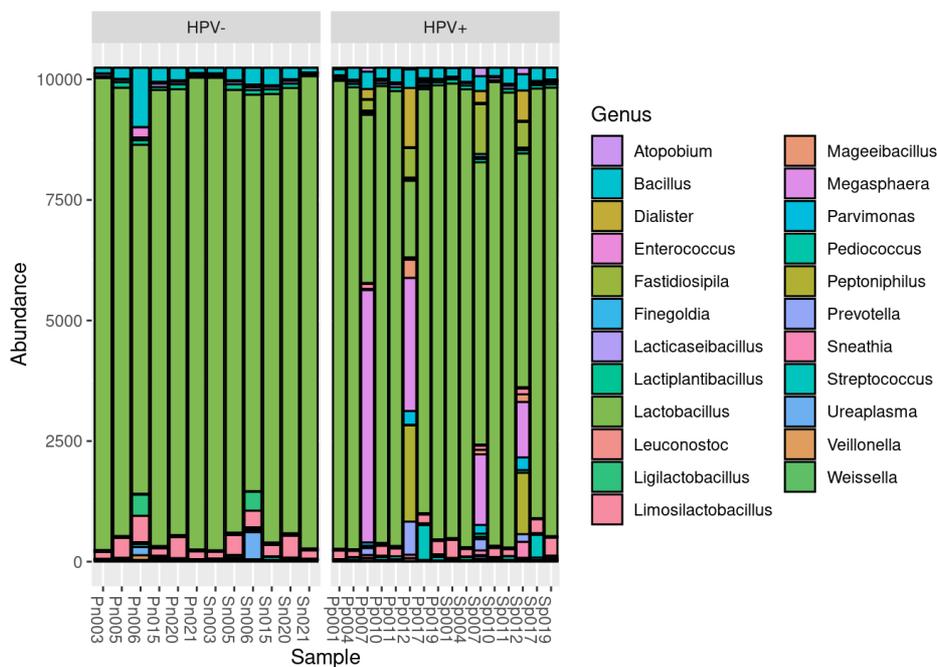


Figura 45 Composición de la microbiota cervicovaginal, a nivel de género, de las muestras analizadas. El identificador de cada muestra (abajo) permite identificar si esta ha sido

IV. RESULTADOS

recogida por el profesional (P) o automuestra (S); si es positiva a VPH (p) o negativa (n), y los números coincidentes implican muestras pareadas.

Se midieron los cambios significativos en la abundancia relativa de los géneros presentes entre muestras positivas y negativas a VPH utilizando una aproximación similar a la usada para medir los cambios en la expresión de RNA. Estos análisis determinaron un incremento significativo de *Atopobium*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus*, *Mageeibacillus*, *Dialister* y *Sneathia* (Figura 46-A). Los ratios de abundancia relativa y su significancia estadística entre ambos grupos se muestran en la Tabla 16. En la comparación entre ambos métodos de muestreo analizados no se observaron cambios significativos en la abundancia relativa de ninguno de los géneros identificados (Figura 46-B).

Tabla 16 Cambios en la abundancia relativa de géneros bacterianos entre muestras cervicovaginales positivas (log2-ratio positivo) y negativas (log2-ratio negativo) a VPH

Género	log2-ratio	P-value	FDR *
<i>Atopobium</i>	3,6947	4,80E-04	1,10E-02
<i>Megasphaera</i>	3,6859	5,51E-03	2,46E-02
<i>Parvimonas</i>	3,0717	1,15E-03	1,32E-02
<i>Peptoniphilus</i>	2,6031	6,42E-03	2,46E-02
<i>Mageeibacillus</i>	2,4865	4,37E-03	2,46E-02
<i>Dialister</i>	2,4822	1,09E-02	3,59E-02
<i>Fastidiosipila</i>	2,2830	2,77E-02	7,95E-02
<i>Sneathia</i>	2,2155	5,87E-03	2,46E-02
<i>Veillonella</i>	1,6782	5,37E-02	1,37E-01
<i>Prevotella</i>	1,5691	6,40E-02	1,47E-01
<i>Finegoldia</i>	1,0557	1,30E-01	2,72E-01
<i>Streptococcus</i>	0,4576	5,35E-01	7,91E-01
<i>Pediococcus</i>	0,3480	5,84E-01	7,91E-01
<i>Ureaplasma</i>	0,3362	7,94E-01	8,70E-01
<i>Bacillus</i>	0,2755	5,59E-01	7,91E-01
<i>Enterococcus</i>	0,1035	8,57E-01	8,96E-01
<i>Lactiplantibacillus</i>	0,0100	9,87E-01	9,87E-01
<i>Weissella</i>	-0,2063	7,35E-01	8,45E-01
<i>Lacticaseibacillus</i>	-0,2389	7,04E-01	8,45E-01
<i>Lactobacillus</i>	-0,2577	7,26E-01	8,45E-01
<i>Leuconostoc</i>	-0,6365	3,88E-01	6,38E-01
<i>Limosilactobacillus</i>	-0,6528	3,81E-01	6,38E-01
<i>Ligilactobacillus</i>	-0,7440	2,82E-01	5,41E-01

*Reseña en verde indica valor de FDR estadísticamente significativo

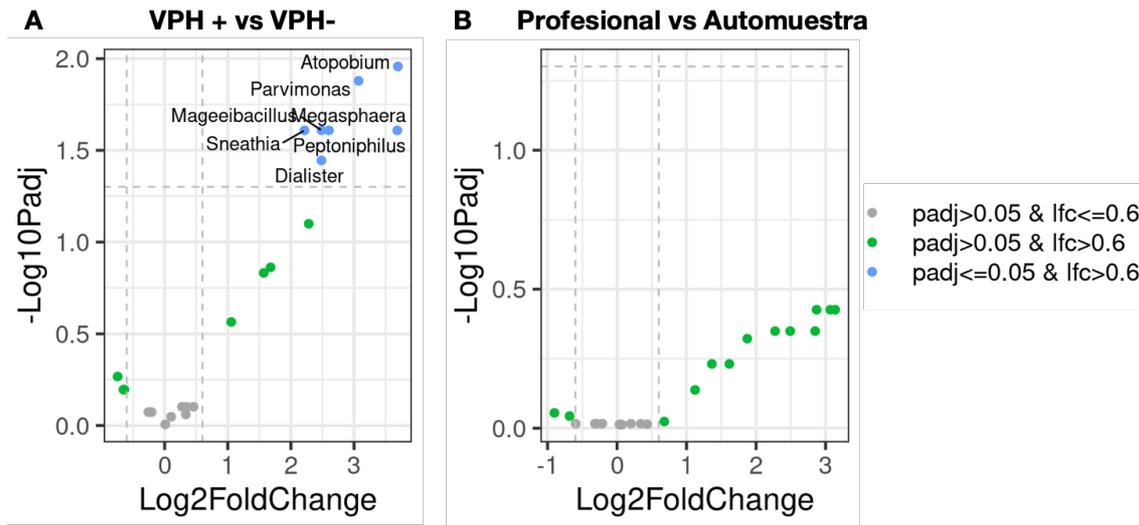


Figura 46 Gráficos de volcán mostrando las diferencias significativas (puntos azules) en la abundancia relativa de géneros bacterianos entre grupos: A) en muestras positivas (derecha) y negativas (izquierda) a VPH. B) en automuestras (derecha) y recogidas por el profesional (izquierda).

IV.3.2.6. Clasificación por tipos de microbiota o CSTs

Actualmente se considera que la tecnología de Nanopore todavía comete un elevado número de errores de secuenciación, y por tanto no se considera suficientemente precisa para determinar la composición del microbioma de una muestra al nivel de especie. No obstante, y teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica, en este estudio se realizó la clasificación taxonómica a nivel de especie de todas las lecturas a las que previamente se les había asignado el género *Lactobacillus*, para posteriormente determinar el tipo de microbiota cervicovaginal o CST correspondiente a cada muestra.

Al determinar nuevamente la composición de las muestras se observaron diferencias en la abundancia relativa de algunas especies de *Lactobacillus* entre muestras positivas y negativas a VPH, aunque ninguna estadísticamente significativa. Las especies *L. gasseri* ($P = 0,06$) y *L. johnsonii* ($P = 0,2$) resultaron más abundantes en las muestras negativas a VPH, mientras que *L. iners* ($P = 0,06$) resultó más abundante en las muestras positivas a VPH (Figura 47). Las diferencias entre las muestras recogidas por el profesional y las automuestras resultaron menores.

IV. RESULTADOS

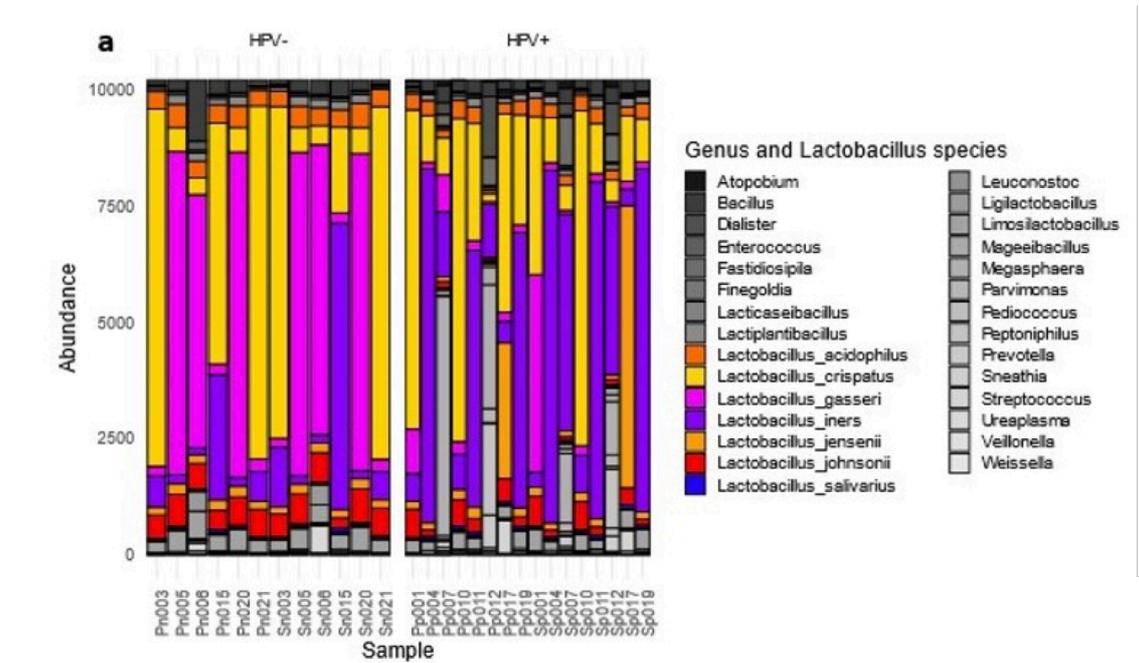


Figura 47 Composición de la microbiota de las muestras analizadas a nivel de especie para el género *Lactobacillus*, y a nivel de género para el resto de OTUs. Las muestras negativas a VPH están en el panel izquierdo, mientras las muestras positivas están en el panel derecho. El identificador de cada muestra (abajo) permite identificar si esta ha sido recogida por el profesional (P) o automuestra (S); si es positiva a VPH (p) o negativa (n), y los números coincidentes implican muestras pareadas.

Los CSTs asignados a cada muestra mediante el algoritmo creado mostraron diferencias significativas en la comparación entre muestras positivas y negativas a VPH ($P=0,01$). La mayoría de muestras negativas se categorizaron como CST-I y CST-II, mientras que en las positivas se identificaron todos los CST, siendo el CST-III el más prevalente (Figura 48-A). El CST-IV, dominado por géneros diferentes al *Lactobacillus* solo fue identificado en algunas muestras positivas a VPH. Cabe destacar que a la pareja 12, la única con lesión confirmada (LSIL, lesión de bajo grado), se le asignó el CST-III.

Por otro lado, la comparación entre los CSTs en función del método de recogida no reveló diferencias significativas entre grupos ($P=0,68$). El mismo CST fue asignado en 11 de las 14 parejas (Figura 48-B). En las 3 restantes, clasificadas como CST-I en la muestra recogida por el profesional, fueron clasificadas como CST-II, CST-III y CST-V en las automuestras pareadas.

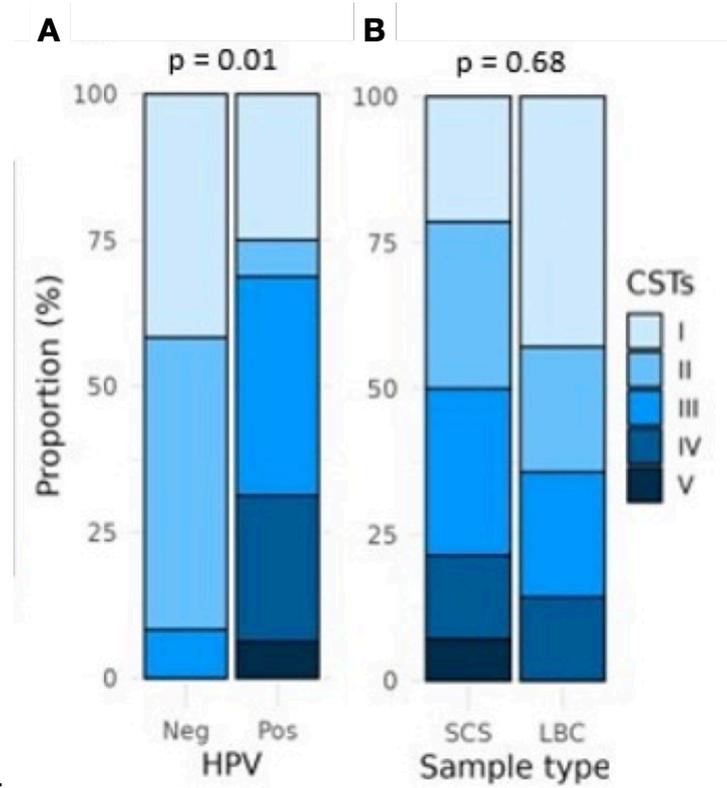


Figura 48 Clasificación por tipo de microbiota cervicovaginal o CSTs de las muestras analizadas. A) Comparativa entre negativas y positivas a VPH. B) Comparativa entre automuestras (SCS) y citologías recogidas por el profesional (LBC).

V. DISCUSIÓN

Es conocido desde hace varias décadas que el VPH es un agente causal de cáncer [206]. Principalmente cánceres ginecológicos y de otras áreas anatómicas involucradas en las relaciones sexuales. Esto se debe a que los tropismos preferidos por los genotipos de VPH de alto riesgo para establecer infecciones son los epitelios del tracto genital, aunque son capaces de infectar otros epitelios como el de la región anal o de la orofaringe [207].

Sin embargo, solo una pequeña fracción de infecciones por VPH acaba progresando a una lesión precursora de alto grado, o HSIL, y, de estas, solo unas pocas desembocan eventualmente en un cáncer invasivo. Es decir, el VPH es un agente necesario en la carcinogénesis, pero no suficiente, necesita la concurrencia de otros factores.

En este proyecto de doctorado el objetivo ha sido identificar factores implicados en la carcinogénesis asociada al VPH mediante el análisis de expresión RNA de un panel de genes y miRNAs en muestras de vulva, así como el desarrollo de un protocolo para la identificación de alteraciones de la microbiota cervicovaginal debidas a la infección por VPH y el desarrollo de lesiones asociadas.

V.1. Alteración de la expresión RNA en la carcinogénesis de vulva asociada al VPH

Las oncoproteínas virales interaccionan con diferentes elementos de la maquinaria de las células infectadas, afectando su regulación y funcionamiento a diferentes niveles. Así, estas alteraciones pueden ser evaluadas, por ejemplo, a nivel de cambios en los niveles de expresión de proteínas, RNA o de modificaciones epigenéticas [15]. En este proyecto se decidió analizar la expresión de un panel de genes y otro de miRNAs, puesto que suponen grupos de moléculas más homogéneos y la metodología disponible más estandarizada para analizar un elevado número de dianas.

Además, el estudio se focalizó en la interfase entre las lesiones precursoras de alto grado y el cáncer invasivo de vulva, un campo poco explorado de acuerdo con la bibliografía disponible, pero importante para diagnosticar aquellas pacientes con lesiones que tienen un mayor riesgo de progresión y poder desarrollar tratamientos más eficaces.

V. DISCUSIÓN

V.1.1. Criterios para la elección de las técnicas utilizadas

La mayoría de estudios que investigan la carcinogénesis de la vulva se realizan sobre piezas quirúrgicas conservadas en bloques de parafina. Este método de conservación limita la cantidad de RNA con integridad suficiente para el análisis. Sin embargo, su reducida incidencia dificulta el acceso a un número suficiente de muestras frescas o congeladas, cuya calidad habitualmente permitiría analizar los perfiles de expresión mediante técnicas como RNA-seq.

En este proyecto se dispuso de una colección amplia de muestras parafinadas de HSIL y VSCC. La calidad del RNA obtenido de las mismas limitó las técnicas a utilizar, por lo que se optó por realizar un cribado de genes y miRNAs diferencialmente expresados en un subconjunto de muestras de la colección utilizando la tecnología nCounter de NanoString. Esta tecnología fue considerada la mejor opción para el análisis debido a que es capaz de cuantificar cientos de dianas al mismo tiempo mediante sondas de pequeño tamaño y sin necesidad de amplificar las dianas mediante PCR. Por tanto, permite un análisis fiable en muestras con poca concentración y un alto grado de degradación del RNA comparado con otras técnicas. Posteriormente, la expresión diferencial de algunos genes se validó en un conjunto mayor de muestras mediante RT-qPCR, una técnica más accesible pero más influenciada por la cantidad y calidad disponible de muestra.

Dentro de la tecnología de NanoString existen diferentes ensayos. En el caso de los miRNAs se decidió analizar el ensayo capaz de analizar un conjunto de 798 miRNAs con el nCounter Human v3 miRNA expression panel, puesto que incluye la mayoría de miRNAs relacionados con la carcinogénesis asociada a VPH descritos en la literatura, y además nos permitiría identificar otros aún no descritos. Para los mRNAs, sin embargo, se decidió analizar un panel personalizado de genes previamente descritos como alterados en la carcinogénesis mediada por VPH. Este panel, además, nos permitiría incluir sondas para cuantificar los niveles de los genes virales *E4*, relacionado con el ciclo viral productivo, y *E6*, necesario para el ciclo productivo pero cuya sobreexpresión no controlada, junto con la de *E7* son las grandes responsables de la transformación maligna del epitelio infectado.

V.1.2. Población de estudio

El conjunto de muestras analizadas en el cribado se eligió, dentro de la disponibilidad de muestras, para ser representativo de las diferentes variantes de VPH16 y poder hacer comparativas con representación suficiente de cada una. Se consideró además que la inclusión de muestras negativas y de los otros dos genotipos más frecuentes en el cáncer de vulva, aportaría valor al estudio, ya que permitiría identificar dianas comúnmente afectadas en todos los casos, y también otras específicamente por cada genotipo o variante de VPH16.

Para reducir posibles fuentes de variabilidad, las muestras utilizadas para el análisis de miRNAs fueron 24 de las 48 utilizadas para el cribado de genes, pretendiendo mantener las mismas proporciones de cada grupo fenotípico para tener la máxima representatividad de cada uno.

Para los ensayos de validación mediante RT-qPCR, se decidió utilizar únicamente muestras positivas a VPH16. En este caso no se han precisado los linajes a los que pertenecen, ya que de algunas muestras no se dispuso de los datos de secuenciación masiva.

V.1.3. Análisis de expresión génica

La evaluación de la expresión del panel de genes seleccionados ha reflejado que las muestras vulvares HSIL y VSCC tienen diferentes perfiles de expresión a nivel de RNA. Este hecho ha sido observado en los diferentes análisis no supervisados mediante PCA y clasificación jerárquica, en los que, si bien no de forma inequívoca, la mayoría de muestras se han agrupado en función del grado de enfermedad. Este hecho indica que algunos genes o rutas metabólicas están desreguladas como causa o como consecuencia en el proceso de carcinogénesis.

Los análisis de expresión diferencial han identificado 17 de los 79 genes cuantificados como significativamente alterados al comparar las 20 muestras HSIL y las 27 muestras VSCC válidas, y 24 genes al comparar únicamente las muestras positivas a VPH16 (Figura 49).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que los genes identificados como diferencialmente expresados y las vías metabólicas y de señalización en las que participan es altamente probable que tengan un papel clave en la

V. DISCUSIÓN

carcinogénesis. Mientras, cabe pensar que el papel del resto de genes analizados y no alterados no resulta clave en la progresión desde HSIL a VSCC, aunque un buen número de ellos sea importante en el establecimiento de infecciones persistentes y lesiones precursoras, siendo necesario el mantenimiento de esa alteración para la progresión a cáncer. Un ejemplo representativo de esto es el gen *E2F1*, una de las principales dianas del gen viral *E7* para tomar el control de la proliferación celular desde los primeros estadios de la infección [72], y cuya expresión apenas varía en el estudio realizado.

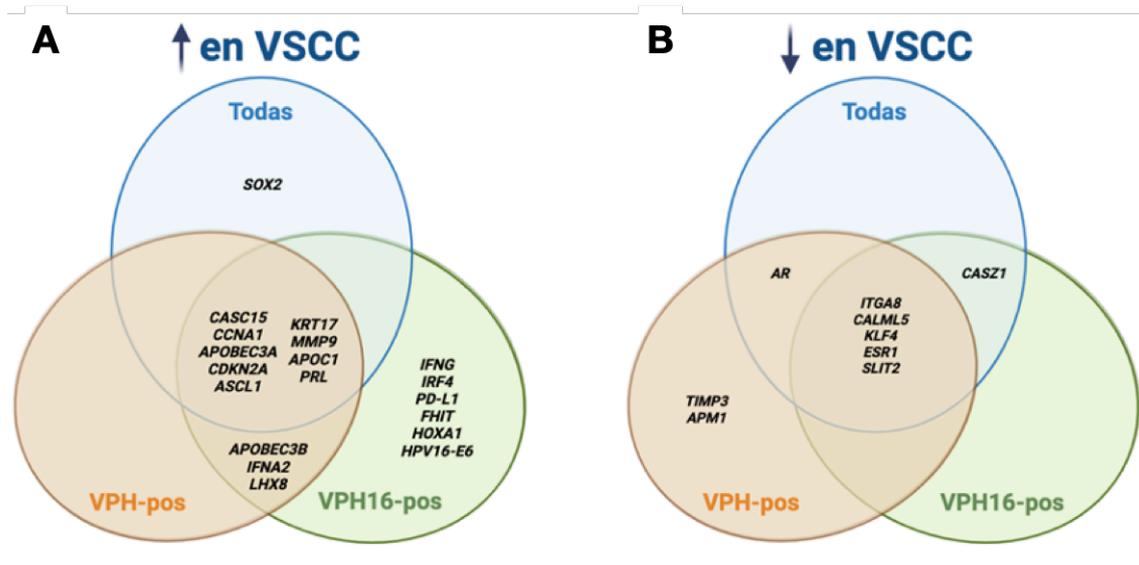


Figura 49 Diagramas de Venn con los genes A) sobreexpresados y B) infraexpresados en muestras VSCC en los diferentes grupos de muestras comparados

Por otro lado, cabe destacar que la carcinogénesis es un proceso complejo en el que concurren diferentes eventos, muchos de ellos comunes a todos los tipos de cáncer, como la inestabilidad genómica, deficiencias en la vigilancia del sistema inmune o la alteración del ciclo celular. En este estudio se han identificado varios de estos eventos comúnmente en los diferentes genotipos de VPH analizados y las muestras negativas a VPH. No obstante, en los análisis no supervisados también se ha observado una tendencia al agrupamiento de las muestras en función del genotipo de VPH, en ocasiones incluso más que por el grado de lesión. Este hecho sugiere que cada genotipo de VPH se sirve de la maquinaria celular de distinta manera, provocando lesiones de alto grado y en última instancia cáncer a través de vías diferentes, o al menos alterándolas con diferente intensidad. Lo mismo se ha observado en las muestras HSIL y VSCC independientes de la infección por VPH.

De hecho, a pesar de la dominancia de muestras positivas a VPH16, se observan diferencias en los genes significativamente desregulados en función de si incluimos las muestras negativas y las muestras positivas a VPH18 y VPH33 en el análisis. Sin embargo, el reducido número de muestras “no-VPH16” ha sido un factor limitante para identificar, estadísticamente, genes diferencialmente expresados entre los diferentes grupos. Un futuro estudio aumentando el número de muestras de estos grupos probablemente ayudaría a revelar mecanismos específicos de cada uno implicados en la carcinogénesis.

V.1.4. Análisis de expresión de miRNAs

La cuantificación de miRNAs con el nCounter Human v3 miRNA expression panel de NanoString reflejó que un buen número de los miRNAs analizados apenas se expresa en las muestras. Se debe tener en cuenta que es un panel prediseñado cuyo objetivo es poder analizar diferentes aspectos de la biología humana, no solo la investigación en cáncer. Además, la mayoría de miRNAs son específicos de un tipo de célula o de tejido, y una pequeña alteración en la expresión de algunos de ellos es capaz de provocar grandes cambios en la regulación de una célula [208].

El análisis no supervisado de la expresión de todos los miRNAs diana mediante PCA mostró una menor capacidad para agrupar las muestras por grado de lesión o positividad a VPH que en el caso de los mRNAs.

En cuanto a los análisis de expresión diferencial, es reseñable que, al incluir las muestras negativas, solo miR-145-5p está significativamente silenciado en las muestras VSCC, mientras que al analizar las muestras positivas a VPH aparecen otros 5 miRNAs significativamente desregulados. Este hecho refleja que los perfiles de expresión de miRNAs también son diferentes en la carcinogénesis de vulva según si es dependiente o no de VPH. Igual que en los ensayos de expresión génica, el reducido número de muestras negativas impidió identificar miRNAs significativamente alterados que ayuden a desvelar las diferentes vías de carcinogénesis. A pesar de ello, es destacable la alteración del miR-4286, implicado en la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis [209]. Este miRNA aparece generalmente sobreexpresado en todas las muestras cancerosas comparado con las lesiones precursoras, pero aun así se expresa 5

V. DISCUSIÓN

veces más en las muestras VSCC negativas que en las positivas a VPH. Un análisis en un mayor número de muestras permitiría confirmar estas diferencias.

Al analizar exclusivamente las muestras positivas a VPH16, se identifica un miRNA con un valor de FDR significativo, el miR-575. También se ha observado que en todas las comparativas hay varios miRNAs cuyo ratio entre HSIL y VSCC está por encima del umbral establecido, aunque su valor de FDR no llega a ser estadísticamente significativo. Este hecho, por lo observado en la comparativa de las muestras positivas a VPH16 es, en parte, achacable al número de muestras analizadas, y sería de gran interés hacer el ensayo de nuevo con un mayor número de muestras, o en todo caso confirmar la expresión de estos marcadores en un grupo de muestras independiente y mayor mediante RT-qPCR, siguiendo la misma aproximación realizada para los mRNAs. Igualmente, en este proyecto se ha considerado mejor opción tener en cuenta todos los miRNAs que han reflejado un valor de \log_2 -ratio mayor a 1 y un *P*-valor menor de 0,05 (Figura 50), menos restrictivo en el análisis estadístico que el FDR, para realizar los análisis de enriquecimiento de funciones, enfermedades y factores de transcripción. Se consideró que la inclusión de estos miRNAs proporcionaría una información más precisa y útil en dichos análisis.

Por otro lado, en este estudio se ha aportado un buen número de nuevos miRNAs alterados en la carcinogénesis aún no descritos en la literatura. Solo se ha encontrado publicado otro estudio similar que analice el perfil de expresión de un elevado conjunto de miRNAs [135]. De los 79 miRNAs que identifica diferencialmente expresados entre muestras VSCC y controles sanos, solo el miR-125b-5p es coincidente con nuestros resultados. Sin embargo, se debe tener en cuenta que este estudio incluye un buen número de muestras negativas a VPH.

De los miRNAs alterados en nuestro estudio, aparte del miR-125b-5p, únicamente se han descrito previamente como alterados en la carcinogénesis de vulva el miR-223-3p [210] y el miR-451a [211], y solo este último específicamente en muestras positivas a VPH. También cabe destacar en este punto que de los 18 miRNAs alterados en muestras positivas a VPH16, todos excepto 3 (miR-575, miR-1973 y miR-4286) han sido previamente descritos

como alterados en la carcinogénesis asociada a VPH, aunque en regiones anatómicas diferentes a la vulva.

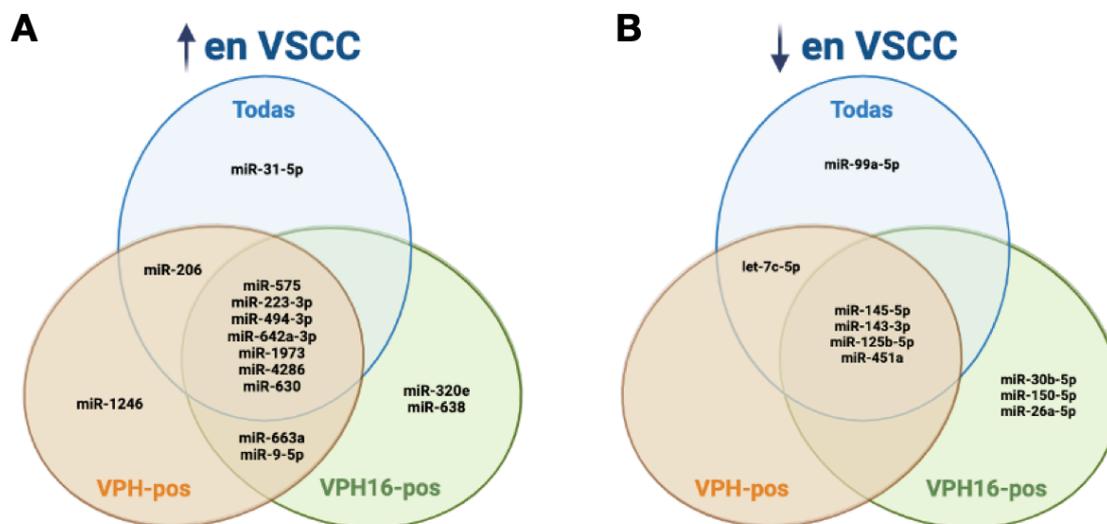


Figura 50 Diagramas de Venn con los miRNAs A) sobreexpresados y B) infraexpresados en muestras VSCC en los diferentes grupos de muestras comparados

V.1.5. Diferencias en los perfiles de expresión de las variantes de VPH16

Según diferentes estudios, los diferentes linajes y sublinajes de VPH16 poseen diferente riesgo de progresar a cáncer, al menos en cervix [30]. Esto se ve acentuado cuando en la infección coinciden determinadas variantes de VPH con pacientes pertenecientes a determinadas etnias [19]. La explicación más plausible a este hecho es la coevolución del virus con sus huéspedes por regiones geográficas. Así, determinados cambios en el genoma viral promueven una optimización del ciclo viral, pero también un mayor riesgo de cáncer cuando la actividad de E6 y E7 no está controlada.

Dado que las oncoproteínas virales son capaces de interactuar directamente con múltiples elementos celulares, cabe pensar que los cambios en las secuencias de cada variante conlleven diferentes alteraciones en la fisiología de la célula. Identificar las vías específicamente alteradas por cada variante y asociarlo a su riesgo de cáncer, podría ayudar a identificar los mecanismos determinantes en la carcinogénesis, así como biomarcadores de riesgo y dianas terapéuticas.

En este proyecto se han comparado los perfiles de expresión entre variantes de VPH16 agrupándolas en A y B-C-D. El motivo principal de agrupar las variantes

V. DISCUSIÓN

B, C y D es poder formar grupos de suficiente tamaño para el análisis estadístico. Además, el linaje A es el más frecuente y ubicuo, además de ser considerado de menor riesgo que los otros 3 linajes [30].

En los análisis de expresión diferencial, tanto de genes como de miRNAs, entre todas las muestras positivas a VPH16, y entre las muestras VSCC exclusivamente, el gen *CASC15* resultó significativamente alterado entre A y B-C-D. *CASC15* es un lncRNA cuya expresión alterada ha sido asociada con la proliferación celular y la tumorigénesis de varios tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma hepatocelular, de lengua, de cérvix, el cáncer de pulmón, gástrico o colorrectal [204]. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de este lncRNA en las muestras positivas a la variante A de VPH16, comparado con las B-C-D, podría ser un indicativo de la activación de algunas vías moleculares que promueven la carcinogénesis de un modo diferente.

Otros genes mostraron cierta variación entre los grupos, incluso superando el umbral de log₂-ratio, pero no de forma estadísticamente significativa. Es reseñable que entre los genes que mostraron cambios en la expresión se observan 3 de la familia APOBEC3. Los resultados indican que, si bien la actividad de APOBEC3 es mayor en VSCC que en HSIL y podría por tanto promover el proceso de progresión hacia un carcinoma invasivo, este mecanismo podría actuar de modo diferente en variantes VPH16-A que en variantes VPH16 B-C-D.

Los análisis no supervisados de clasificación jerárquica también mostraron cierta tendencia a agrupar muestras positivas a la misma variante de VPH16, aunque la tendencia fue mayor al agrupamiento por el grado de lesión.

V.1.6. Análisis de enriquecimiento de dianas, funciones, enfermedades y factores de transcripción en el conjunto de miRNAs alterados

Como se ha descrito previamente en este trabajo, los miRNAs no codifican proteínas, sino que modulan la expresión de otros genes a nivel transcripcional y post-transcripcional. Esta modulación ocurre generalmente mediante la unión del miRNA al extremo 3' no traducido de su mRNA diana por complementariedad de secuencia [212]. Además, cada miRNA puede tener como diana varios

mRNAs, y cada mRNA ser diana de diferentes miRNAs. A su vez, la expresión de los miRNAs está estrechamente regulada en condiciones normales [213].

V.1.6.1. Enriquecimiento de dianas

En este proyecto se han identificado las dianas de los 18 miRNAs alterados validados experimentalmente según la base de datos miRTarBase. Los resultados obtenidos indican que algunos de los miRNAs, como el miR-642a-3p, miR-1973 o miR-320e, no tienen genes diana validados y su función en la regulación de la fisiología celular ha sido hasta la fecha poco estudiada. Mientras, otros como el miR-145-5p o el miR-125b-5p tienen más de 100 genes diana validados, sugiriendo un papel clave para ellos en la regulación global de la homeostasis celular, y cuya desregulación previsiblemente provoque la alteración total de la maquinaria celular, promoviendo la transformación maligna de las células.

Coincide en general que los miRNAs con más genes diana validados, son los que interactúan con un mayor número de los genes identificados como diferencialmente expresados en las muestras analizadas. Destacan en este sentido el miR-143-3p, que entre sus dianas incluye *MMP9*, *SOX2*, *FHIT* y *KLF4*; o el miR-145-5p, regulador de *MMP9*, *SOX2*, *ESR1* y *KLF4*.

Por otro lado, el análisis de enriquecimiento de dianas ha mostrado que genes como *BCL2*, *OCT4*, *AKT1* o *MMP13*, no analizados en nuestro panel de genes, son diana de varios de los miRNAs alterados. Curiosamente estos genes parecen estar involucrados en el cáncer asociado a VPH [214], [215], [216], [217], aunque no se identificaron en la investigación bibliográfica para la elaboración del panel. Estos ejemplos sugieren que el análisis de miRNAs y el uso de herramientas bioinformáticas podrían acelerar la identificación de nuevas rutas metabólicas y de señalización, así como mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis.

V.1.6.2. Enriquecimiento de funciones

Dado que la expresión de la mayoría de miRNAs es específica de tejido o tipo celular, conocer sus genes diana no es suficiente para explicar qué funciones biológicas pueden estar alteradas en la carcinogénesis. Sin embargo, utilizando herramientas como TAM2.0, se pueden identificar funciones en las que el

V. DISCUSIÓN

conjunto de miRNAs que hemos identificado como alterado, está sobrerrepresentado de forma estadísticamente significativa.

El análisis de enriquecimiento de funciones realizado con la lista de miRNAs desregulados en las muestras positivas a VPH16 reveló una implicación significativa en la regulación del ciclo, la proliferación y la diferenciación celular, así como de la respuesta inmune. Este dato coincide con las funciones que desempeñan la mayoría de los genes diferencialmente expresados entre HSIL y VSCC.

V.1.6.3. Enriquecimiento de enfermedades

De manera similar, se analizó en qué enfermedades está sobrerrepresentado estadísticamente el conjunto de miRNAs alterado. Según la base de datos de TAM2.0, aproximadamente la mitad de las enfermedades en las que pueden estar involucrados estos miRNAs están relacionadas con el cáncer. Además, 9 de las 10 con un valor de FDR más significativo se encuentran dentro del grupo de los carcinomas, con entre 10 y 15 de los 18 miRNAs evaluados, implicados. También refleja sobrerrepresentación significativa en 7 enfermedades relacionadas con infecciones, entre la que se encuentra la infección por VPH y los miRNAs miR-125b-5p, miR-143-3p, miR-145-5p y miR-150-5p involucrados.

Por tanto, los resultados de este análisis sugieren que la alteración de los miRNAs observada está más relacionada con la carcinogénesis que con la infección en sí. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados están basados en los datos registrados en la base de datos de la herramienta, en la que es muy posible que existan más entradas sobre cáncer que sobre infecciones. También hay que puntualizar que son miRNAs alterados entre HSIL y VSCC, donde el ciclo viral productivo está reducido o ni siquiera se completa. Más bien es la actividad viral descontrolada la que provoca, como efecto secundario, las alteraciones de una buena proporción de los miRNAs implicados en los carcinomas o cáncer en general.

Por otro lado, entre los carcinomas con sobrerrepresentación más significativa se encuentran los de próstata, pulmonar, mama y colorrectal. En todos estos carcinomas se ha descrito una mayor presencia de VPH en los tejidos tumorales

que en los controles sanos, aunque no se ha podido demostrar su implicación directa en la carcinogénesis [218], [219], [220], [221].

V.1.6.4. Enriquecimiento de factores de transcripción

El último análisis realizado sobre los miRNAs alterados con la herramienta TAM2.0 fue el de sobrerrepresentación de factores de transcripción. En este caso no se trató tanto de un análisis de enriquecimiento sino en la obtención de un resumen de interacciones de los miRNAs con factores de transcripción, puesto que se estableció el mínimo de miRNAs presentes en 1.

Entre los factores de transcripción con un valor estadístico significativo se encuentran varios típicamente alterados por el VPH en su ciclo viral productivo y también en la carcinogénesis, como *TP53*, *MYC* o *SMAD3* [74]. También otros relacionados con la regulación de la respuesta inmune, como *NFKB1*, *IFNBETA* e *IFNGAMMA*.

Entre los miRNAs implicados cabe destacar que los miR-143-3p y miR-145-5p interaccionan con 9 de los 11 factores de transcripción en los que hay sobrerrepresentación significativa. Esto confirma su papel como reguladores globales de la fisiología celular, y explica su implicación en el tan elevado número de procesos biológicos observado en el análisis de enriquecimiento de funciones realizado previamente.

Los otros miRNAs que interaccionan significativamente con factores de transcripción son el miR-9-5p, miR-125b-5p y miR-26a-5p, de los que sobre todo los 2 primeros también aparecieron implicados en numerosas funciones biológicas.

V.1.7. Procesos biológicos alterados entre HSIL y VSCC en la carcinogénesis de vulva asociada al VPH

Los genes y miRNAs cuya expresión está desregulada entre los grupos HSIL y VSCC de las muestras analizadas participan en varios de los hitos característicos (habitualmente conocidos como '*hallmarks*' en inglés) de la oncogénesis asociada al VPH (Figura 51). Las oncoproteínas E6 y E7 de VPH son las principales responsables de provocar los cambios en las células, alterando la expresión de diversos genes y miRNAs, que en último término pueden desembocar en la transformación maligna de las células.

V. DISCUSIÓN

Cabe puntualizar que la mayoría de *hallmarks* están interrelacionados entre ellos, dado que hay vías de señalización comunes involucradas, o reguladas por la actividad de un mismo factor de transcripción. Así, algunos de los miRNAs identificados como desregulados en este proyecto están relacionados con diferentes procesos biológicos, destacando los casos de miR-145-5p, miR-143-3p, miR-125b-5p, miR-9-5p y miR-26a-5p.

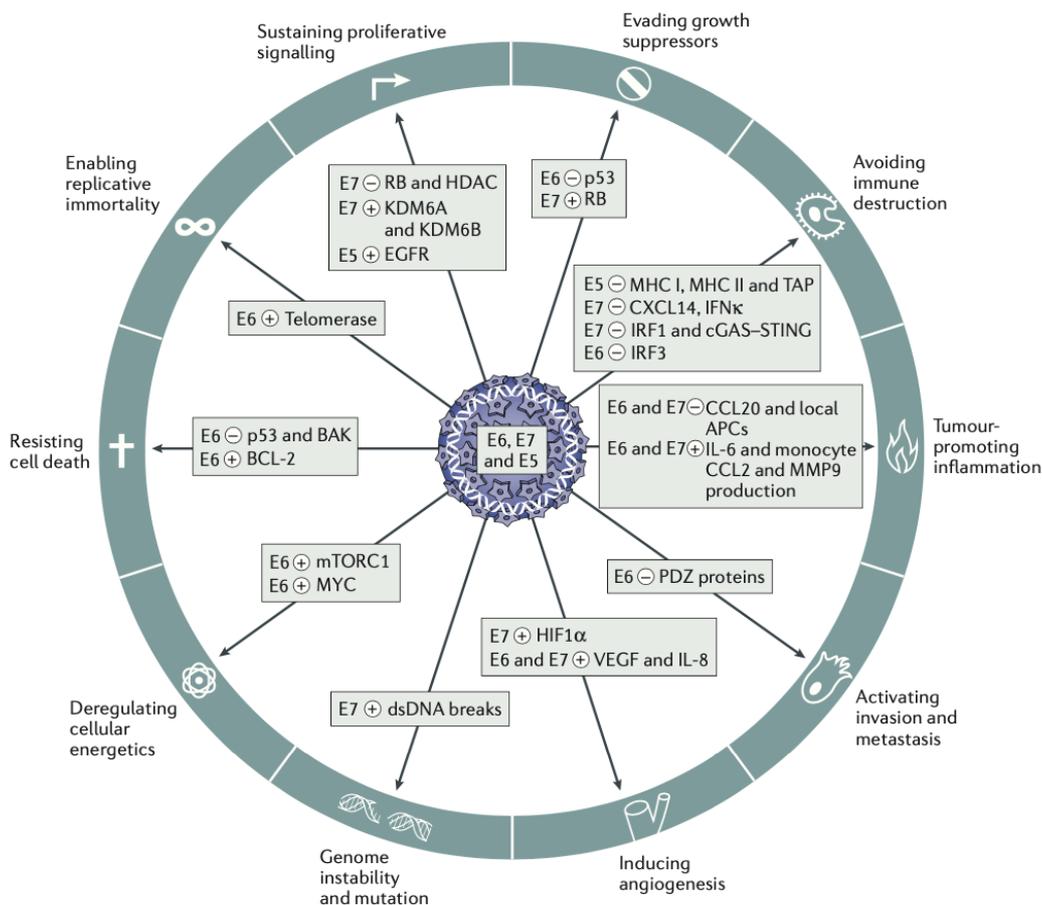


Figura 51 Hitos característicos (conocidos habitualmente como “hallmarks” en inglés) del cáncer asociado a la infección por VPH. Imagen tomada de Roden & Stern 2018 [222]

V.1.7.1. Regulación del ciclo celular, proliferación y diferenciación celular

Una de las funciones clave de las oncoproteínas de VPH, principalmente E7, es la de promover el avance del ciclo celular en las células infectadas para aumentar la proliferación celular, a la vez que retrasar la diferenciación del epitelio [15]. La actividad desregulada de E7 tiene como consecuencia una proliferación aberrante de las células de las capas más basales del epitelio, no diferenciadas.

V. DISCUSIÓN

La mayoría de los genes que han resultado diferencialmente expresados en este estudio están involucrados, directa o indirectamente en alguno de estas tres funciones biológicas. Esto indica la necesidad de que estén alteradas para la progresión a cáncer, y de que dicha alteración se acentúe, ya que la mayoría ya están desregulados en lesiones precursoras.

Así, aparecen sobreexpresados los genes *CCNA1* y *CDKN2A*, reguladores del ciclo celular [60], [223], [224]. Otros genes sobreexpresados y encargados de regular la proliferación y la diferenciación celulares son *KRT17*, *APOC1*, *SOX2* y *ASCL1* [190], [225], [226], [227], [228], [229]. También desempeña las mismas funciones el factor de transcripción *LHX8*, solamente sobreexpresado cuando excluimos las muestras negativas a VPH del análisis. De los genes *LHX8* y *ASCL1* cabe destacar que existen diferentes estudios que han evaluado su nivel de metilación como potenciales biomarcadores pronósticos en cáncer cervical [195], [230]. Dicha hipermetilación ocurre porque se encuentran en *loci* en los que habitualmente se integra el genoma viral, hecho generalmente asociado a un mayor riesgo de cáncer. Aunque no se han identificado estudios analizando su expresión de RNA, los resultados obtenidos parecen indicar que la metilación de sus promotores induce la sobreexpresión de estos dos genes, en lugar del silenciamiento, efecto más habitual, aunque no exclusivo [231].

Por otro lado, han resultado significativamente silenciados los genes *KLF4*, y *CASZ1*, implicados en la diferenciación celular de células pluripotentes [232], [233], así como *CALML5*, regulador de la diferenciación terminal de los queratinocitos [234]. Estos 3 genes son considerados supresores de tumores y su inhibición se ha descrito en el cáncer cervical y otros mediados por VPH [189]. Cabe reseñar que la expresión de *CALML5* parece ser dependiente de *KLF4*, habiéndose descrito que la restitución de *KLF4* reactiva la expresión de *CALML5* al menos en cultivos celulares [189]. En nuestros análisis no supervisados, la clasificación jerárquica siempre sitúa los genes *KLF4*, *CALML5*, *CDKN2A* y *KRT17* en el mismo grupo, sugiriendo una correlación que puede ser debida a un elemento o vía reguladora común. La regulación de la actividad de *KLF4* es muy importante para regular de forma correcta la renovación del epitelio y cómo las células se van diferenciando según avanzan por las diferentes capas. Esto sugiere una relación con el ciclo viral del VPH, además de estar sometido a

V. DISCUSIÓN

diferentes capas de regulación de su expresión. Entre los miRNAs que regulan la expresión de *KLF4* se encuentran los miR-143-3p [235], miR-145-5p [215] y miR-663a [236]. Curiosamente, de estos 3 solo el miR-663a está sobreexpresado, lo que sugiere que es el que ejerce un mayor poder regulador sobre este gen en la carcinogénesis de vulva. En otros carcinomas, *KLF4* está sobreexpresado [232], [237], donde quizá los otros 2 miRNAs controlen su expresión.

Otros 3 miRNAs que parecen estar involucrados en el avance del ciclo celular y la proliferación son el miR-575 [238], el miR-223-3p [210], [239] y el miR-125b-5p [240].

V.1.7.2. La regulación de la respuesta inmune

Si E7 es importante para provocar la proliferación celular y así aumentar el número de copias virales producidas, E6 juega un papel clave en evitar que los efectos que esto conlleva sean detectados por el sistema inmune y evitar la apoptosis de las células infectadas. Esto correlaciona con el alto número de genes y miRNAs cuya expresión ha sido identificada como diferencial en este proyecto.

Dado que la alteración de la respuesta inmune es necesaria en todas las etapas de la progresión, al menos desde el establecimiento de la infección persistente, es llamativo que aparezcan 5 genes (*PD-L1*, *IFNG*, *IFNA2*, *IRF4* y *HOXA1*) reguladores de la respuesta inmune sobreexpresados únicamente en las muestras positivas a VPH16. Este resultado sugiere que el VPH16 interacciona de manera más específica con alguna vía relacionada con la respuesta inmune que otros genotipos durante la carcinogénesis. Las interacciones del miR-9-5p y miR-125b-5p con el factor de transcripción *NFKB1*, y de miR-145-5p y miR-143-3p con los interferones beta y gamma, identificadas en el análisis de enriquecimiento realizado con TAM2.0, podrían explicar, el menos en parte, cómo la actividad de VPH16 interfiere en la regulación de la respuesta inmune.

Por otro lado, en los resultados obtenidos también se observa que el gen *TP53*, la diana de E6 más descrita en la literatura, no muestra diferencias de expresión significativas entre muestras HSIL y VSCC, lo que indica que su silenciamiento es necesario para evitar la detección del sistema inmune desde las primeras

fases de la infección, pero no es un factor que determina la progresión a cáncer. Sin embargo, entre los miRNAs alterados se encuentran algunos relacionados con la inhibición de la apoptosis mediante el silenciamiento de *TP53*, como el miR-125b-5p [241] o el miR-630 [205].

Otros miRNAs implicados en la regulación de la apoptosis son el miR-26a-5p [242], el miR-4286 [209] y el miR-1973 [243].

V.1.7.3. Migración e invasión de tejidos

Como ya se ha comentado previamente, las HSILs pueden ser consideradas tumores locales, mientras los VSCCs son cánceres invasivos. Es lógico pensar que la expresión de diferentes genes involucrados en la migración e invasión de tejidos esté alterada entre ambos grupos.

Sin embargo, cabe destacar que, si la progresión a cáncer es una consecuencia de una actividad viral descontrolada, también lo es la alteración de genes involucrados en mantener la estructura de los tejidos y evitar la invasión. Esto explicaría el silenciamiento observado del gen *TIMP3*, regulado por la vía PI3K/Akt/mTOR, alterada directamente por E6 y E7 desde la infección [82]. El silenciamiento de *TIMP3* regula la expresión de diferentes metaloproteinasas, cuya función es la de romper la matriz extracelular, como *MMP9*, sobreexpresada en nuestras muestras VSCC [244]. Esto facilita la invasión de otros tejidos por parte de las células lesionadas. Entre los miRNAs alterados, el miR-9-5p, miR-143-3p, miR-145-5p y miR-451a tienen como diana validada experimentalmente el mRNA de *MMP9*, lo que también concordaría con la sobreexpresión observada de este gen.

También han resultado significativamente silenciados los genes *SLIT2* y *ITGA8*, que participan en funciones de adhesión celular [245], [246].

Si bien el número de genes desregulados implicados en estas funciones no es tan alto, un buen número de los miRNAs alterados sí que participan en la regulación de estas funciones. Aparte de los ya descritos, también se ha descrito su papel en la migración celular y la invasión de tejidos en miRNAs como miR-494-3p [247], [248], miR-223-3p [210], miR-663a [236], miR-30b-5p [249], miR-150-5p [250] y el miR-26a-5p [242].

V. DISCUSIÓN

V.1.7.4. La familia APOBEC3

Como se describe en la introducción, se han observado perfiles mutacionales en el genoma de las células de cáncer cervical coincidentes con el patrón de la familia APOBEC3. También está demostrada su desregulación por la interacción directa de sus miembros con E6 y E7, cuando estas últimas están sobreexpresadas [86], [91]. La actividad aberrante de APOBEC3, a pesar de ser un mecanismo de defensa antiviral, promueve la acumulación de mutaciones en la célula hospedadora y la inestabilidad genómica que acaban favoreciendo la transformación maligna de la misma.

La desregulación de la familia APOBEC3, hasta nuestro conocimiento, no ha sido aún demostrada en la carcinogénesis de vulva. Nuestros resultados muestran que al menos dos genes de la familia, *APOBEC3A* y *APOBEC3B* están significativamente sobreexpresados en cáncer, comparado con las lesiones precursoras. En el caso de *APOBEC3A* la sobreexpresión se validó mediante RT-qPCR en una colección más amplia de muestras. Los otros miembros de la familia APOBEC3, salvo *APOBEC3G* también mostraron cierta expresión diferencial, a pesar de no ser estadísticamente significativa.

Entre los miRNAs diferencialmente expresados, únicamente el miR-575 parece tener como diana un miembro de la familia APOBEC3, el gen *APOBEC3B*, aunque no tiene una validación experimental robusta.

Nuestros datos, junto con la información descrita en la bibliografía, sugieren que la sobreexpresión persistente de E6 y E7 promueve de forma directa la desregulación de APOBEC3, de forma que se acaban acumulando errores genéticos que, en la mayoría de los casos provocarán la inviabilidad de la célula, pero en otros producirá su transformación maligna e inmortalización.

V.1.7.5. Hormonas y receptores sexuales

Las hormonas sexuales y sus receptores también tienen un papel controlando la homeostasis en el tracto genital femenino, desempeñando funciones en el crecimiento celular y la regulación de la diferenciación del epitelio [251]. La unión de andrógenos y estrógenos a sus receptores activa cascadas de señalización como respuesta a diferentes eventos, como la infección por VPH [252].

En nuestro análisis, los receptores de estrógenos (*ESR1*) y de andrógenos (*AR*) están significativamente inhibidos. Diversos estudios han descrito la inhibición de estos receptores en el cáncer cervical, la cual parece producirse por interacción directa con las proteínas E6 y E7 [252], [253]. El silenciamiento de *ESR1* además promueve la invasión de otros tejidos [254]. El gen *ESR1* además está regulado por el miR-26a-5p y el miR-145-5p según la base de datos miRTarBase. También se ha descrito la relación del miR-143-3p con la actividad de E7 del VPH y del estradiol-17, regulador a su vez de la expresión de *ESR1* [255].

Nuestros resultados también muestran que el gen *PRL*, codificante de la prolactina, está sobreexpresado en el grupo VSCC. *PRL* actúa como oncogen en cánceres ginecológicos, habiéndose descrito la sobreexpresión de una variante transcriptómica que actúa de forma autocrina, promoviendo la proliferación celular [256]. Además, el *locus* del gen *PRL* está junto al de *CASC15*, un lncRNA cuya función fisiológica no está muy clara, pero que aparece sobreexpresado en un buen número de cánceres, incluido el de cérvix [178], [204], [257]. En nuestros análisis no supervisados, la clasificación jerárquica los sitúa siempre en el mismo grupo de genes, pero no uno junto al otro, por lo que no se puede asegurar una correlación entre la expresión de ambos.

Cabe destacar que existe una interconexión entre las hormonas sexuales, la microbiota cervicovaginal y el estado de la respuesta inmune [258]. Las oncoproteínas virales son capaces de interaccionar de forma directa con diferentes actores involucrados en las 3 funciones, que hemos observado desreguladas en el grupo VSCC, así como la alteración de la microbiota en las muestras positivas a VPH del estudio piloto. El desbalanceo de estas funciones podría ser determinante para la carcinogénesis de la vulva, así como otros cánceres ginecológicos mediados por VPH.

V.1.7.6. Expresión diferencial de los genes de VPH

En los ensayos de expresión génica se decidió incluir los genes *E4* y *E6* de los diferentes genotipos de VPH presentes. *E4* se considera un marcador subrogado de infección productiva [12] que se expresa sobre todo en la última fase del ciclo viral. La producción de nuevos viriones se ve retrasada e incluso restringida de

V. DISCUSIÓN

acuerdo con el grado de lesión, llegando a ser nula en los casos de cáncer cervical [259]. Esto se debe a que cada vez menos queratinocitos llegan a diferenciarse, proceso necesario para completar el ciclo productivo del virus. Por este motivo se decidió evaluar si la expresión de *E4* era significativamente mayor en muestras HSIL que en muestras VSCC, ya que podría servir como biomarcador de grado de lesión. En el conjunto de muestras analizado, se observa una mayor expresión en el grupo HSIL, aunque esta no es estadísticamente significativa.

Por su parte *E6* se expresa en todas las fases del ciclo viral, pero su sobreexpresión está asociada a la producción de lesiones precursoras y la progresión a cáncer. El análisis de expresión diferencial entre las muestras positivas a VPH16 dio como resultado una sobreexpresión significativa del gen *E6*. Esto indica que la sobreexpresión del gen *E6* es un indicador de riesgo de progresión a VSCC.

El reducido número de muestras positivas a VPH18 y VPH33 no permitió analizar estadísticamente las diferencias en la expresión de los genes virales. Sin embargo, son reseñables los valores de expresión de *E6* en las muestras cancerosas positivas a VPH33, que fueron de largo los mayores. Esto sugiere que una mayor expresión de los oncogenes virales es necesaria para que las lesiones positivas a este genotipo progresen a cáncer, aunque sería necesario analizarlo en un conjunto mayor de muestras.

V.1.8. Limitaciones de los ensayos de expresión de RNA

Los ensayos de expresión realizados han identificado un buen número de genes y miRNAs cuya expresión alterada en la carcinogénesis de vulva no había sido previamente descrita. La obtención de muestras vulvares de tejido lesionado y canceroso es difícil por la baja incidencia, por lo que este y la mayoría de los estudios leídos se realizan en un número relativamente pequeño de muestras. No obstante, este proyecto es de los estudios que más muestras ha incluido en el análisis, más si añadimos las 110 muestras utilizadas para la validación Mediante RT-qPCR. La baja disponibilidad también conlleva trabajar con muestras conservadas en bloques de parafina, en el que obtener suficiente cantidad de RNA íntegro no siempre es posible. Tecnologías como la desarrollada por NanoString han permitido analizar un buen número de muestras

para realizar un primer cribado de genes y miRNAs alterados, sin embargo, no es viable económicamente analizar una colección entera.

La colección de muestras vulvares disponibles proviene de un estudio internacional [31] en el que se pudo acceder a muestras de archivo de múltiples países. La mayoría de las piezas habían sido obtenidas hace décadas, siendo las más antigua del año 1980. No se dispuso por tanto de la historia clínica de las pacientes, impidiendo conocer cuáles de las HSILs progresaron a un cáncer invasivo o cuáles de las VSCCs se curaron y, en su caso, si hubo recurrencia.

Durante este proyecto sí se tuvo acceso a un pequeño conjunto de muestras vulvares longitudinales, obtenidas antes y después del tratamiento de HSIL o cáncer, con historia clínica conocida. Sin embargo, no se logró obtener suficiente RNA para analizar la expresión de los genes y miRNAs que habían resultado alterados en el cribado. Este análisis nos hubiera proporcionado unos datos de gran interés para poder asociar, con mayor precisión, los resultados de expresión de RNA con un significado clínico. También permitiría contribuir a instaurar biomarcadores diagnósticos y dianas.

V.1.9. ¿Qué factores moleculares determinan el riesgo de progresión a VSCC?

En definitiva, en este proyecto se han identificado diferentes alteraciones en el perfil de expresión de RNA entre lesiones precursoras y cánceres invasivos de vulva asociados a VPH. Un buen número de las observaciones ya habían sido descritas en otros cánceres ginecológicos o en cultivos expresando las oncoproteínas virales, pero no habían sido demostradas aún en la vulva.

También se han identificado miRNAs cuya alteración no había sido descrita en cánceres asociados a la infección por VPH, lo que sugiere que la carcinogénesis de la vulva tiene sus particularidades respecto a otras áreas genitales. A pesar de esto, los resultados obtenidos indican que la mayoría de los procesos biológicos alterados entre HSIL y VSCC son, en general, los habituales en cualquier tipo de carcinoma, aunque en este caso están promovidos por la acción del VPH. En base a nuestras observaciones, los procesos biológicos que presentan más alteraciones de expresión a nivel de RNA son el ciclo celular y la

V. DISCUSIÓN

respuesta inmune, así como la migración celular y la invasión de tejidos, sobre todo por parte de los miRNAs.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren la puerta al estudio mecanístico del papel que algunos genes y miRNAs puedan tener en la carcinogénesis de vulva asociada al VPH. También son alentadores para evaluar los cambios en los perfiles de expresión en un estudio más grande y longitudinal, donde podría observarse si la expresión de los genes y miRNAs aquí identificados tiene alguna correlación con la progresión de las lesiones, el riesgo de cáncer o de recidiva.

Futuros estudios también servirán para evaluar el uso de este panel de genes y miRNAs alterados como biomarcador diagnóstico en pacientes con lesiones vulvares positivas a VPH, y si alguno de ellos podría constituirse en agente o diana terapéutica, sobre todo en el caso de los miRNAs.

V.2. La microbiota cervicovaginal y VPH

Entre los factores que influyen en el establecimiento de infecciones persistentes de VPH y la progresión a diferentes tipos de lesión, la microbiota cervicovaginal es uno de los que más atención está ganando en los últimos años.

La microbiota cervicovaginal, dominada por bacterias del género *Lactobacillus* en condiciones fisiológicas, se ve alterada desde los primeros estadios de las infecciones VPH, descendiendo la abundancia relativa de *Lactobacillus* y aumentando la diversidad [260]. No está claro si las alteraciones de la microbiota cervicovaginal son consecuencia de la infección por VPH o las promotoras de su establecimiento, pero son un potencial biomarcador para diagnosticar el estado de las pacientes positivas a VPH y optimizar la toma de decisiones clínicas [149].

V.2.1. Protocolo para la determinación de la microbiota cervicovaginal

En este proyecto se propuso el desarrollo de un protocolo para el análisis de la microbiota cervicovaginal mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. El objetivo fue desarrollar un protocolo escalable, automatizable y eficiente en costes, con potencial de ser implantado en la práctica clínica como herramienta complementaria en el diagnóstico.

V.2.1.1. Secuenciación con tecnología Nanopore

Se decidió utilizar la tecnología Nanopore, ya que permite secuenciar decenas de muestras en una misma ronda si es necesario, reduciendo así los costes del ensayo por paciente. La preparación de las librerías de secuenciación requiere de menos pasos que otras tecnologías y los procesos de aislamiento del DNA y de amplificación del fragmento de interés es automatizable.

Además, la plataforma de secuenciación es asequible económicamente y no es exigente en cuanto a infraestructura. El software para realizar la secuenciación es suficientemente sencillo para ser manejado por el personal de laboratorio, sin necesidad de personal especialista. También cabe destacar que, como en otras tecnologías, una vez establecido el flujo de análisis bioinformático, se puede determinar la microbiota de una gran cantidad de muestras a la vez y también tiene capacidad de automatización.

V.2.1.2. Establecimiento del protocolo

La parte experimental del protocolo fue establecida teniendo en cuenta los requerimientos de la técnica. A partir de las indicaciones del proveedor, se optimizaron las condiciones para amplificar de forma eficiente los fragmentos del gen 16S rRNA completos presentes en las muestras. El uso de la comunidad microbiana comercial, junto con algunas muestras del piloto de cribado, fue esencial para identificar la mezcla y condiciones de PCR óptimas para nuestro propósito.

Para la parte *in silico*, el flujo computacional se estableció en base a lo descrito en diferentes estudios utilizando la tecnología de Nanopore, debido a que el análisis de lecturas largas difiere ligeramente al de otras técnicas más utilizadas, en las que se suele trabajar con lecturas de 150 pares de bases de longitud.

Los resultados obtenidos con la comunidad comercial mostraron que existen ciertas diferencias en la amplificación del gen 16S rRNA de los diferentes géneros presentes respecto a la composición teórica. Sin embargo, con las condiciones de amplificación establecidas, se amplifican todos los géneros presentes y las diferencias observadas se mantienen sin cambios entre muestras, es decir, se mantiene la reproducibilidad.

V. DISCUSIÓN

V.2.2. Estudio piloto y validación del protocolo en muestras clínicas reales

Una vez establecido, el protocolo fue validado en un pequeño estudio, analizando muestras clínicas reales procedentes de un estudio que evalúa la aceptación del uso de la automuestra en mujeres que normalmente atienden al programa de cribado [154]. El acceso a muestras apareadas, recogidas por el profesional y automuestras, nos permitió encarar dos objetivos. Por un lado, evaluar si los resultados obtenidos concuerdan con lo ya descrito en la bibliografía respecto de las alteraciones observadas en pacientes infectadas por VPH. Por otro lado, analizar si el método de recogida influye en la determinación de la microbiota o si ambos métodos de muestreo son equivalentes.

V.2.2.1. Diferencias en la microbiota cervicovaginal de pacientes positivas y negativas a VPH

Los análisis de α -diversidad identificaron un descenso en la abundancia relativa del género *Lactobacillus* y una consecuente mayor diversidad de géneros en las muestras positivas a VPH. A pesar de que las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, debido probablemente al peso del *Lactobacillus* en el conjunto, las observaciones coinciden con lo previamente descrito [138], [142].

Sin embargo, el análisis de los cambios en la abundancia de cada género específico, si reflejó un incremento significativo de los géneros *Atopobium*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus*, *Mageeibacillus*, *Dialister* y *Sneathia*. Estos resultados también coinciden en gran medida con lo descrito previamente [139], [147], [150], [261], [262].

V.2.2.2. Diferencias en la microbiota cervicovaginal según el método de muestreo

Al medir la diversidad bacteriana dentro de cada muestra, se observó una mayor similitud cuando establecemos los grupos en función del método de muestreo que por la positividad a VPH. Esto fue corroborado en el Análisis de Componentes Principales, donde las muestras apareadas, en general, se situaron más cerca entre ellas que respecto a otras, independientemente de la positividad a VPH. También fue confirmado mediante la comparación de las distancias euclidianas y los CSTs asignados entre las muestras, resultando

estadísticamente significativo que las muestras apareadas son más similares entre ellas que respecto a cualquier otra.

A pesar de ser un análisis reducido, los datos obtenidos reflejan que el automuestreo es un método de recolección de muestras equivalente a la citología líquida tomada por el profesional, abriendo la puerta a un estudio mayor que lo confirme. De ser así, facilitaría su implantación junto al test de detección de VPH dentro del algoritmo para el cribado del cáncer cervical.

V.2.3. Limitaciones del protocolo de determinación de la microbiota

La tecnología de secuenciación de Nanopore, actualmente, no es óptima para analizar la microbiota de las muestras al nivel de especie, dada su tasa de error. A pesar de esto, en este proyecto se desarrolló una aproximación para realizar la clasificación por CSTs mediante la determinación de las especies de *Lactobacillus* presentes en las muestras cervicovaginales. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas al comparar automuestras y citologías recogidas por el profesional, a pesar de que 3 muestras fueron clasificadas de un modo distinto. Por el contrario, y en consonancia con otros estudios encontrados en la literatura [263], se observó una predominancia de CST-I y CST-II en las pacientes negativas a VPH, mientras que los CST-IV y CST-V solo fueron asignados en pacientes positivas a VPH. Además, a la única paciente positiva con lesión (LSIL) le fue asignado el CST-IV, considerado el de mayor riesgo [264].

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Se han identificado 14 genes cuya expresión a nivel de RNA está desregulada entre muestras HSIL y VSCC
2. Los genes *IFNG*, *IRF4*, *PD-L1*, *HOXA1*, *IFNA2* y *FHIT* se encuentran desregulados específicamente en muestras positivas a VPH16. *IFNG*, *IRF4*, *PD-L1*, *HOXA1* e *IFNA2* están relacionados con la regulación de la respuesta inmune, lo que sugiere que la desregulación de esta función biológica es determinante para la progresión desde un HSIL a VSCC positivo a VPH16.
3. La expresión diferencial de los genes *APOBEC3A*, *CALML5* y *KLF4* se ha validado en un conjunto independiente de 110 muestras mediante RT-qPCR.
4. Se han identificado 15 miRNAs cuya expresión está desregulada entre muestras de HSIL y VSCC, independientemente de su positividad a VPH. Además, miR-663a, miR-9-5p y miR-1246 están desregulados exclusivamente en muestras positivas a VPH, mientras miR-320e, miR-638, miR-30b-5p, miR-150-5p y miR-26a-5p están alterados exclusivamente en muestras positivas a VPH16.
5. Las vías y funciones biológicas alteradas entre muestras HSIL y VSCC son:
 - a. Regulación del ciclo, proliferación y diferenciación celular
 - b. Regulación de la respuesta inmune
 - c. Migración e invasión de tejidos
 - d. La familia APOBEC3
 - e. Hormonas y receptores sexuales
6. Se ha identificado el gen *CASC15* como significativamente sobreexpresado en las muestras positivas al linaje A de VPH16, comparado con las muestras positivas a los linajes B-C-D.
7. Se ha desarrollado un protocolo potencialmente escalable y automatizable para determinar la composición de la microbiota

VI. CONCLUSIONES

cervicovaginal tanto en muestras cervicovaginales recogidas por el profesional como en automuestras mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

8. Los resultados de esta prueba de concepto reflejan un descenso en la abundancia relativa de *Lactobacillus* y un aumento de la diversidad bacteriana en las muestras positivas a VPH compatibles con las diferencias descritas anteriormente en otros estudios con un mayor número de muestras.
9. El estudio también refleja que el automuestreo es un método de recolección equivalente a la citología recogida por el profesional para determinar rasgos diferenciales de la microbiota cervicovaginal.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. De Martel, M. Plummer, J. Vignat, y S. Franceschi, «Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type», *Intl Journal of Cancer*, vol. 141, n.º 4, pp. 664-670, ago. 2017, doi: 10.1002/ijc.30716.
- [2] C. de Martel, D. Georges, F. Bray, J. Ferlay, y G. M. Clifford, «Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis», *The Lancet Global Health*, vol. 8, n.º 2, pp. e180-e190, feb. 2020, doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
- [3] A. Hammer, A. Rositch, F. Qeadan, P. E. Gravitt, y J. Blaakaer, «Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis», *International Journal of Cancer*, vol. 138, n.º 12, pp. 2795-2803, jun. 2016, doi: 10.1002/ijc.29959.
- [4] M. Schiffman *et al.*, «Carcinogenic human papillomavirus infection», *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 2, 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.86.
- [5] F. X. Bosch *et al.*, «Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases», *Vaccine*, vol. 31, n.º SUPPL.8, pp. 11-131, noIV. 2013, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.026.
- [6] S. de Sanjosé, M. Brotons, y M. A. Pavón, «The natural history of human papillomavirus infection», *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, vol. 47, pp. 2-13, 2018, doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015.
- [7] J. Doorbar y H. Griffin, «Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins», *Papillomavirus Research*, vol. 7, pp. 176-179, jun. 2019, doi: 10.1016/j.pvr.2019.04.005.
- [8] A. B. Moscicki, M. Schiffman, S. Kjaer, y L. L. Villa, «Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer», *Vaccine*, vol. 24, n.º SUPPL. 3, ago. 2006, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.06.018.
- [9] M. Lechner, J. Liu, L. Masterson, y T. R. Fenton, «HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management», *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 19, n.º 5, pp. 306-327, may 2022, doi: 10.1038/s41571-022-00603-7.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [10] D. J. Goetschius, S. R. Hartmann, S. Subramanian, C. M. Bator, N. D. Christensen, y S. L. Hafenstein, «High resolution cryo EM analysis of HPV16 identifies minor structural protein L2 and describes capsid flexibility», *Scientific Reports*, vol. 11, n.º 1, dic. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83076-5.
- [11] A. A. McBride, «The Papillomavirus E2 proteins», *Virology*, vol. 445, n.º 1-2, pp. 57-79, oct. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.06.006.
- [12] J. Doorbar, «The E4 protein; structure, function and patterns of expression», *Virology*, vol. 445, n.º 1-2, pp. 80-98, oct. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.07.008.
- [13] D. DiMaio y L. M. Petti, «The E5 proteins», *Virology*, vol. 445, n.º 1-2, pp. 99-114, oct. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.05.006.
- [14] S. B. Vande Pol y A. J. Klingelutz, «Papillomavirus E6 oncoproteins», *Virology*, vol. 445, n.º 1-2, pp. 115-137, oct. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026.
- [15] D. Estêvão, N. R. Costa, R. M. Gil da Costa, y R. Medeiros, «Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy», *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1862, n.º 2, pp. 153-162, feb. 2019, doi: 10.1016/j.bbagr.2019.01.001.
- [16] F. Kuehner y F. Stubenrauch, «Functions of Papillomavirus E8^E2 Proteins in Tissue Culture and In Vivo», *Viruses*, vol. 14, n.º 5, may 2022, doi: 10.3390/v14050953.
- [17] C. B. Buck, P. M. Day, y B. L. Trus, «The papillomavirus major capsid protein L1», *Virology*, vol. 445, n.º 1-2, pp. 169-174, oct. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038.
- [18] J. W. Wang y R. B. S. Roden, «L2, the minor capsid protein of papillomavirus», *Virology*, vol. 445, n.º 1-2, pp. 175-186, oct. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.04.017.
- [19] C. W. Nelson y L. Mirabello, «Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity», *Tumour Virus Research*, vol. 15, jun. 2023, doi: 10.1016/j.tvr.2023.200258.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [20] N. Egawa, K. Egawa, H. Griffin, y J. Doorbar, «Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia», *Viruses*, vol. 7, n.º 7, pp. 3863-3890, 2015, doi: 10.3390/v7072802.
- [21] J. Doorbar *et al.*, «The biology and life-cycle of human papillomaviruses», *Vaccine*, vol. 30, n.º SUPPL.5, 2012, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083.
- [22] M. A. Stanley, «Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus», *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, n.º 2, pp. 215-222, abr. 2012, doi: 10.1128/CMR.05028-11.
- [23] N. A. Krump y J. You, «Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans», *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, n.º 11, pp. 684-698, nov. 2018, doi: 10.1038/s41579-018-0064-6.
- [24] M. E. Harden y K. Munger, «Human papillomavirus molecular biology», *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, vol. 772, pp. 3-12, abr. 2017, doi: 10.1016/j.mrreIV.2016.07.002.
- [25] M. A. Oyervides-Muñoz *et al.*, «Multiple HPV Infections and Viral Load Association in Persistent Cervical Lesions in Mexican Women», *Viruses*, vol. 12, n.º 4, 2020, doi: 10.3390/v12040380.
- [26] I. K. Christiansen, G. K. Sandve, M. Schmitz, M. Dürst, y E. Hovig, «Transcriptionally active regions are the preferred targets for chromosomal HPV integration in cervical carcinogenesis», *PLoS ONE*, vol. 10, n.º 3, mar. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0119566.
- [27] E. Park, J.-Y. Kim, S. Choi, D. S. Kim, y Y. L. Oh, «Carcinogenic risk of human papillomavirus (HPV) genotypes and potential effects of HPV vaccines in Korea», *Scientific Reports*, vol. 9, n.º 1, p. 12556, ago. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49060-w.
- [28] N. Egawa y J. Doorbar, «The low-risk papillomaviruses», *Virus Research*, vol. 231, pp. 119-127, mar. 2017, doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.017.
- [29] E. M. De Villiers, C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, y H. Zur Hausen, «Classification of papillomaviruses», *Virology*, vol. 324, n.º 1, pp. 17-27, jun. 2004, doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [30] L. Mirabello *et al.*, «The intersection of HPV epidemiology, genomics and mechanistic studies of HPV-mediated carcinogenesis», *Viruses*, vol. 10, n.º 2, feb. 2018, doi: 10.3390/v10020080.
- [31] S. De Sanjosé *et al.*, «Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva», *European Journal of Cancer*, vol. 49, n.º 16, pp. 3450-3461, noIV. 2013, doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.033.
- [32] R. D. Burk, A. Harari, y Z. Chen, «Human papillomavirus genome variants», *Virology*, vol. 445, n.º 1-2, pp. 232-243, oct. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.07.018.
- [33] R. D. Burk, Z. Chen, y K. Van Doorslaer, «Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity», *Public Health Genomics*, vol. 12, n.º 5-6, pp. 281-290, ago. 2009, doi: 10.1159/000214919.
- [34] G. M. Clifford *et al.*, «Human papillomavirus 16 sub-lineage dispersal and cervical cancer risk worldwide: Whole viral genome sequences from 7116 HPV16-positive women», *Papillomavirus Research*, vol. 7, pp. 67-74, jun. 2019, doi: 10.1016/j.pvr.2019.02.001.
- [35] H. Sung *et al.*, «Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries», *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 71, n.º 3, pp. 209-249, may 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [36] S. de Sanjose *et al.*, «Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58», *JNCI Cancer Spectrum*, vol. 2, n.º 4, oct. 2018, doi: 10.1093/JNCICS/PKY045.
- [37] M. S. Schuurman, L. C. G. Van Den Einden, L. F. A. G. Massuger, L. A. Kiemeney, M. A. Van Der Aa, y J. A. De Hullu, «Trends in incidence and survival of Dutch women with vulvar squamous cell carcinoma», *European Journal of Cancer*, vol. 49, n.º 18, pp. 3872-3880, 2013, doi: 10.1016/j.ejca.2013.08.003.
- [38] N. B. Thuijs, M. van Beurden, A. H. Bruggink, R. D. M. Steenberg, J. Berkhof, y M. C. G. Bleeker, «Vulvar intraepithelial neoplasia: Incidence and long-

VII. BIBLIOGRAFÍA

term risk of vulvar squamous cell carcinoma», *International Journal of Cancer*, vol. 148, n.º 1, pp. 90-98, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.33198>.

[39] I. A. M. Van Der Avoort *et al.*, «Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways», *International Journal of Gynecological Pathology*, vol. 25, n.º 1, pp. 22-29, 2006, doi: 10.1097/01.pgp.0000177646.38266.6a.

[40] F. X. Bosch *et al.*, «Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective», *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 87, n.º 11, pp. 796-802, jun. 1995, doi: 10.1093/jnci/87.11.796.

[41] M. Del Pino, L. Rodriguez-Carunchio, y J. Ordi, «Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma», *Histopathology*, vol. 62, n.º 1, pp. 161-175, 2013, doi: 10.1111/his.12034.

[42] Y. Ueda, T. Enomoto, T. Kimura, K. Yoshino, M. Fujita, y T. Kimura, «Two Distinct Pathways to Development of Squamous Cell Carcinoma of the Vulva», *Journal of Skin Cancer*, vol. 2011, pp. 1-7, 2011, doi: 10.1155/2011/951250.

[43] E. Wilkinson, B. Kneale, y P. Lynch, «Report of the ISSVD terminology committee», *Journal of Reproductive Medicine for the Obstetrician and Gynecologist*, vol. 31, n.º 10, pp. 973-974, 1986.

[44] T. M. Darragh *et al.*, «The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the college of american pathologists and the american society for colposcopy and cervical pathology», *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, vol. 136, n.º 10, pp. 1266-1297, oct. 2012, doi: 10.5858/arpa.LGT200570.

[45] J. Bornstein *et al.*, «The 2015 International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD) Terminology of Vulvar Squamous Intraepithelial Lesions», *Journal of Lower Genital Tract Disease*, vol. 20, n.º 1, 2016, [En línea]. Disponible en: https://journals.lww.com/jlgttd/fulltext/2016/01000/the_2015_international_society_for_the_study_of.3.aspx

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [46] S. Zięba, M. Chechlińska, A. Kowalik, y M. Kowalewska, «Genes, pathways and vulvar carcinoma - New insights from next-generation sequencing studies», *Gynecologic Oncology*, vol. 158, n.º 2, pp. 498-506, ago. 2020, doi: 10.1016/j.ygyno.2020.05.034.
- [47] L. S. Nooij *et al.*, «Genomic characterization of vulvar (pre)cancers identifies distinct molecular subtypes with prognostic significance», *Clinical Cancer Research*, vol. 23, n.º 22, pp. 6781-6789, noIV. 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1302.
- [48] M. E. Gordinier, G. F. Schau, S. B. Pollock, L. B. E. Shields, y S. Talwalkar, «Genomic characterization of vulvar squamous cell carcinoma reveals differential gene expression based on clinical outcome», *Gynecologic Oncology*, vol. 180, pp. 111-117, ene. 2024, doi: 10.1016/j.ygyno.2023.11.026.
- [49] L. C. G. Van Den Einden *et al.*, «Interobserver variability and the effect of education in the histopathological diagnosis of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia», *Modern Pathology*, vol. 26, n.º 6, pp. 874-880, jun. 2013, doi: 10.1038/modpathol.2012.235.
- [50] P. L. Judson, E. B. Habermann, N. N. Baxter, S. B. Durham, y B. A. Virnig, «Trends in the Incidence of Invasive and In Situ Vulvar Carcinoma», *Obstetrics & Gynecology*, vol. 107, n.º 5, 2006, doi: 10.1097/01.AOG.0000210268.57527.a1.
- [51] G. Halec *et al.*, «Biological relevance of human papillomaviruses in vulvar cancer», *Modern Pathology*, vol. 30, n.º 4, pp. 549-562, abr. 2017, doi: 10.1038/modpathol.2016.197.
- [52] L. N. Hoang, K. J. Park, R. A. Soslow, y R. Murali, «Squamous precursor lesions of the vulva: current classification and diagnostic challenges», *Pathology*, vol. 48, n.º 4, pp. 291-302, jun. 2016, doi: 10.1016/j.pathol.2016.02.015.
- [53] M. D. Trietsch, L. S. Nooij, K. N. Gaarenstroom, y M. I. E. Van Poelgeest, «Genetic and epigenetic changes in vulvar squamous cell carcinoma and its precursor lesions: A review of the current literature», *Gynecologic Oncology*, vol. 136, n.º 1, pp. 143-157, 2015, doi: 10.1016/j.ygyno.2014.11.002.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [54] M. Preti *et al.*, «VIN usual type - From the past to the future», *ecancermedicalscience*, vol. 9, abr. 2015, doi: 10.3332/ecancer.2015.531.
- [55] L. A. M. Santegoets *et al.*, «HPV related VIN: Highly proliferative and diminished responsiveness to extracellular signals», *International Journal of Cancer*, vol. 121, n.º 4, pp. 759-766, ago. 2007, doi: 10.1002/ijc.22769.
- [56] S. Dasgupta *et al.*, «Precursor lesions of vulvar squamous cell carcinoma – histology and biomarkers: A systematic review», *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 147, mar. 2020, doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102866.
- [57] D. Xing y O. Fadare, «Molecular events in the pathogenesis of vulvar squamous cell carcinoma», *Seminars in Diagnostic Pathology*, vol. 38, n.º 1, pp. 50-61, ene. 2021, doi: 10.1053/j.semmp.2020.09.010.
- [58] F. Bonvicini *et al.*, «Presence and type of oncogenic human papillomavirus in classic and in differentiated vulvar intraepithelial neoplasia and keratinizing vulvar squamous cell carcinoma», *Journal of Medical Virology*, vol. 77, n.º 1, pp. 102-106, sep. 2005, doi: 10.1002/jmlV.20420.
- [59] L. Baandrup, A. Varbo, C. Munk, C. Johansen, M. Frisch, y S. K. Kjaer, «In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978-2007-a nationwide population-based study», *Gynecologic Oncology*, vol. 122, n.º 1, pp. 45-49, jul. 2011, doi: 10.1016/j.ygyno.2011.03.016.
- [60] K. Prieske *et al.*, «Transcriptome analysis in vulvar squamous cell cancer», *Cancers*, vol. 13, n.º 24, dic. 2021, doi: 10.3390/cancers13246372.
- [61] T. R. Buchanan, W. S. Graybill, y J. Y. Pierce, «Morbidity and mortality of vulvar and vaginal cancers: Impact of 2-, 4-, and 9-valent HPV vaccines», *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, vol. 12, n.º 6, pp. 1352-1356, jun. 2016, doi: 10.1080/21645515.2016.1147634.
- [62] C. L. Rasmussen, F. L. Sand, M. Hoffmann Frederiksen, K. Kaae Andersen, y S. K. Kjær, «Does HPV status influence survival after vulvar cancer?», *International Journal of Cancer*, vol. 142, n.º 6, pp. 1158-1165, mar. 2018, doi: 10.1002/ijc.31139.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [63] Giulia Mantovani *et al.*, «Molecular pathways in vulvar squamous cell carcinoma: implications for target therapeutic strategies», *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 146, n.º 7, pp. 1647-1658, jul. 2020, doi: 10.1007/s00432-020-03226-6.
- [64] N. Rakislova, A. Saco, A. Sierra, M. del Pino, y J. Ordi, «Role of Human Papillomavirus in Vulvar Cancer», *Advances in Anatomic Pathology*, vol. 24, n.º 4, 2017, [En línea]. Disponible en: https://journals.lww.com/anatomicpathology/fulltext/2017/07000/role_of_human_papillomavirus_in_vulvar_cancer.3.aspx
- [65] F. Hinten *et al.*, «Vulvar cancer: Two pathways with different localization and prognosis», *Gynecologic Oncology*, vol. 149, n.º 2, pp. 310-317, may 2018, doi: 10.1016/j.ygyno.2018.03.003.
- [66] M. Santos *et al.*, «Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva», *International Journal of Gynecological Pathology*, vol. 23, n.º 3, pp. 206-214, 2004, doi: 10.1097/01.pgp.0000130108.03231.89.
- [67] K. Wakeham *et al.*, «HPV status and favourable outcome in vulvar squamous cancer», *International Journal of Cancer*, vol. 140, n.º 5, pp. 1134-1146, 2017, doi: 10.1002/ijc.30523.
- [68] S. IV. Graham, «The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review», *Clinical Science*, vol. 131, n.º 17, pp. 2201-2221, 2017, doi: 10.1042/CS20160786.
- [69] J. A. Westrich, C. J. Warren, y D. Pyeon, «Evasion of host immune defenses by human papillomavirus», *Virus Research*, vol. 231, pp. 21-33, mar. 2017, doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.023.
- [70] A. Roman y K. Munger, «The papillomavirus E7 proteins», *Virology*, vol. 445, n.º 1-2, pp. 138-168, oct. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013.
- [71] A. Pal y R. Kundu, «Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy», *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, ene. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2019.03116.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [72] C. A. Moody y L. A. Laimins, «Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation», *Nature Reviews Cancer*, vol. 10, n.º 8, pp. 550-560, ago. 2010, doi: 10.1038/nrc2886.
- [73] A.-M. Helt y D. A. Galloway, «Destabilization of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by Human Papillomavirus Type 16 E7 Is Not Sufficient To Overcome Cell Cycle Arrest in Human Keratinocytes», *Journal of Virology*, vol. 75, n.º 15, pp. 6737-6747, ago. 2001, doi: 10.1128/jvi.75.15.6737-6747.2001.
- [74] W. K. Songock, S. man Kim, y J. M. Bodily, «The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription», *Virus Research*, vol. 231, pp. 56-75, mar. 2017, doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.017.
- [75] R. B. Park y E. J. Androphy, «Genetic Analysis of High-Risk E6 in Episomal Maintenance of Human Papillomavirus Genomes in Primary Human Keratinocytes», *Journal of Virology*, vol. 76, n.º 22, pp. 11359-11364, noIV. 2002, doi: 10.1128/jvi.76.22.11359-11364.2002.
- [76] D. Martinez-Zapien *et al.*, «Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53», *Nature*, vol. 529, n.º 7587, pp. 541-545, ene. 2016, doi: 10.1038/nature16481.
- [77] E. A. White, R. E. Kramer, M. J. A. Tan, S. D. Hayes, J. W. Harper, y P. M. Howley, «Comprehensive Analysis of Host Cellular Interactions with Human Papillomavirus E6 Proteins Identifies New E6 Binding Partners and Reflects Viral Diversity», *Journal of Virology*, vol. 86, n.º 24, pp. 13174-13186, dic. 2012, doi: 10.1128/jvi.02172-12.
- [78] Lechner M S y Laimins L A, «Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins», *Journal of Virology*, vol. 68, n.º 7, pp. 4262-4273, jul. 1994, doi: 10.1128/jvi.68.7.4262-4273.1994.
- [79] Zimmermann Holger, Degenkolbe Roland, Bernard Hans-Ulrich, y O'Connor Mark J., «The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Can Down-Regulate p53 Activity by Targeting the Transcriptional Coactivator CBP/p300», *Journal of Virology*, vol. 73, n.º 8, pp. 6209-6219, ago. 1999, doi: 10.1128/jvi.73.8.6209-6219.1999.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [80] D. Patel, S. M. Huang, L. A. Baglia, y D. J. McCance, «The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300», *EMBO J.*, vol. 18, n.º 18, pp. 5061-5072, sep. 1999.
- [81] C. Rodrigues, L. R. Joy, S. P. Sachithanandan, y S. Krishna, «Notch signalling in cervical cancer», *Experimental Cell Research*, vol. 385, n.º 2, dic. 2019, doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111682.
- [82] L. Zhang, J. Wu, M. T. Ling, L. Zhao, y K. N. Zhao, «The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses», *Molecular Cancer*, vol. 14, n.º 1, abr. 2015, doi: 10.1186/s12943-015-0361-x.
- [83] J. M. Spangle y K. Münger, «The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Activates mTORC1 Signaling and Increases Protein Synthesis», *Journal of Virology*, vol. 84, n.º 18, pp. 9398-9407, sep. 2010, doi: 10.1128/jvi.00974-10.
- [84] K. Ganti *et al.*, «Interaction of the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein with Sorting Nexin 27 Modulates Endocytic Cargo Transport Pathways», *PLoS Pathogens*, vol. 12, n.º 9, sep. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005854.
- [85] R. Ghittoni, R. Accardi, U. Hasan, T. Gheit, B. Sylla, y M. Tommasino, «The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses», *Virus Genes*, vol. 40, n.º 1, pp. 1-13, feb. 2010, doi: 10.1007/s11262-009-0412-8.
- [86] IV. C. Vieira *et al.*, «Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B», *mBio*, vol. 5, n.º 6, pp. 1-8, 2014, doi: 10.1128/mBio.02234-14.
- [87] C. J. Warren *et al.*, «APOBEC3A Functions as a Restriction Factor of Human Papillomavirus», *Journal of Virology*, vol. 89, n.º 1, pp. 688-702, 2015, doi: 10.1128/jvi.02383-14.
- [88] S. Henderson, A. Chakravarthy, X. Su, C. Boshoff, y T. R. Fenton, «APOBEC-Mediated Cytosine Deamination Links PIK3CA Helical Domain Mutations to Human Papillomavirus-Driven Tumor Development», *Cell Reports*, vol. 7, n.º 6, pp. 1833-1841, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.012.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [89] N. J. Smith y T. R. Fenton, «The APOBEC3 genes and their role in cancer: Insights from human papillomavirus», *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 62, n.º 4, pp. R269-R287, may 2019, doi: 10.1530/JME-19-0011.
- [90] S. Revathidevi, A. K. Murugan, H. Nakaoka, I. Inoue, y A. K. Munirajan, «APOBEC: A molecular driver in cervical cancer pathogenesis», *Cancer Letters*, vol. 496, pp. 104-116, ene. 2021, doi: 10.1016/j.canlet.2020.10.004.
- [91] C. J. Warren, M. L. Santiago, y D. Pyeon, «Annual Review of Virology APOBEC3: Friend or Foe in Human Papillomavirus Infection and Oncogenesis?», 2022, doi: 10.1146/annurev-virology-092920.
- [92] N. A. Wallace y K. Münger, «The curious case of APOBEC3 activation by cancer-associated human papillomaviruses», *PLOS Pathogens*, vol. 14, n.º 1, p. e1006717, 2018, doi: 10.1371/journal.ppat.1006717.
- [93] M. H. Elias, S. Das, y N. Abdul Hamid, «Candidate Genes and Pathways in Cervical Cancer: A Systematic Review and Integrated Bioinformatic Analysis», *Cancers*, vol. 15, n.º 3, feb. 2023, doi: 10.3390/cancers15030853.
- [94] S. D. Balasubramaniam, IV. Balakrishnan, C. E. Oon, y G. Kaur, «Gene expression profiling of HPV-associated cervical carcinogenesis in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues using the NanoString nCounter™ platform», *Gene*, vol. 825, may 2022, doi: 10.1016/j.gene.2022.146385.
- [95] Q. Chen, J. Hu, X. Sun, y W. Long, «Transcriptome sequencing reveals pathways and genes dysregulated in HPV infected cervical cancer», *European Journal of Gynaecological Oncology*, vol. 41, n.º 6, pp. 996-1003, dic. 2020, doi: 10.31083/J.EJGO.2020.06.5416.
- [96] K. I. Pappa *et al.*, «Profiling of discrete gynecological cancers reveals novel transcriptional modules and common features shared by other cancer types and embryonic stem cells», *PLoS ONE*, vol. 10, n.º 11, noIV. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0142229.
- [97] K. I. Pappa *et al.*, «Expression profiling of vulvar carcinoma: Clues for deranged extracellular matrix remodeling and effects on multiple signaling pathways combined with discrete patient subsets», *Translational Oncology*, vol. 4, n.º 5, pp. 301-313, 2011, doi: 10.1593/tlo.11148.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [98] E. Kolitz *et al.*, «Human Papillomavirus–Positive and –Negative Vulvar Squamous Cell Carcinoma Are Biologically but Not Clinically Distinct», *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 142, n.º 5, pp. 1280-1290.e7, may 2022, doi: 10.1016/j.jid.2021.10.009.
- [99] International Human Genome Sequencing Consortium, «Finishing the euchromatic sequence of the human genome», *Nature*, vol. 431, n.º 7011, pp. 931-945, oct. 2004, doi: 10.1038/nature03001.
- [100] I. Dunham *et al.*, «An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome», *Nature*, vol. 489, n.º 7414, pp. 57-74, sep. 2012, doi: 10.1038/nature11247.
- [101] R. P. Alexander, G. Fang, J. Rozowsky, M. Snyder, y M. B. Gerstein, «Annotating non-coding regions of the genome», *Nature Reviews Genetics*, vol. 11, n.º 8, pp. 559-571, ago. 2010, doi: 10.1038/nrg2814.
- [102] M. Tisseur, M. Kwapisz, y A. Morillon, «Pervasive transcription - Lessons from yeast», *Biochimie*, vol. 93, n.º 11, pp. 1889-1896, noIV. 2011, doi: 10.1016/j.biochi.2011.07.001.
- [103] A. de Andres-Pablo, A. Morillon, y M. Wery, «LncRNAs, lost in translation or licence to regulate?», *Current Genetics*, vol. 63, n.º 1, pp. 29-33, feb. 2017, doi: 10.1007/s00294-016-0615-1.
- [104] Y. Liu, W. Ding, W. Yu, Y. Zhang, X. Ao, y J. Wang, «Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer», *Molecular Therapy Oncolytics*, vol. 23, pp. 458-476, dic. 2021, doi: 10.1016/j.omto.2021.11.005.
- [105] M. Guttman *et al.*, «Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals», *Nature*, vol. 458, n.º 7235, pp. 223-227, mar. 2009, doi: 10.1038/nature07672.
- [106] T. K. Kim *et al.*, «Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers», *Nature*, vol. 465, n.º 7295, pp. 182-187, may 2010, doi: 10.1038/nature09033.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [107] J. E. Wilusz, H. Sunwoo, y D. L. Spector, «Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world», *Genes and Development*, vol. 23, n.º 13, pp. 1494-1504, jul. 2009, doi: 10.1101/gad.1800909.
- [108] T. R. Mercer, M. E. Dinger, y J. S. Mattick, «Long non-coding RNAs: insights into functions», *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, n.º 3, pp. 155-159, mar. 2009, doi: 10.1038/nrg2521.
- [109] L. Statello, C. J. Guo, L. L. Chen, y M. Huarte, «Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 22, n.º 2, pp. 96-118, feb. 2021, doi: 10.1038/s41580-020-00315-9.
- [110] J. Scholda, T. T. A. Nguyen, y F. Kopp, «Long noncoding RNAs as versatile molecular regulators of cellular stress response and homeostasis», *Human Genetics*, 2023, doi: 10.1007/s00439-023-02604-7.
- [111] P. Connerty, R. B. Lock, y C. E. de Bock, «Long Non-coding RNAs: Major Regulators of Cell Stress in Cancer», *Frontiers in Oncology*, vol. 10, mar. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00285.
- [112] N. T. Ingolia *et al.*, «Ribosome Profiling Reveals Pervasive Translation Outside of Annotated Protein-Coding Genes», *Cell Reports*, vol. 8, n.º 5, pp. 1365-1379, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.045.
- [113] M. Wery, M. Describes, N. Vogt, A. S. Dallongeville, D. Gautheret, y A. Morillon, «Nonsense-Mediated Decay Restricts LncRNA Levels in Yeast Unless Blocked by Double-Stranded RNA Structure», *Molecular Cell*, vol. 61, n.º 3, pp. 379-392, feb. 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.020.
- [114] J. E. Smith *et al.*, «Translation of Small Open Reading Frames within Unannotated RNA Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*», *Cell Reports*, vol. 7, n.º 6, pp. 1858-1866, jun. 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.023.
- [115] S. Andjus, A. Morillon, y M. Wery, «From yeast to mammals, the nonsense-mediated mrna decay as a master regulator of long non-coding rnas functional trajectory», *Non-coding RNA*, vol. 7, n.º 3, sep. 2021, doi: 10.3390/ncrna7030044.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [116] N. S. Muhammad Babar Khawar Rabia Mehmood, Muddasir Hassan Abbasi, «Multifactorial role of long non-coding RNAs (LncRNAs) in hematopoiesis», *FBS*, vol. 10, n.º 1, pp. 119-126, 2018, doi: 10.2741/S503.
- [117] Y. Huang, X. J. Shen, Q. Zou, S. P. Wang, S. M. Tang, y G. Z. Zhang, «Biological functions of miRNAs: A review», *Journal of Physiology and Biochemistry*, vol. 67, n.º 1, pp. 129-139, mar. 2011, doi: 10.1007/s13105-010-0050-6.
- [118] H. I. Suzuki, «Roles of MiRNAs in disease biology», *JMA J.*, vol. 6, n.º 2, pp. 104-113, abr. 2023.
- [119] A. Etheridge, I. Lee, L. Hood, D. Galas, y K. Wang, «Extracellular miRNA: A new source of biomarkers», *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 717, n.º 1, pp. 85-90, dic. 2011, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004.
- [120] M. Ha y IV. N. Kim, «Regulation of miRNA biogenesis», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, n.º 8, pp. 509-524, 2014, doi: 10.1038/nrm3838.
- [121] IV. N. Kim, J. Han, y M. C. Siomi, «Biogenesis of small RNAs in animals», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, n.º 2, pp. 126-139, feb. 2009, doi: 10.1038/nrm2632.
- [122] D. W. Thomson y M. E. Dinger, «Endogenous miRNA sponges: Evidence and controversy», *Nature Reviews Genetics*, vol. 17, n.º 5, pp. 272-283, may 2016, doi: 10.1038/nrg.2016.20.
- [123] L. S. Kristensen, T. Jakobsen, H. Hager, y J. Kjems, «The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology», *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 19, n.º 3, pp. 188-206, mar. 2022, doi: 10.1038/s41571-021-00585-y.
- [124] J. A. Weber *et al.*, «The miRNA spectrum in 12 body fluids», *Clinical Chemistry*, vol. 56, n.º 11, pp. 1733-1741, noIV. 2010, doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
- [125] L. IV. Gayosso-Gómez y B. Ortiz-Quintero, «Circulating miRNAs in blood and other body fluids as biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy response in lung cancer», *Diagnostics*, vol. 11, n.º 3, mar. 2021, doi: 10.3390/diagnostics11030421.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [126] M. A. Cortez, C. Bueso-Ramos, J. Ferdin, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood, y G. A. Calin, «MiRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers», *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 8, n.º 8, pp. 467-477, ago. 2011, doi: 10.1038/nrclinonc.2011.76.
- [127] C. E. Condrat *et al.*, «miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis», *Cells*, vol. 9, n.º 2, ene. 2020, doi: 10.3390/cells9020276.
- [128] J. Wang, J. Chen, y S. Sen, «MiRNA as Biomarkers and Diagnostics», *Journal of Cellular Physiology*, vol. 231, n.º 1, pp. 25-30, ene. 2016, doi: 10.1002/jcp.25056.
- [129] A. Menon, N. Abd-Aziz, K. Khalid, C. L. Poh, y R. Naidu, «miRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n.º 19, oct. 2022, doi: 10.3390/ijms231911502.
- [130] J. M. O. Santos, R. M. Gil da Costa, y R. Medeiros, «Dysregulation of cellular miRNAs by human oncogenic viruses – Implications for tumorigenesis», *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1861, n.º 2, pp. 95-105, feb. 2018, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.01.017.
- [131] M. E. Harden y K. Munger, «Human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoprotein expression alters miRNA expression in extracellular vesicles», *Virology*, vol. 508, n.º April, pp. 63-69, 2017, doi: 10.1016/j.virol.2017.05.005.
- [132] C. B. Lajer *et al.*, «The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: Bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer», *British Journal of Cancer*, vol. 106, n.º 9, pp. 1526-1534, 2012, doi: 10.1038/bjc.2012.109.
- [133] Z. Jamali, N. A. Aminabadi, R. Attaran, F. Pournagiazar, S. G. Oskouei, y F. Ahmadpour, «MiRNAs as prognostic molecular signatures in human head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis», *Oral Oncology*, vol. 51, n.º 4, pp. 321-331, 2015, doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.01.008.
- [134] M. L. Sammarco, M. Tamburro, A. Pulliero, A. Izzotti, y G. Ripabelli, «Human Papillomavirus Infections, Cervical Cancer and MiRNAs: An Overview

VII. BIBLIOGRAFÍA

and Implications for Public Health», *MiRNA*, vol. 9, n.º 3, pp. 174-186, noIV. 2019, doi: 10.2174/2211536608666191026115045.

[135] B. De Melo Maia *et al.*, «miRNA portraits in human vulvar carcinoma», *Cancer Prevention Research*, vol. 6, n.º 11, pp. 1231-1241, noIV. 2013, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0121.

[136] M. Bujko *et al.*, «Circulating hsa-mir-431-5p as potential biomarker for squamous cell vulvar carcinoma and its premalignant lesions», *Diagnostics*, vol. 11, n.º 9, sep. 2021, doi: 10.3390/diagnostics11091706.

[137] B. Pardini, D. De Maria, A. Francavilla, C. Di Gaetano, G. Ronco, y A. Naccarati, «MiRNAs as markers of progression in cervical cancer: A systematic review», *BMC Cancer*, vol. 18, n.º 1, jun. 2018, doi: 10.1186/s12885-018-4590-4.

[138] P. Łaniewski, Z. E. Ilhan, y M. M. Herbst-Kralovetz, «The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy», *Nature Reviews Urology*, 2020, doi: 10.1038/s41585-020-0286-z.

[139] M. Wahid *et al.*, «Microbes in gynecologic cancers: Causes or consequences and therapeutic potential», *Seminars in Cancer Biology*, vol. 86, pp. 1179-1189, noIV. 2022, doi: 10.1016/j.semcancer.2021.07.013.

[140] P. Zhou *et al.*, «Microbiome in cancer: An exploration of carcinogenesis, immune responses and immunotherapy», *Frontiers in Immunology*, vol. 13, ago. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.877939.

[141] A. A. Khan, A. T. Sirsat, H. Singh, y P. Cash, «Microbiota and cancer: current understanding and mechanistic implications», *Clinical and Translational Oncology*, vol. 24, n.º 2, pp. 193-202, feb. 2022, doi: 10.1007/s12094-021-02690-x.

[142] M. Läsche, H. Urban, J. Gallwas, y C. Gründker, «HPV and other microbiota; who's good and who's bad: Effects of the microbial environment on the development of cervical cancer—a non-systematic review», *Cells*, vol. 10, n.º 3, mar. 2021, doi: 10.3390/cells10030714.

[143] B. Gardella, M. F. Pasquali, M. L. Verde, S. Cianci, M. Torella, y M. Dominoni, «The Complex Interplay between Vaginal Microbiota, HPV Infection,

VII. BIBLIOGRAFÍA

and Immunological Microenvironment in Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Literature Review», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n.º 13, jul. 2022, doi: 10.3390/ijms23137174.

[144] B. Santella *et al.*, «Microbiota and HPV: The role of viral infection on vaginal microbiota», *Journal of Medical Virology*, vol. 94, n.º 9, pp. 4478-4484, sep. 2022, doi: 10.1002/jmiv.27837.

[145] D. Lin *et al.*, «Microbiome factors in HPV-driven carcinogenesis and cancers», *PLoS Pathogens*, vol. 16, n.º 6, jun. 2020, doi: 10.1371/journal.ppat.1008524.

[146] J. Ravel *et al.*, «Vaginal microbiome of reproductive-age women», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, n.º SUPPL. 1, pp. 4680-4687, mar. 2011, doi: 10.1073/pnas.1002611107.

[147] A. Audirac-Chalifour *et al.*, «Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: A pilot study», *PLoS ONE*, vol. 11, n.º 4, abr. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153274.

[148] M. A. Molina, K. M. Andralojc, M. A. Huynen, W. P. J. Leenders, y W. J. G. Melchers, «In-depth insights into cervicovaginal microbial communities and hrHPV infections using high-resolution microbiome profiling», *npj Biofilms and Microbiomes*, vol. 8, n.º 1, dic. 2022, doi: 10.1038/s41522-022-00336-6.

[149] M. Usyk *et al.*, «Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study», *PLoS Pathogens*, vol. 16, n.º 3, 2020, doi: 10.1371/journal.ppat.1008376.

[150] S. Wu *et al.*, «The feature of cervical microbiota associated with the progression of cervical cancer among reproductive females», *Gynecologic Oncology*, vol. 163, n.º 2, pp. 348-357, noIV. 2021, doi: 10.1016/j.ygyno.2021.08.016.

[151] G. Curty, P. S. de Carvalho, y M. A. Soares, «The role of the cervicovaginal microbiome on the genesis and as a biomarker of premalignant cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, n.º 1, ene. 2020, doi: 10.3390/ijms21010222.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [152] L. Quan *et al.*, «Simultaneous detection and comprehensive analysis of HPV and microbiome status of a cervical liquid-based cytology sample using Nanopore MinION sequencing», *Scientific Reports*, vol. 9, n.º 1, dic. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55843-y.
- [153] T. Shibata *et al.*, «Evaluation of DNA extraction protocols from liquid-based cytology specimens for studying cervical microbiota», *PLoS ONE*, vol. 16, n.º 8 August, ago. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0237556.
- [154] R. Ibáñez *et al.*, «HPV self-sampling among cervical cancer screening users in Spain: A randomized clinical trial of on-site training to increase the acceptability», *Preventive Medicine*, vol. 173, ago. 2023, doi: 10.1016/j.ypmed.2023.107571.
- [155] C. P. Castanheira, M. L. Sallas, R. A. L. Nunes, N. P. C. Lorenzi, y L. Termini, «Microbiome and Cervical Cancer», *Pathobiology*, vol. 88, n.º 2, pp. 187-197, mar. 2021, doi: 10.1159/000511477.
- [156] X. Castellsagué, F. X. Bosch, y N. Muñoz, «Environmental co-factors in HPV carcinogenesis», *Virus Res.*, vol. 89, n.º 2, pp. 191-199, noIV. 2002.
- [157] L. Pagan *et al.*, «The vulvar microbiome in lichen sclerosus and high-grade intraepithelial lesions», *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1264768.
- [158] C. J. Brown, M. Wong, C. C. Davis, A. Kanti, X. Zhou, y L. J. Forney, «Preliminary characterization of the normal microbiota of the human vulva using cultivation-independent methods», *Journal of Medical Microbiology*, vol. 56, n.º PART 2, pp. 271-276, feb. 2007, doi: 10.1099/jmm.0.46607-0.
- [159] L. Pagan *et al.*, «The human vulvar microbiome: A systematic review», *Microorganisms*, vol. 9, n.º 12, dic. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9122568.
- [160] S. Chattopadhyay *et al.*, «Potential role of the skin and gut microbiota in premenarchal vulvar lichen sclerosus: A pilot case-control study», *PLoS ONE*, vol. 16, n.º 1 January, ene. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0245243.
- [161] Z. Wang *et al.*, «Altered diversity and composition of the gut microbiome in patients with cervical cancer», *AMB Express*, vol. 9, n.º 1, dic. 2019, doi: 10.1186/s13568-019-0763-z.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [162] T. T. Sims *et al.*, «Gut microbial diversity and genus-level differences identified in cervical cancer patients versus healthy controls», *Gynecologic Oncology*, vol. 155, n.º 2, pp. 237-244, noIV. 2019, doi: 10.1016/j.ygyno.2019.09.002.
- [163] G. K. Geiss *et al.*, «Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs», *Nature Biotechnology*, vol. 26, n.º 3, pp. 317-325, mar. 2008, doi: 10.1038/nbt1385.
- [164] A. Bhattacharya *et al.*, «An approach for normalization and quality control for NanoString RNA expression data», *Briefings in Bioinformatics*, vol. 22, n.º 3, may 2021, doi: 10.1093/bib/bbaa163.
- [165] D. Risso, J. Ngai, T. P. Speed, y S. Dudoit, «Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples», *Nature Biotechnology*, vol. 32, n.º 9, pp. 896-902, sep. 2014, doi: 10.1038/nbt.2931.
- [166] M. D. Robinson, D. J. McCarthy, y G. K. Smyth, «edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data», *Bioinformatics*, vol. 26, n.º 1, pp. 139-140, noIV. 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- [167] K. J. Livak y T. D. Schmittgen, «Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method», *Methods*, vol. 25, n.º 4, pp. 402-408, dic. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [168] H. Y. Huang *et al.*, «MiRTarBase update 2022: An informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions», *Nucleic Acids Research*, vol. 50, n.º D1, pp. D222-D230, ene. 2022, doi: 10.1093/nar/gkab1079.
- [169] J. Li *et al.*, «TAM 2.0: Tool for MiRNA set analysis», *Nucleic Acids Research*, vol. 46, n.º W1, pp. W180-W185, jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky509.
- [170] Q. Bonenfant, L. Noe, y H. Touzet, «Porechop ABL: Discovering unknown adapters in Oxford Nanopore Technology sequencing reads for downstream trimming», *Bioinformatics Advances*, vol. 3, n.º 1, 2023, doi: 10.1093/bioadv/vbac085.
- [171] W. De Coster, S. D'Hert, D. T. Schultz, M. Cruts, y C. Van Broeckhoven, «NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data»,

VII. BIBLIOGRAFÍA

Bioinformatics, vol. 34, n.º 15, pp. 2666-2669, ago. 2018, doi: 10.1093/bioinformatics/bty149.

[172] U. Pal, A. Sahu, P. Barah, y A. M. Limaye, «Transcriptomic data of MCF-7 breast cancer cells treated with G1, a G-protein coupled estrogen receptor (GPER) agonist», *Data in Brief*, vol. 41, abr. 2022, doi: 10.1016/j.dib.2022.107948.

[173] D. E. Wood, J. Lu, y B. Langmead, «Improved metagenomic analysis with Kraken 2», *Genome Biology*, vol. 20, n.º 1, noIV. 2019, doi: 10.1186/s13059-019-1891-0.

[174] C. Quast *et al.*, «The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools», *Nucleic Acids Research*, vol. 41, n.º D1, ene. 2013, doi: 10.1093/nar/gks1219.

[175] M. T. France *et al.*, «VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition», *Microbiome*, vol. 8, n.º 1, dic. 2020, doi: 10.1186/s40168-020-00934-6.

[176] P. J. McMurdie y S. Holmes, «Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data», *PLoS ONE*, vol. 8, n.º 4, abr. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0061217.

[177] H. Zhou, K. He, J. Chen, y X. Zhang, «LinDA: linear models for differential abundance analysis of microbiome compositional data», *Genome Biology*, vol. 23, n.º 1, dic. 2022, doi: 10.1186/s13059-022-02655-5.

[178] S. Chen *et al.*, «APOBEC3A possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer», *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, n.º 7, pp. 10548-10557, jul. 2015.

[179] P. P. Argyris *et al.*, «Endogenous APOBEC3B overexpression characterizes HPV-positive and HPV-negative oral epithelial dysplasias and head and neck cancers», *Modern Pathology*, vol. 34, n.º 2, pp. 280-290, feb. 2021, doi: 10.1038/s41379-020-0617-x.

[180] L. Chen *et al.*, «APOBEC-mediated genomic alterations link immunity and viral infection during human papillomavirus-driven cervical carcinogenesis»,

VII. BIBLIOGRAFÍA

BioScience Trends, vol. 11, n.º 4, pp. 383-388, 2017, doi: 10.5582/bst.2017.01103.

[181] IV. L. Cannataro *et al.*, «APOBEC-induced mutations and their cancer effect size in head and neck squamous cell carcinoma», *Oncogene*, vol. 38, n.º 18, pp. 3475-3487, may 2019, doi: 10.1038/s41388-018-0657-6.

[182] H. J. Yang, «Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis», *Chinese Journal of Cancer*, vol. 32, n.º 1, pp. 42-48, 2013, doi: 10.5732/cjc.012.10033.

[183] A. Buitrago-Pérez, G. Garaulet, A. Vázquez-Carballo, J. M. Paramio, y R. García-Escudero, «Molecular signature of HPV-induced carcinogenesis: pRb, p53 and gene expression profiling», *Curr. Genomics*, vol. 10, n.º 1, pp. 26-34, mar. 2009.

[184] H. Chen *et al.*, «Bioinformatics analysis of key genes and pathways of cervical cancer», *OncoTargets and Therapy*, vol. 13, pp. 13275-13283, 2020, doi: 10.2147/OTT.S281533.

[185] R. D. Burk *et al.*, «Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer», *Nature*, vol. 543, n.º 7645, pp. 378-384, mar. 2017, doi: 10.1038/nature21386.

[186] S. Reuter *et al.*, «APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity», *The EMBO Journal*, vol. 17, n.º 1, pp. 215-222, ene. 1998, doi: 10.1093/emboj/17.1.215.

[187] K. Gasimli, M. Raab, S. Becker, M. Sanhaji, y K. Strebhardt, «The Role of DAPK1 in the Cell Cycle Regulation of Cervical Cancer Cells and in Response to Topotecan», *J Cancer*, vol. 13, pp. 728-743, 2022, doi: 10.7150/jca.66492.

[188] Y. Gao, T. Zou, W. Liang, Z. Zhang, y M. Qie, «Long non-coding RNA HAND2-AS1 delays cervical cancer progression via its regulation on the miRNA-21-5p/TIMP3/VEGFA axis», *Cancer Gene Therapy*, 2020, doi: 10.1038/s41417-020-00243-y.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [189] S. Kitazawa, Y. Takaoka, Y. Ueda, y R. Kitazawa, «Identification of calmodulin-like protein 5 as tumor-suppressor gene silenced during early stage of carcinogenesis in squamous cell carcinoma of uterine cervix», *International Journal of Cancer*, vol. 149, n.º 6, pp. 1358-1368, sep. 2021, doi: 10.1002/ijc.33687.
- [190] A. Gut, H. Moch, y M. Choschzick, «SOX2 Gene Amplification and Overexpression is Linked to HPV-positive Vulvar Carcinomas», *International Journal of Gynecological Pathology*, vol. 37, n.º 1, pp. 68-73, 2018, doi: 10.1097/PGP.0000000000000388.
- [191] D. Li *et al.*, «Analysis of the Role and Regulatory Mechanism of hsa-miR-504 in Cervical Cancer Based on The Cancer Genome Atlas Database», *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, jun. 2020, doi: 10.1089/cbr.2020.3798.
- [192] L. Xiao, S. Zhang, Q. Zheng, y S. Zhang, «Dysregulation of KIF14 regulates the cell cycle and predicts poor prognosis in cervical cancer: a study based on integrated approaches», *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 54, n.º 11, p. e11363, 2021, doi: 10.1590/1414-431X2021e11363.
- [193] F. Ge, W. Tie, J. Zhang, Y. Zhu, y Y. Fan, «Expression of the HOXA gene family and its relationship to prognosis and immune infiltrates in cervical cancer», *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 35, n.º 11, noIV. 2021, doi: 10.1002/jcla.24015.
- [194] B. Li, R. Guo, T. Lai, L. Qiao, y H. Fu, «The application of PAX1 methylation detection and HPV E6/E7 mRNA detection in cervical cancer screening», *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, vol. 47, n.º 8, pp. 2720-2728, 2021, doi: <https://doi.org/10.1111/jog.14869>.
- [195] L. Verhoef *et al.*, «Evaluation of DNA methylation biomarkers ASCL1 and LHX8 on HPV-positive self-collected samples from primary HPV-based screening», *British Journal of Cancer*, vol. 129, n.º 1, pp. 104-111, jul. 2023, doi: 10.1038/s41416-023-02277-z.
- [196] E. Kang, B. Tessier-Cloutier, M. A. Duggan, C. J. R. Stewart, C. Lee, y M. Köbel, «Loss of ARID1B and SMARCB1 expression are specific for the diagnosis of dedifferentiated/undifferentiated carcinoma in tumours of the upper

VII. BIBLIOGRAFÍA

gynaecologic tract and cervix», *Histopathology*, ene. 2021, doi: 10.1111/his.14333.

[197] H.-Y. Han, J.-T. Mou, W.-P. Jiang, X.-M. Zhai, y K. Deng, «Five candidate biomarkers associated with the diagnosis and prognosis of cervical cancer», *Bioscience Reports*, vol. 41, n.º 3, p. BSR20204394, mar. 2021, doi: 10.1042/BSR20204394.

[198] C. Zhang *et al.*, «The value and clinical significance of ZNF582 gene methylation in the diagnosis of cervical cancer», *OncoTargets and Therapy*, vol. 14, pp. 403-411, 2021, doi: 10.2147/OTT.S277445.

[199] Y. Hao, M. Ye, X. Chen, H. Zhao, A. Hasim, y X. Guo, «Discovery and validation of FBLN1 and ANT3 as potential biomarkers for early detection of cervical cancer», *Cancer Cell International*, vol. 21, n.º 1, dic. 2021, doi: 10.1186/s12935-021-01802-5.

[200] X. Huo *et al.*, «Identification of a Six-Gene Signature for Predicting the Overall Survival of Cervical Cancer Patients», *OncoTargets and Therapy*, vol. Volume 14, pp. 809-822, feb. 2021, doi: 10.2147/ott.s276553.

[201] Y. Zhang, S. Qiu, Y. Guo, J. Zhang, X. Wu, y G. Hong, «Diagnostic Value of Vaginal Microecology, Serum miR-18a, and PD-L1 for Identifying HPV-Positive Cervical Cancer», *Technology in Cancer Research & Treatment*, vol. 20, p. 153303382199528, ene. 2021, doi: 10.1177/1533033821995281.

[202] Z.-M. Deng, F.-F. Dai, Q. Zhou, y Y.-X. Cheng, «Hsa_circ_0000301 facilitates the progression of cervical cancer by targeting miR-1228-3p/IRF4 Axis», *BMC Cancer*, vol. 21, n.º 1, p. 583, may 2021, doi: 10.1186/s12885-021-08331-4.

[203] Y. Wu *et al.*, «Changes of miRNA Expression Profiles from Cervical-Vaginal Fluid-Derived Exosomes in Response to HPV16 Infection», *BioMed Research International*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/7046894.

[204] X. Gu, Q. Chu, Q. Zheng, J. Wang, y H. Zhu, «The dual functions of the long noncoding RNA CASC15 in malignancy», *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 135, mar. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2020.111212.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [205] S. Kadkhoda y S. Ghafouri-Fard, «The importance of miRNA-630 in human diseases with an especial focus on cancers», *Cancer Cell International*, vol. 22, n.º 1, dic. 2022, doi: 10.1186/s12935-022-02531-z.
- [206] F. X. Bosch, A. Lorincz, N. Munoz, C. J. L. M. Meijer, y K. IV. Shah, «The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer», *Journal of Clinical Pathology*, vol. 55, n.º 4, pp. 244-265, abr. 2002, doi: 10.1136/jcp.55.4.244.
- [207] A. R. Giuliano *et al.*, «E UROGIN 2014 roadmap: Differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection», *Intl Journal of Cancer*, vol. 136, n.º 12, pp. 2752-2760, jun. 2015, doi: 10.1002/ijc.29082.
- [208] G. W. Dorn, «MiRNAs and the butterfly effect», *Cell Cycle*, vol. 12, n.º 5, pp. 707-708, mar. 2013, doi: 10.4161/cc.23858.
- [209] Z. Li, S. Zhao, H. Wang, B. Zhang, y P. Zhang, «miR-4286 promotes prostate cancer progression by targeting the expression of SALL1», *Journal of Gene Medicine*, vol. 25, n.º 7, jul. 2023, doi: 10.1002/jgm.3127.
- [210] B. de Melo Maia *et al.*, «MiR-223-5p works as an oncomiR in vulvar carcinoma by TP63 suppression», *Oncotarget; Vol 7, No 31*, 2016, Accedido: 1 de enero de 2016. [En línea]. Disponible en: <https://www.oncotarget.com/article/10247/text/>
- [211] J. Nunvar *et al.*, «Lack of conserved miRNA deregulation in hpv-induced squamous cell carcinomas», *Biomolecules*, vol. 11, n.º 5, may 2021, doi: 10.3390/biom11050764.
- [212] J. J. Ipsaro y L. Joshua-Tor, «From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery», *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 22, n.º 1, pp. 20-28, ene. 2015, doi: 10.1038/nsmb.2931.
- [213] L. F. Gulyaeva y N. E. Kushlinskiy, «Regulatory mechanisms of miRNA expression», *Journal of Translational Medicine*, vol. 14, n.º 1, may 2016, doi: 10.1186/s12967-016-0893-x.
- [214] S. Shukla, J. Dass, y M. Pujani, «P53 and bcl2 expression in malignant and premalignant lesions of uterine cervix and their correlation with human

VII. BIBLIOGRAFÍA

papilloma virus 16 and 18», *South Asian Journal of Cancer*, vol. 3, n.º 1, pp. 48-53, 2014, doi: 10.4103/2278-330X.126524.

[215] N. Xu, T. Papagiannakopoulos, G. Pan, J. A. Thomson, y K. S. Kosik, «MiRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells», *Cell*, vol. 137, n.º 4, pp. 647-658, may 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.038.

[216] D. Carrillo-Beltrán *et al.*, «Human papillomavirus 16 E7 promotes EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 signaling pathway contributing to PIR/NF-κB activation in oral cancer cells», *Cancers*, vol. 12, n.º 7, pp. 1-22, jul. 2020, doi: 10.3390/cancers12071904.

[217] F. Mendonça *et al.*, «Human Papillomavirus Modulates Matrix Metalloproteinases During Carcinogenesis: Clinical Significance and Role of Viral Oncoproteins», *In Vivo*, vol. 36, n.º 6, pp. 2531-2541, noIV. 2022, doi: 10.21873/invivo.12990.

[218] A. Khatami *et al.*, «Human papilloma virus (HPV) and prostate cancer (PCa): The potential role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in PCa development», *Microbial Pathogenesis*, vol. 166, may 2022, doi: 10.1016/j.micpath.2022.105503.

[219] N. Khodabandehlou *et al.*, «Human papilloma virus and breast cancer: The role of inflammation and viral expressed proteins», *BMC Cancer*, vol. 19, n.º 1, ene. 2019, doi: 10.1186/s12885-019-5286-0.

[220] J. Karnosky *et al.*, «HPV and lung cancer: A systematic review and meta-analysis», *Cancer Reports*, vol. 4, n.º 4, ago. 2021, doi: 10.1002/cnr2.1350.

[221] C. H. Hsu *et al.*, «Human Papillomavirus and Risk of Colorectal Cancer: An Analysis of Nationwide Claims Data», *Medicina (Lithuania)*, vol. 58, n.º 10, oct. 2022, doi: 10.3390/medicina58101461.

[222] R. B. S. Roden y P. L. Stern, «Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer», *Nature Reviews Cancer*, vol. 18, n.º 4, pp. 240-254, mar. 2018, doi: 10.1038/nrc.2018.13.

[223] K. Chalertpet, W. Pakdeechaidan, IV. Patel, A. Mutirangura, y P. Yanatatsaneejit, «Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates

VII. BIBLIOGRAFÍA

CCNA1 promoter methylation», *Cancer Science*, vol. 106, n.º 10, pp. 1333-1340, oct. 2015, doi: 10.1111/cas.12761.

[224] Q. Zuo *et al.*, «Methylation in the promoters of HS3ST2 and CCNA1 genes is associated with cervical cancer in Uygur women in Xinjiang», *International Journal of Biological Markers*, vol. 29, n.º 4, pp. e354-e362, oct. 2014, doi: 10.5301/ijbm.5000107.

[225] L. F. Escobar-Hoyos *et al.*, «Keratin-17 promotes p27KIP1 nuclear export and degradation and offers potential prognostic utility», *Cancer Research*, vol. 75, n.º 17, pp. 3650-3662, sep. 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0293.

[226] Z. Li *et al.*, «Discovery and validation of novel biomarkers for detection of cervical cancer», *Cancer Medicine*, mar. 2021, doi: 10.1002/cam4.3799.

[227] X. Shi, J. Wang, S. Dai, L. Qin, J. Zhou, y Y. Chen, «Apolipoprotein c1 (ApoC1): A novel diagnostic and prognostic biomarker for cervical cancer», *OncoTargets and Therapy*, vol. 13, pp. 12881-12891, 2020, doi: 10.2147/OTT.S280690.

[228] S. W. Zhang *et al.*, «Co-expression of SOX2 and HR-HPV RISH predicts poor prognosis in small cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix», *BMC Cancer*, vol. 21, n.º 1, dic. 2021, doi: 10.1186/s12885-021-08059-1.

[229] X. Wang *et al.*, «Human papillomavirus integration perspective in small cell cervical carcinoma», *Nature Communications*, vol. 13, n.º 1, dic. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-33359-w.

[230] F. J. Vink *et al.*, «Validation of ASCL1 and LHX8 Methylation Analysis as Primary Cervical Cancer Screening Strategy in South African Women with Human Immunodeficiency Virus», *Clinical Infectious Diseases*, vol. 76, n.º 3, pp. 416-423, feb. 2023, doi: 10.1093/cid/ciac801.

[231] I. Rauluseviciute, F. Drabløs, y M. B. Rye, «DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation», *BMC Medical Genomics*, vol. 13, n.º 1, ene. 2020, doi: 10.1186/s12920-020-0657-6.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [232] A. M. Ghaleb y IV. W. Yang, «Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know», *Gene*, vol. 611, pp. 27-37, may 2017, doi: 10.1016/j.gene.2017.02.025.
- [233] T. Liu, T. Li, y S. Ke, «Role of the CASZ1 transcription factor in tissue development and disease», *European Journal of Medical Research*, vol. 28, n.º 1, dic. 2023, doi: 10.1186/s40001-023-01548-y.
- [234] B. K. Sun *et al.*, «CALML5 is a ZNF750-and TINCR-induced protein that binds stratifin to regulate epidermal differentiation», 2015, doi: 10.1101/gad.267708.
- [235] L. Kalaimani, B. Devarajan, IV. P. Namperumalsamy, M. Veerappan, J. T. Daniels, y G. P. Chidambaranathan, «Hsa-miR-143-3p inhibits Wnt- β -catenin and MAPK signaling in human corneal epithelial stem cells», *Scientific Reports*, vol. 12, n.º 1, dic. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-15263-x.
- [236] L. Zhou *et al.*, «Oncogenic miR-663a is associated with cellular function and poor prognosis in renal cell carcinoma», *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 105, pp. 1155-1163, sep. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.082.
- [237] IV. K. Gunasekharan, Y. Li, J. Andrade, y L. A. Laimins, «Post-Transcriptional Regulation of KLF4 by High-Risk Human Papillomaviruses Is Necessary for the Differentiation-Dependent Viral Life Cycle», *PLoS Pathogens*, vol. 12, n.º 7, jul. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005747.
- [238] Q. Wang, W. Lu, L. Lu, R. Wu, y D. Wu, «miR-575/RIPK4 axis modulates cell cycle progression and proliferation by inactivating the Wnt/ β -catenin signaling pathway through inhibiting RUNX1 in colon cancer», *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2024, doi: 10.1007/s11010-024-04938-w.
- [239] J. Zhang *et al.*, «The STAT3-miR-223-TGFBR3/HMGCS1 axis modulates the progression of cervical carcinoma», *Molecular Oncology*, vol. 14, n.º 9, pp. 2313-2331, sep. 2020, doi: 10.1002/1878-0261.12737.
- [240] G. J. Nuovo *et al.*, «Strong inverse correlation between MiRNA-125b and human papillomavirus DNA in productive infection», *Diagnostic Molecular Pathology*, vol. 19, n.º 3, pp. 135-143, sep. 2010, doi: 10.1097/PDM.0b013e3181c4daaa.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [241] Y. Wang, G. Zeng, y Y. Jiang, «The emerging roles of MiR-125b in cancers», *Cancer Management and Research*, vol. 12, pp. 1079-1088, 2020, doi: 10.2147/CMAR.S232388.
- [242] M. Li *et al.*, «MiR-26a-5p regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion via inhibiting hydroxysteroid dehydrogenase like-2 in cervical cancer cell», *BMC Cancer*, vol. 22, n.º 1, dic. 2022, doi: 10.1186/s12885-022-09970-x.
- [243] K. A. Fomicheva, E. N. Knyazev, y D. IV. Mal'tseva, «hsa-miR-1973 MiRNA is Significantly and Differentially Expressed in MDA-MB-231 Cells of Breast Adenocarcinoma and Xenografts Derived from the Tumor», *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 163, n.º 5, pp. 660-662, sep. 2017, doi: 10.1007/s10517-017-3873-0.
- [244] D. Yang, L. Fan, Z. Song, S. Fang, M. Huang, y P. Chen, «The KMT1A/TIMP3/PI3K/AKT circuit regulates tumor growth in cervical cancer», *Reproductive Biology*, vol. 22, n.º 3, sep. 2022, doi: 10.1016/j.repbio.2022.100644.
- [245] I. Martinez, A. S. Gardiner, K. F. Board, F. A. Monzon, R. P. Edwards, y S. A. Khan, «Human papillomavirus type 16 reduces the expression of miRNA-218 in cervical carcinoma cells», *Oncogene*, vol. 27, n.º 18, pp. 2575-2582, abr. 2008, doi: 10.1038/sj.onc.1210919.
- [246] J. Wu, J. Cheng, F. Zhang, X. Luo, Z. Zhang, y S. Chen, «Estrogen receptor α is involved in the regulation of ITGA8 methylation in estrogen receptor-positive breast cancer», *Annals of Translational Medicine*, vol. 8, n.º 16, pp. 993-993, ago. 2020, doi: 10.21037/atm-20-5220.
- [247] L. Cheng, B. Kong, Y. Zhao, y J. Jiang, «miR-494 inhibits cervical cancer cell proliferation through upregulation of SOCS6 expression», *Oncology Letters*, vol. 15, n.º 3, pp. 3075-3080, mar. 2018, doi: 10.3892/ol.2017.7651.
- [248] A. Maharati, I. Akhlaghipour, N. Taghehchian, Z. Farshchian Yazdi, y M. Moghbeli, «Role of miRNA-494 in tumor progression», *Am. J. Transl. Res.*, vol. 15, n.º 11, pp. 6342-6361, noIV. 2023.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [249] Z. J. Fu *et al.*, «Regulation of miR-30b in cancer development, apoptosis, and drug resistance», *Open Life Sciences*, vol. 17, n.º 1, pp. 102-106, ene. 2022, doi: 10.1515/biol-2022-0017.
- [250] J. Zhu y S. Han, «miR-150-5p promotes the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells via targeting SRCIN1», *Pathology Research and Practice*, vol. 215, n.º 4, pp. 738-747, abr. 2019, doi: 10.1016/j.prp.2019.01.004.
- [251] S. Kregel *et al.*, «Sox2 Is an Androgen Receptor-Repressed Gene That Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer», *PLoS ONE*, vol. 8, n.º 1, ene. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0053701.
- [252] J. C. Noël *et al.*, «Androgen receptor expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix», *International Journal of Gynecological Pathology*, vol. 27, n.º 3, pp. 437-441, jul. 2008, doi: 10.1097/PGP.0b013e318160c599.
- [253] S. Wu, K. Yu, Z. Lian, y S. Deng, «Molecular Regulation of Androgen Receptors in Major Female Reproductive System Cancers», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n.º 14, jul. 2022, doi: 10.3390/ijms23147556.
- [254] Y. Zhai, G. T. Bommer, Y. Feng, A. B. Wiese, E. R. Fearon, y K. R. Cho, «Loss of estrogen receptor 1 enhances cervical cancer invasion», *American Journal of Pathology*, vol. 177, n.º 2, pp. 884-895, 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.091166.
- [255] Y. Gómez-Gómez *et al.*, «The expression of miR-21 and miR-143 is deregulated by the HPV16 E7 oncoprotein and 17-estradiol», *International Journal of Oncology*, vol. 49, n.º 2, pp. 549-558, ago. 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3575.
- [256] A. Ramírez-de-Arellano, J. C. Villegas-Pineda, C. D. Hernández-Silva, y A. L. Pereira-Suárez, «The Relevant Participation of Prolactin in the Genesis and Progression of Gynecological Cancers», *Frontiers in Endocrinology*, vol. 12, oct. 2021, doi: 10.3389/fendo.2021.747810.
- [257] L. Lessard *et al.*, «The CASC15 Long Intergenic Noncoding RNA Locus Is Involved in Melanoma Progression and Phenotype Switching», *Journal of*

VII. BIBLIOGRAFÍA

Investigative Dermatology, vol. 135, n.º 10, pp. 2464-2474, oct. 2015, doi: 10.1038/jid.2015.200.

[258] C. R. Wira, M. Rodriguez-Garcia, y M. IV. Patel, «The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract», *Nature Reviews Immunology*, vol. 15, n.º 4, pp. 217-230, mar. 2015, doi: 10.1038/nri3819.

[259] K. Middleton *et al.*, «Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers», *Journal of Virology*, vol. 77, n.º 19, pp. 10186-10201, oct. 2003, doi: 10.1128/jvi.77.19.10186-10201.2003.

[260] N. Zeber-Lubecka *et al.*, «Cervical microbiota dysbiosis associated with high-risk Human Papillomavirus infection», *PLoS ONE*, vol. 19, n.º 4, p. e0302270, abr. 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0302270.

[261] Y. Xie *et al.*, «Revealing the Disturbed Vaginal Microbiota Caused by Cervical Cancer Using High-Throughput Sequencing Technology», *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 10, dic. 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.538336.

[262] S. M. Kovachev, «Cervical cancer and vaginal microbiota changes», *Archives of Microbiology*, vol. 202, n.º 2, pp. 323-327, mar. 2020, doi: 10.1007/s00203-019-01747-4.

[263] A. Peremykina *et al.*, «Microbiome markers in HPV-positive and HPV-negative women of reproductive age with ASCUS and SIL determined by V4 region of 16S rRNA gene sequencing», *Front. Microbiol.*, vol. 15, p. 1334502, mar. 2024, doi: 10.3389/fmicb.2024.1334502.

[264] J. G. Gonçalves-Nobre *et al.*, «The interplay between HPV, other Sexually Transmissible Infections and genital microbiome on cervical microenvironment (MicroCervixHPV study)», *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 13, p. 1251913, mar. 2024, doi: 10.3389/fcimb.2023.1251913.

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S.1. Resultados de expresión diferencial de mRNAs en 20 muestras HSIL y 27 muestras VSCC.

Gen	log2-ratio	P-value	FDR
CASC15	1,9094	1,76E-03	5,81E-03
CCNA1	1,7814	3,00E-06	5,94E-05
APOBEC3A	1,6779	2,05E-05	2,02E-04
CDKN2A	1,6733	9,00E-07	2,33E-05
ASCL1	1,6622	1,00E-07	5,20E-06
KRT17	1,6213	6,05E-05	5,31E-04
MMP9	1,5615	1,03E-03	3,68E-03
APOC1	1,4338	1,52E-04	8,56E-04
PRL	1,0342	1,21E-05	1,59E-04
SOX2	1,0213	8,18E-03	2,02E-02
IFNA2	0,9888	3,67E-04	1,65E-03
HOXA1	0,9852	1,49E-05	1,68E-04
APOBEC3B	0,9831	7,51E-05	5,39E-04
LHX8	0,9688	2,16E-03	6,81E-03
PAX1	0,9461	8,30E-04	3,28E-03
IFNG	0,9338	3,65E-03	1,11E-02
FHIT	0,9169	3,76E-04	1,65E-03
HAND2-AS1	0,9056	6,20E-04	2,58E-03
PD-L1	0,9041	6,98E-03	1,90E-02
MCM2	0,7123	9,80E-04	3,68E-03
IRF4	0,6616	6,70E-02	1,23E-01
ECT2	0,5779	1,40E-03	4,82E-03
IRF7	0,5660	5,33E-03	1,50E-02
KIF14	0,5607	8,54E-03	2,05E-02
TNF	0,5245	5,51E-02	1,06E-01
APOBEC3D	0,5235	3,59E-02	7,27E-02
APOBEC3H	0,4690	1,66E-01	2,56E-01
MYC	0,4313	9,87E-02	1,69E-01
SMARCB1	0,4282	3,55E-02	7,27E-02
CHAF1B	0,4242	1,07E-02	2,40E-02
HOXA10	0,3729	1,21E-01	2,03E-01
ZNF582	0,3715	1,51E-01	2,43E-01
HOXA11	0,3679	1,26E-01	2,08E-01
MYBL2	0,3569	1,61E-01	2,54E-01
FURIN	0,3520	7,81E-02	1,40E-01
BRCA1	0,3446	5,80E-02	1,09E-01
FN1	0,3360	5,23E-01	6,61E-01
FANCE	0,3245	9,76E-02	1,69E-01
SFN	0,2534	4,01E-01	5,46E-01
FANCA	0,1990	4,09E-01	5,47E-01

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

<i>CHAF1A</i>	0,1855	4,26E-01	5,60E-01
<i>PIK3CA</i>	0,1645	3,24E-01	4,57E-01
<i>APOBEC3G</i>	0,0840	8,02E-01	9,05E-01
<i>CCL17</i>	0,0688	7,99E-01	9,05E-01
<i>DAPK1</i>	0,0266	9,04E-01	9,61E-01
<i>CADM1</i>	-0,0109	9,61E-01	9,61E-01
<i>TSR1</i>	-0,0121	9,37E-01	9,61E-01
<i>RB1</i>	-0,0122	9,47E-01	9,61E-01
<i>EPDR1</i>	-0,0142	9,58E-01	9,61E-01
<i>MALAT1</i>	-0,0169	9,34E-01	9,61E-01
<i>E2F1</i>	-0,0179	9,41E-01	9,61E-01
<i>DNMT1</i>	-0,0379	8,33E-01	9,27E-01
<i>CRISP2</i>	-0,0435	9,09E-01	9,61E-01
<i>MGMT</i>	-0,0581	7,51E-01	8,73E-01
<i>APC</i>	-0,0951	5,38E-01	6,64E-01
<i>SLC19A3</i>	-0,1086	7,30E-01	8,60E-01
<i>DPAGT1</i>	-0,1126	5,27E-01	6,61E-01
<i>LIPE-AS1</i>	-0,1203	6,61E-01	7,91E-01
<i>FANCD2</i>	-0,1291	5,13E-01	6,61E-01
<i>CCND1</i>	-0,1648	5,87E-01	7,13E-01
<i>APOBEC3C</i>	-0,2145	3,89E-01	5,39E-01
<i>KNTC1</i>	-0,2208	2,68E-01	4,00E-01
<i>TP73</i>	-0,2218	3,09E-01	4,44E-01
<i>PTEN</i>	-0,2466	1,80E-01	2,74E-01
<i>ARID1B</i>	-0,3183	1,95E-02	4,16E-02
<i>CCND2</i>	-0,3520	3,00E-01	4,39E-01
<i>ANT3</i>	-0,3672	9,71E-03	2,26E-02
<i>TP53</i>	-0,4490	4,63E-03	1,36E-02
<i>RASSF1A</i>	-0,5341	1,27E-02	2,80E-02
<i>HOTAIR</i>	-0,6900	7,69E-03	2,02E-02
<i>TIMP3</i>	-0,8653	8,13E-03	2,02E-02
<i>APM1</i>	-0,9351	4,11E-02	8,12E-02
<i>AR</i>	-1,0504	7,27E-05	5,39E-04
<i>CASZ1</i>	-1,0770	1,84E-04	9,66E-04
<i>KLF4</i>	-1,1050	8,36E-05	5,50E-04
<i>ESR1</i>	-1,1572	3,11E-04	1,53E-03
<i>CALML5</i>	-1,6598	1,37E-04	8,33E-04
<i>SLIT2</i>	-1,7595	7,50E-06	1,19E-04
<i>ITGA8</i>	-1,8738	1,00E-07	5,20E-06

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S.2. Resultados de expresión diferencial de mRNAs en 17 muestras HSIL y 23 muestras VSCC positivas a VPH.

Gen	log2-ratio	P-value	FDR
<i>APOBEC3A</i>	1,9682	8,50E-06	1,17E-04
<i>CASC15</i>	1,8187	6,85E-03	1,74E-02
<i>CDKN2A</i>	1,7696	1,30E-06	5,05E-05
<i>KRT17</i>	1,7301	1,79E-04	1,28E-03
<i>ASCL1</i>	1,6701	3,90E-06	1,03E-04
<i>CCNA1</i>	1,5636	7,15E-05	6,62E-04
<i>MMP9</i>	1,3913	1,57E-03	6,55E-03
<i>APOBEC3B</i>	1,1864	8,90E-06	1,17E-04
<i>IFNA2</i>	1,0887	4,44E-04	2,34E-03
<i>PRL</i>	1,0598	5,68E-05	6,41E-04
<i>APOC1</i>	1,0182	2,96E-03	9,90E-03
<i>LHX8</i>	1,0065	4,44E-03	1,33E-02
<i>FHIT</i>	0,9764	7,47E-04	3,28E-03
<i>IFNG</i>	0,9709	6,72E-03	1,74E-02
<i>PD-L1</i>	0,9265	6,32E-03	1,72E-02
<i>PAX1</i>	0,8801	3,01E-03	9,90E-03
<i>SOX2</i>	0,8716	2,89E-02	6,34E-02
<i>HAND2-AS1</i>	0,8098	5,59E-03	1,58E-02
<i>HOXA1</i>	0,8052	7,54E-05	6,62E-04
<i>MCM2</i>	0,7901	3,11E-04	1,89E-03
<i>KIF14</i>	0,7021	2,01E-03	7,56E-03
<i>ECT2</i>	0,6997	2,47E-04	1,63E-03
<i>IRF4</i>	0,6895	7,48E-02	1,34E-01
<i>CHAF1B</i>	0,5326	3,23E-03	1,02E-02
<i>MYBL2</i>	0,5022	5,83E-02	1,07E-01
<i>IRF7</i>	0,4720	3,34E-02	6,95E-02
<i>SMARCB1</i>	0,4562	4,71E-02	8,86E-02
<i>APOBEC3D</i>	0,4493	1,04E-01	1,82E-01
<i>FANCE</i>	0,4213	4,46E-02	8,60E-02
<i>BRCA1</i>	0,4126	3,23E-02	6,89E-02
<i>ZNF582</i>	0,4078	1,70E-01	2,74E-01
<i>APOBEC3H</i>	0,3673	3,36E-01	4,65E-01
<i>MYC</i>	0,3667	2,08E-01	3,10E-01
<i>HOXA11</i>	0,3284	2,25E-01	3,29E-01
<i>FANCA</i>	0,3272	1,94E-01	3,00E-01
<i>CHAF1A</i>	0,3200	1,81E-01	2,86E-01
<i>FURIN</i>	0,3196	1,51E-01	2,49E-01
<i>SFN</i>	0,3182	3,45E-01	4,70E-01
<i>HOXA10</i>	0,2817	2,80E-01	4,02E-01

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

<i>TNF</i>	0,2708	3,01E-01	4,25E-01
<i>PIK3CA</i>	0,1354	4,49E-01	5,92E-01
<i>E2F1</i>	0,1259	6,39E-01	7,31E-01
<i>CCL17</i>	0,0752	8,07E-01	8,74E-01
<i>RB1</i>	0,0411	8,43E-01	8,85E-01
<i>DNMT1</i>	0,0353	8,59E-01	8,85E-01
<i>DAPK1</i>	-0,0149	9,49E-01	9,49E-01
<i>TSR1</i>	-0,0296	8,63E-01	8,85E-01
<i>LIPE-AS1</i>	-0,0413	8,91E-01	9,02E-01
<i>FANCD2</i>	-0,0807	6,97E-01	7,86E-01
<i>TP73</i>	-0,0841	7,22E-01	7,93E-01
<i>CADM1</i>	-0,0962	7,07E-01	7,86E-01
<i>FN1</i>	-0,0980	8,26E-01	8,82E-01
<i>APC</i>	-0,1123	5,17E-01	6,39E-01
<i>KNTC1</i>	-0,1303	5,37E-01	6,53E-01
<i>MGMT</i>	-0,1357	4,69E-01	5,98E-01
<i>DPAGT1</i>	-0,1424	4,67E-01	5,98E-01
<i>MALAT1</i>	-0,1716	3,98E-01	5,33E-01
<i>APOBEC3G</i>	-0,1757	6,11E-01	7,10E-01
<i>EPDR1</i>	-0,1794	5,15E-01	6,39E-01
<i>SLC19A3</i>	-0,1813	6,01E-01	7,09E-01
<i>CRISP2</i>	-0,2093	5,90E-01	7,06E-01
<i>ARID1B</i>	-0,3108	3,72E-02	7,53E-02
<i>PTEN</i>	-0,3213	1,14E-01	1,96E-01
<i>APOBEC3C</i>	-0,3642	1,42E-01	2,38E-01
<i>CCND1</i>	-0,3894	1,98E-01	3,00E-01
<i>ANT3</i>	-0,4170	7,64E-03	1,89E-02
<i>RASSF1A</i>	-0,4899	3,96E-02	7,82E-02
<i>TP53</i>	-0,5013	4,53E-03	1,33E-02
<i>HOTAIR</i>	-0,6604	2,43E-02	5,48E-02
<i>CCND2</i>	-0,7510	2,01E-02	4,67E-02
<i>CASZ1</i>	-0,9341	2,89E-03	9,90E-03
<i>TIMP3</i>	-1,0603	1,96E-03	7,56E-03
<i>KLF4</i>	-1,1153	4,12E-04	2,32E-03
<i>AR</i>	-1,1259	8,93E-05	7,06E-04
<i>ESR1</i>	-1,2195	5,84E-04	2,84E-03
<i>APM1</i>	-1,2311	1,40E-02	3,35E-02
<i>CALML5</i>	-1,5482	6,12E-04	2,84E-03
<i>SLIT2</i>	-1,9596	7,00E-06	1,17E-04
<i>ITGA8</i>	-1,9991	2,00E-07	1,88E-05

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S.3. Resultados de expresión diferencial de mRNAs en 13 muestras HSIL y 19 muestras VSCC positivas a VPH16.

Gen	log2-ratio	P-value	FDR
CASC15	2,3873	3,63E-03	1,34E-02
APOBEC3A	2,1122	1,90E-05	7,69E-04
MMP9	1,8647	1,06E-04	1,42E-03
CDKN2A	1,8599	6,30E-06	5,13E-04
KRT17	1,8424	1,59E-04	1,61E-03
CCNA1	1,7599	2,21E-04	1,66E-03
IFNG	1,5584	1,31E-04	1,52E-03
PD-L1	1,4038	9,91E-05	1,42E-03
IFNA2	1,3551	2,25E-04	1,66E-03
HPV16_E6	1,2730	7,83E-03	2,44E-02
LHX8	1,2447	3,11E-03	1,26E-02
APOBEC3B	1,2276	2,02E-04	1,66E-03
IRF4	1,2161	3,35E-03	1,29E-02
APOC1	1,2010	4,34E-03	1,48E-02
FHIT	1,1889	6,25E-04	3,62E-03
ASCL1	1,1861	1,33E-03	6,72E-03
PRL	1,1761	2,51E-04	1,69E-03
HOXA1	1,0281	5,33E-05	1,42E-03
HAND2-AS1	0,9395	9,52E-03	2,86E-02
PAX1	0,8067	2,84E-02	6,98E-02
APOBEC3H	0,7841	8,76E-02	1,66E-01
ZNF582	0,7781	3,25E-02	7,74E-02
SOX2	0,7314	8,02E-02	1,60E-01
APOBEC3D	0,7140	2,38E-02	6,43E-02
HOXA11	0,6695	3,39E-02	7,85E-02
TNF	0,6106	4,16E-02	9,37E-02
MCM2	0,6104	1,51E-02	4,36E-02
KIF14	0,6090	1,87E-02	5,23E-02
SMARCB1	0,5685	4,98E-02	1,09E-01
CHAF1B	0,4955	2,80E-02	6,98E-02
IRF7	0,4714	8,12E-02	1,60E-01
ECT2	0,4524	2,67E-02	6,97E-02
HOXA10	0,4475	1,59E-01	2,68E-01
FANCE	0,4468	8,83E-02	1,66E-01
BRCA1	0,4245	7,75E-02	1,60E-01
MYC	0,4044	1,83E-01	2,98E-01
SFN	0,3927	2,85E-01	4,44E-01
PIK3CA	0,3771	1,01E-01	1,85E-01
FURIN	0,3759	1,49E-01	2,56E-01

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

<i>SLC19A3</i>	0,3336	3,52E-01	5,26E-01
<i>DAPK1</i>	0,3075	2,48E-01	3,94E-01
<i>CCL17</i>	0,3008	3,75E-01	5,36E-01
<i>EPDR1</i>	0,2435	4,47E-01	6,14E-01
<i>MYBL2</i>	0,2240	3,77E-01	5,36E-01
<i>FN1</i>	0,2111	6,59E-01	7,84E-01
<i>CHAF1A</i>	0,1964	4,81E-01	6,28E-01
<i>DPAGT1</i>	0,1658	4,76E-01	6,28E-01
<i>FANCA</i>	0,0901	7,50E-01	8,56E-01
<i>CADM1</i>	0,0878	7,36E-01	8,52E-01
<i>APOBEC3G</i>	0,0842	8,33E-01	9,14E-01
<i>MALAT1</i>	0,0372	8,80E-01	9,14E-01
<i>TSR1</i>	0,0305	8,91E-01	9,14E-01
<i>LIPE-AS1</i>	0,0046	9,93E-01	9,93E-01
<i>CCND1</i>	-0,0282	9,34E-01	9,46E-01
<i>APC</i>	-0,0291	8,92E-01	9,14E-01
<i>RB1</i>	-0,0393	8,84E-01	9,14E-01
<i>DNMT1</i>	-0,0467	8,52E-01	9,14E-01
<i>MGMT</i>	-0,0470	8,45E-01	9,14E-01
<i>TP73</i>	-0,0516	8,50E-01	9,14E-01
<i>PTEN</i>	-0,0980	6,91E-01	8,11E-01
<i>APOBEC3C</i>	-0,1381	6,37E-01	7,70E-01
<i>E2F1</i>	-0,1595	6,03E-01	7,40E-01
<i>HOTAIR</i>	-0,1733	5,86E-01	7,31E-01
<i>FANCD2</i>	-0,1804	4,73E-01	6,28E-01
<i>KNTC1</i>	-0,2455	3,57E-01	5,26E-01
<i>CCND2</i>	-0,2591	4,19E-01	5,85E-01
<i>RASSF1A</i>	-0,2870	3,02E-01	4,62E-01
<i>CRISP2</i>	-0,2897	5,32E-01	6,83E-01
<i>ARID1B</i>	-0,2938	1,31E-01	2,35E-01
<i>ANT3</i>	-0,3694	7,88E-02	1,60E-01
<i>TIMP3</i>	-0,4882	1,84E-01	2,98E-01
<i>HPV16_E4</i>	-0,6085	5,53E-01	7,00E-01
<i>TP53</i>	-0,6655	2,78E-03	1,23E-02
<i>APM1</i>	-0,7118	1,39E-01	2,45E-01
<i>AR</i>	-0,8709	4,55E-03	1,48E-02
<i>CASZ1</i>	-1,0010	4,49E-03	1,48E-02
<i>KLF4</i>	-1,0352	2,88E-03	1,23E-02
<i>ESR1</i>	-1,1816	1,15E-03	6,20E-03
<i>ITGA8</i>	-1,4698	3,86E-04	2,41E-03
<i>CALML5</i>	-1,5345	1,73E-03	8,24E-03
<i>SLIT2</i>	-1,7801	8,89E-05	1,42E-03

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S.4. Resultados de expresión diferencial de mRNAs en 16 muestras positivas a VPH16-A y 16 muestras positivas a VPH16-B/C/D.

Gen	log2-ratio	P-value	FDR
<i>APOBEC3A</i>	1,1714	1,70E-02	4,76E-01
<i>CDKN2A</i>	1,0983	2,45E-02	5,14E-01
<i>HPV16_E4</i>	0,9094	5,08E-01	7,98E-01
<i>MMP9</i>	0,8806	9,36E-02	6,21E-01
<i>IFNA2</i>	0,8518	3,46E-02	5,81E-01
<i>HPV33_E4</i>	0,7213	1,11E-01	6,21E-01
<i>CCL17</i>	0,6899	5,86E-02	6,01E-01
<i>PAX1</i>	0,6504	7,53E-02	6,01E-01
<i>IRF4</i>	0,6012	2,02E-01	7,39E-01
<i>CASZ1</i>	0,5994	1,33E-01	6,43E-01
<i>PRL</i>	0,4605	1,90E-01	7,39E-01
<i>HAND2-AS1</i>	0,4106	2,91E-01	7,67E-01
<i>IFNG</i>	0,4089	3,94E-01	7,98E-01
<i>TNF</i>	0,4082	2,01E-01	7,39E-01
<i>FURIN</i>	0,4038	1,60E-01	6,70E-01
<i>CRISP2</i>	0,3859	4,13E-01	7,98E-01
<i>PD-L1</i>	0,3771	3,86E-01	7,98E-01
<i>APOC1</i>	0,3660	4,78E-01	7,98E-01
<i>ASCL1</i>	0,3612	3,71E-01	7,98E-01
<i>KLF4</i>	0,3585	3,51E-01	7,98E-01
<i>E2F1</i>	0,3371	2,90E-01	7,67E-01
<i>CHAF1A</i>	0,3341	2,38E-01	7,67E-01
<i>SOX2</i>	0,3197	4,87E-01	7,98E-01
<i>KIF14</i>	0,3020	2,82E-01	7,67E-01
<i>HPV18_E4</i>	0,3011	4,82E-01	7,98E-01
<i>FHIT</i>	0,2983	4,53E-01	7,98E-01
<i>FANCE</i>	0,2895	2,92E-01	7,67E-01
<i>CALML5</i>	0,2757	6,35E-01	9,04E-01
<i>FANCA</i>	0,2705	3,46E-01	7,98E-01
<i>SMARCB1</i>	0,2671	4,06E-01	7,98E-01
<i>APOBEC3H</i>	0,2488	6,03E-01	9,04E-01
<i>ECT2</i>	0,2222	3,19E-01	7,98E-01
<i>HPV16_E6</i>	0,2143	6,82E-01	9,09E-01
<i>TP73</i>	0,2084	4,62E-01	7,98E-01
<i>MCM2</i>	0,1965	4,69E-01	7,98E-01
<i>ZNF582</i>	0,1821	6,47E-01	9,05E-01
<i>PIK3CA</i>	0,1608	5,13E-01	7,98E-01
<i>SLC19A3</i>	0,1608	6,69E-01	9,09E-01
<i>HOTAIR</i>	0,1419	6,79E-01	9,09E-01

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

<i>ARID1B</i>	0,1010	6,32E-01	9,04E-01
<i>RB1</i>	0,1004	7,15E-01	9,10E-01
<i>HOXA11</i>	0,0955	7,88E-01	9,62E-01
<i>SFN</i>	0,0929	8,13E-01	9,62E-01
<i>MALAT1</i>	0,0905	7,31E-01	9,16E-01
<i>APOBEC3B</i>	0,0803	8,49E-01	9,64E-01
<i>HOXA1</i>	0,0690	8,24E-01	9,62E-01
<i>ANT3</i>	0,0556	8,02E-01	9,62E-01
<i>DAPK1</i>	0,0443	8,80E-01	9,73E-01
<i>BRCA1</i>	0,0296	9,11E-01	9,78E-01
<i>HPV33_E6</i>	0,0123	9,82E-01	9,87E-01
<i>LIPE-AS1</i>	-0,0093	9,80E-01	9,87E-01
<i>KRT17</i>	-0,0267	9,61E-01	9,87E-01
<i>HOXA10</i>	-0,0293	9,32E-01	9,78E-01
<i>KNTC1</i>	-0,0307	9,14E-01	9,78E-01
<i>CCNA1</i>	-0,0493	9,21E-01	9,78E-01
<i>MYC</i>	-0,0560	8,61E-01	9,64E-01
<i>APOBEC3D</i>	-0,0895	8,03E-01	9,62E-01
<i>LHX8</i>	-0,0907	8,43E-01	9,64E-01
<i>DPAGT1</i>	-0,0934	7,12E-01	9,10E-01
<i>DNMT1</i>	-0,0953	7,14E-01	9,10E-01
<i>MGMT</i>	-0,1629	5,13E-01	7,98E-01
<i>TSR1</i>	-0,1849	4,22E-01	7,98E-01
<i>CADM1</i>	-0,2049	4,70E-01	7,98E-01
<i>RASSF1A</i>	-0,2059	5,04E-01	7,98E-01
<i>AR</i>	-0,2715	4,34E-01	7,98E-01
<i>PTEN</i>	-0,2850	2,65E-01	7,67E-01
<i>TP53</i>	-0,2863	2,47E-01	7,67E-01
<i>APM1</i>	-0,3019	5,51E-01	8,42E-01
<i>ITGA8</i>	-0,3178	4,86E-01	7,98E-01
<i>CCND1</i>	-0,4052	2,70E-01	7,67E-01
<i>MYBL2</i>	-0,4103	1,10E-01	6,21E-01
<i>FANCD2</i>	-0,4135	1,19E-01	6,27E-01
<i>IRF7</i>	-0,4312	1,47E-01	6,48E-01
<i>ESR1</i>	-0,4881	2,22E-01	7,67E-01
<i>EPDR1</i>	-0,5084	1,38E-01	6,43E-01
<i>APOBEC3C</i>	-0,5349	7,83E-02	6,01E-01
<i>CCND2</i>	-0,5437	9,76E-02	6,21E-01
<i>TIMP3</i>	-0,6888	5,85E-02	6,01E-01
<i>APOBEC3G</i>	-0,8283	4,50E-02	6,01E-01
<i>SLIT2</i>	-0,8306	7,87E-02	6,01E-01
<i>FN1</i>	-1,4136	3,96E-03	1,66E-01
<i>CASC15</i>	-3,0411	1,02E-04	8,54E-03

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S.5. Resultados de expresión diferencial de miRNAs en 11 muestras HSIL y 13 muestras VSCC.

miRNA	log2-ratio	P-value	FDR
miR-4286	2,0367	2,58E-04	6,83E-02
miR-223-3p	1,4944	1,71E-03	1,51E-01
miR-206	1,4517	1,12E-02	4,91E-01
miR-575	1,4155	2,22E-03	1,59E-01
miR-494-3p	1,3819	3,00E-02	7,16E-01
miR-630	1,3277	7,47E-04	1,07E-01
miR-642a-3p	1,2116	1,25E-03	1,28E-01
miR-1973	1,1215	3,30E-03	1,79E-01
miR-31-5p	1,0051	1,18E-03	1,28E-01
miR-9-5p	0,9748	1,56E-02	5,33E-01
miR-663a	0,8998	3,96E-04	7,09E-02
miR-222-3p	0,8517	3,55E-02	7,77E-01
miR-638	0,8421	1,90E-03	1,51E-01
miR-320e	0,8077	2,82E-03	1,69E-01
miR-4516	0,5774	4,99E-02	7,88E-01
miR-4488	0,5728	2,73E-02	6,74E-01
miR-4284	0,4943	4,42E-02	7,77E-01
miR-1290	0,3868	4,88E-02	7,88E-01
miR-4443	-0,3911	4,12E-02	7,77E-01
miR-5196-5p	-0,4347	4,44E-02	7,77E-01
miR-3182	-0,4505	4,31E-02	7,77E-01
miR-765	-0,4509	4,03E-02	7,77E-01
miR-944	-0,4525	4,40E-02	7,77E-01
miR-149-5p	-0,4827	2,11E-02	6,56E-01
miR-216b-5p	-0,4834	2,67E-02	6,74E-01
miR-6724-5p	-0,4856	2,46E-02	6,74E-01
miR-197-3p	-0,4891	4,01E-02	7,77E-01
miR-302d-3p	-0,4940	2,24E-02	6,68E-01
miR-574-3p	-0,5272	1,79E-02	5,83E-01
miR-381-3p	-0,5420	1,51E-02	5,33E-01
miR-30b-5p	-0,6460	2,33E-02	6,68E-01
miR-199b-5p	-0,6514	3,97E-02	7,77E-01
miR-26b-5p	-0,7015	4,07E-02	7,77E-01
miR-30c-5p	-0,7144	3,49E-03	1,79E-01
miR-374a-5p	-0,7487	2,57E-02	6,74E-01
miR-26a-5p	-0,7856	1,35E-02	5,09E-01
miR-29c-3p	-0,9244	1,22E-02	4,91E-01
miR-99a-5p	-1,0421	3,92E-02	7,77E-01
miR-hsa-let-7c-5p	-1,0475	1,23E-02	4,91E-01
miR-143-3p	-1,3730	2,69E-03	1,69E-01

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

miR-451a	-1,5508	8,65E-03	4,13E-01
miR-125b-5p	-1,8508	2,86E-04	6,83E-02
miR-145-5p	-2,5530	2,24E-05	1,61E-02

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S.6. Resultados de expresión diferencial de miRNAs en 9 muestras HSIL y 11 muestras VSCC.

miRNA	log2-ratio	P-value	FDR
miR-494-3p	1,9283	1,93E-03	1,26E-01
miR-575	1,8648	4,86E-05	1,62E-02
miR-223-3p	1,6921	1,37E-03	1,09E-01
miR-206	1,6550	9,86E-03	3,75E-01
miR-630	1,6150	6,78E-05	1,62E-02
miR-642a-3p	1,4075	3,30E-04	3,95E-02
miR-1973	1,3468	5,78E-04	5,92E-02
miR-4286	1,3249	1,32E-02	4,45E-01
miR-1246	1,1614	1,72E-02	4,72E-01
miR-663a	1,0559	2,58E-04	3,69E-02
miR-9-5p	1,0178	2,37E-02	4,85E-01
miR-638	0,9879	9,39E-04	8,42E-02
miR-320e	0,8632	5,32E-03	2,51E-01
miR-222-3p	0,8574	4,53E-02	5,20E-01
miR-1972	0,7870	1,91E-02	4,83E-01
miR-1285-5p	0,7637	3,94E-03	2,35E-01
miR-7-5p	0,7535	2,62E-02	4,85E-01
miR-4284	0,6900	5,59E-03	2,51E-01
miR-637	0,6782	4,40E-02	5,20E-01
miR-4488	0,6415	2,65E-02	4,85E-01
miR-31-5p	0,6322	3,83E-02	5,20E-01
miR-1290	0,4748	2,56E-02	4,85E-01
miR-378e	-0,4649	1,75E-02	4,72E-01
miR-149-5p	-0,4823	4,47E-02	5,20E-01
miR-1299	-0,4865	4,57E-02	5,20E-01
miR-1258	-0,4944	4,23E-02	5,20E-01
miR-212-3p	-0,5078	2,71E-02	4,85E-01
miR-215-5p	-0,5083	2,49E-02	4,85E-01
miR-6724-5p	-0,5087	4,23E-02	5,20E-01
miR-765	-0,5138	3,00E-02	5,00E-01
miR-296-5p	-0,5145	4,52E-02	5,20E-01
miR-541-3p	-0,5328	3,29E-02	5,13E-01
miR-3182	-0,5387	3,01E-02	5,00E-01
miR-92a-3p	-0,5646	3,85E-02	5,20E-01
miR-216b-5p	-0,5731	2,17E-02	4,85E-01
miR-548ak	-0,5773	2,53E-02	4,85E-01
miR-197-3p	-0,5806	2,63E-02	4,85E-01
miR-944	-0,5913	2,02E-02	4,83E-01
miR-766-5p	-0,5966	4,39E-02	5,20E-01
miR-574-3p	-0,6071	1,78E-02	4,72E-01

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

miR-584-5p	-0,6151	3,82E-02	5,20E-01
miR-99b-5p	-0,6190	3,07E-02	5,00E-01
miR-381-3p	-0,6192	1,35E-02	4,45E-01
miR-382-3p	-0,6241	1,71E-02	4,72E-01
miR-302d-3p	-0,6245	4,76E-03	2,51E-01
miR-103a-3p	-0,6333	1,96E-02	4,83E-01
miR-1203	-0,6447	1,68E-02	4,72E-01
miR-2278	-0,6674	3,78E-02	5,20E-01
miR-1247-5p	-0,6857	3,94E-02	5,20E-01
miR-423-3p	-0,6976	2,98E-02	5,00E-01
miR-30c-5p	-0,7106	9,95E-03	3,75E-01
miR-374a-5p	-0,7371	4,76E-02	5,34E-01
miR-26b-5p	-0,7811	4,01E-02	5,20E-01
miR-125a-5p	-0,7981	3,83E-02	5,20E-01
miR-100-5p	-0,8316	4,11E-02	5,20E-01
miR-29c-3p	-0,8683	3,76E-02	5,20E-01
miR-30b-5p	-0,8852	5,28E-03	2,51E-01
miR-150-5p	-0,9553	2,15E-02	4,85E-01
miR-26a-5p	-0,9587	7,76E-03	3,27E-01
miR-hsa-let-7c-5p	-1,0032	3,24E-02	5,13E-01
miR-143-3p	-1,6113	1,83E-03	1,26E-01
miR-451a	-1,6711	1,37E-02	4,45E-01
miR-125b-5p	-2,1410	2,07E-04	3,69E-02
miR-145-5p	-3,0040	1,41E-05	1,01E-02

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S.9. Funciones biológicas con sobrerepresentación significativa de los 18 miRNAs diferencialmente expresados en muestras positivas a VPH16.

Función biológica	Grupo	Nº miRNAs	FDR	microRNAs
Cell Cycle	Ciclo celular	8	7,01E-08	miR-9, miR-143, miR-125b, miR-145, miR-223, miR-320e, miR-494, miR-150
Cell Proliferation	Proliferación / Diferenciación	7	7,22E-07	miR-9, miR-125b, miR-451a, miR-145, miR-494, miR-150, miR-143
Inflammation	Respuesta inmune / Inflamación	8	1,17E-06	miR-9, miR-125b, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-143, miR-223,
Aging	Ciclo celular	6	1,27E-06	miR-9, miR-30b, miR-451a, miR-26a, miR-145, miR-223
Cell Motility	Migración / invasión	4	5,09E-06	miR-30b, miR-9, miR-145, miR-143
Regulation of Stem Cell	Proliferación / Diferenciación	6	6,99E-06	miR-9, miR-143, miR-125b, miR-451a, miR-145, miR-223,
Apoptosis	Apoptosis / Respuesta a estrés	7	7,16E-06	miR-9, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143
Cell Differentiation	Proliferación / Diferenciación	5	7,38E-06	miR-9, miR-143, miR-125b, miR-145, miR-150
Innate Immunity	Respuesta inmune / Inflamación	5	1,33E-05	miR-125b, miR-30b, miR-26a, miR-145, miR-223
Tumor Suppressor MiRNAs	Respuesta inmune / Inflamación	6	1,71E-05	miR-143, miR-125b, miR-30b, miR-451a, miR-26a, miR-145
Latent Virus Replication	Ciclo celular	3	3,73E-05	miR-223, miR-26a, miR-125b
Immune Response	Respuesta inmune / Inflamación	5	1,68E-04	miR-9, miR-125b, miR-150, miR-143, miR-223
Cell Death	Apoptosis / Respuesta a estrés	6	5,03E-04	miR-143, miR-125b, miR-630, miR-30b, miR-145, miR-494
Hematopoiesis	Respuesta inmune / Inflamación	5	7,83E-04	miR-125b, miR-145, miR-223, miR-150, miR-143
Plasma Cell Differentiation	Respuesta inmune / Inflamación	2	1,52E-03	miR-223, miR-125b
Skeletal Muscle Cell Differentiation	Proliferación / Diferenciación	3	1,84E-03	miR-30b, miR-26a, miR-494
Smooth Muscle Cell Senescence	Ciclo celular	2	2,28E-03	miR-145, miR-143
Folliculogenesis	Proliferación / Diferenciación	2	3,44E-03	miR-125b, miR-143
Epithelial-to-Mesenchymal Transition	Proliferación / Diferenciación	6	4,53E-03	miR-1973, miR-30b, miR-451a, miR-145, miR-223, miR-143
Embryonic Stem Cell Differentiation	Proliferación / Diferenciación	2	5,21E-03	miR-9-1, miR-223
Smooth Muscle Cell Differentiation	Proliferación / Diferenciación	2	5,38E-03	miR-145, miR-143
Toxicity	Apoptosis / Respuesta a estrés	3	8,84E-03	miR-26a, miR-145, miR-150
Insulin Resistance	Metabolismo	3	1,24E-02	miR-223, miR-494, miR-145
Wound Healing	Migración / invasión	2	2,24E-02	miR-125b, miR-145
Osteoblast Differentiation	Proliferación / Diferenciación	2	2,74E-02	miR-125b, miR-145
Regulation of Akt Pathway	Proliferación / Diferenciación	2	3,03E-02	miR-26a, miR-143
T-Cell Activation	Respuesta inmune / Inflamación	2	3,30E-02	miR-223, miR-451a
Glucose Metabolism	Proliferación / Diferenciación	2	3,65E-02	miR-125b, miR-223
Hormone-mediated Signaling Pathway	Proliferación / Diferenciación	2	3,93E-02	miR-9, miR-223
Angiogenesis	Proliferación / Diferenciación	4	5,66E-02	miR-145, miR-320e, miR-150, miR-143

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S.9. Enfermedades con sobrerrepresentación significativa de los 18 miRNAs diferencialmente expresados en muestras positivas a VPH16 (continúa en página siguiente).

Enfermedad	Grupo	N° miRNAs	FDR	miRNAs
Carcinoma, Colon	Carcinoma	14	1,78E-297	miR-9, miR-125b, miR-4286, miR-630, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-494, miR-143, miR-638, miR-223
Carcinoma, Colon	Carcinoma	13	1,78E-297	miR-9, miR-125b, miR-630, miR-451a, miR-223, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-143, miR-638, miR-575, miR-638
Carcinoma, Hepatocelular	Carcinoma	13	1,78E-297	miR-9, miR-125b, miR-663a, miR-630, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-638, miR-223
Carcinoma, Gástrico	Carcinoma	12	1,78E-297	miR-9, miR-125b, miR-630, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-494, miR-143, miR-638, miR-223
Carcinoma, Prostata	Carcinoma	10	1,78E-297	miR-9, miR-125b, miR-663a, miR-630, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-638, miR-223
Carcinoma, Lung	Carcinoma	15	4,93E-13	miR-9, miR-125b, miR-663a, miR-4286, miR-630, miR-451a, miR-1973, miR-630, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-638, miR-223
Leukemia, Lymphocytic, Chronic	Cáncer (Otros)	6	1,57E-09	miR-9, miR-125b, miR-663a, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-638, miR-223
Carcinoma, Cervical	Carcinoma	10	5,66E-09	miR-9, miR-125b, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-494, miR-143, miR-223
Cardiomyopathy, Hypertrophic	Cardiovascular	6	3,01E-08	miR-9, miR-125b, miR-30b, miR-451a, miR-145, miR-150, miR-143
Melanoma	Cáncer (Otros)	9	5,34E-08	miR-9, miR-125b, miR-4286, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-145, miR-143, miR-638
Squamous Cell Carcinoma, Oral	Carcinoma	7	7,01E-08	miR-9, miR-143, miR-125b, miR-26a, miR-145, miR-223, miR-494
Glioblastoma	Cáncer (Otros)	10	7,15E-08	miR-9, miR-125b, miR-663a, miR-451a, miR-26a, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-223
Neoplasms [unspecific]	Neoplasia	11	7,33E-08	miR-9, miR-125b, miR-630, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-638, miR-223
Machado-Joseph Disease	Sistema nervioso y músculos	3	8,49E-08	miR-9, miR-494, miR-125b
Carcinoma, Nasopharyngeal	Carcinoma	9	1,08E-07	miR-9, miR-125b, miR-451a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-223
Atherosclerosis	Cardiovascular	8	2,46E-07	miR-9, miR-663a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-143, miR-223
Carcinoma, Ovarian	Carcinoma	10	2,99E-07	miR-9, miR-125b, miR-663a, miR-630, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143
Glioma	Cáncer (Otros)	10	9,94E-07	miR-9, miR-125b, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-494, miR-143
Osteosarcoma	Cáncer (Otros)	9	7,30E-07	miR-9, miR-125b, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-494, miR-143, miR-223
Knee Osteoarthritis	Cáncer (Otros)	2	1,26E-06	miR-9, miR-223, miR-9
Diabetes Mellitus, Type 2	Sistema nervioso y músculos	9	1,43E-06	miR-9, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-143, miR-223
Leukemia, Myeloid, Acute	Metabolismo y aparato digestivo	7	1,91E-06	miR-9, miR-125b, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-494, miR-223
Leukemia	Cáncer (Otros)	6	1,92E-06	miR-9, miR-125b, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-494, miR-143
Rheumatoid Arthritis	Sistema nervioso y músculos	5	5,85E-06	miR-9, miR-125b, miR-663a, miR-451a, miR-223
Bladder Neoplasms	Neoplasia	4	7,33E-06	miR-9, miR-125b, miR-145, miR-143
Carcinoma, Lung, Non-Small-Cell	Carcinoma	9	9,35E-06	miR-9, miR-125b, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-223
Squamous Cell Carcinoma, Esophageal	Carcinoma	7	9,44E-06	miR-9, miR-630, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-638
Lung Neoplasms	Neoplasia	6	9,68E-06	miR-9, miR-125b, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494, miR-143, miR-638
Multiple Myeloma	Cáncer (Otros)	6	1,09E-05	miR-9, miR-30b, miR-451a, miR-145, miR-223, miR-150
Fibromyalgia	Cardiovascular	4	1,19E-05	miR-223, miR-451a, miR-145, miR-143
Asthma	Dermatología y alergía	4	1,20E-05	miR-9, miR-125b, miR-145, miR-143
Endometriosis	Enf. Ginecológicas No cáncer	6	1,20E-05	miR-9, miR-125b, miR-451a, miR-145, miR-143
Osteoarthritis	Sistema nervioso y músculos	4	1,20E-05	miR-9, miR-125b, miR-30b, miR-145
Carcinoma, Gallbladder	Carcinoma	4	1,75E-05	miR-9, miR-125b, miR-26a, miR-145, miR-143
Heart Failure	Cardiovascular	8	1,75E-05	miR-9, miR-125b, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-494
Fatty Liver, Non-Alcoholic	Metabolismo y aparato digestivo	2	1,88E-05	miR-9, miR-125b
Adenocarcinoma, Lung	Carcinoma	6	4,23E-05	miR-9, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494
Myocardial Infarction	Cardiovascular	5	5,27E-05	miR-9, miR-125b, miR-451a, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-494
Ovarian Neoplasms	Neoplasia	5	5,73E-05	miR-9, miR-125b, miR-26a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-494
Lymphoma, Extranodal NK-T-Cell	Cáncer (Otros)	2	5,75E-05	miR-125b, miR-26a
Hematologic Neoplasms	Neoplasia	3	5,90E-05	miR-125b, miR-26a, miR-223, miR-150
Cerebral Aneurysm	Cardiovascular	3	7,68E-05	miR-9, miR-145, miR-143
Breast Neoplasms	Neoplasia	7	9,72E-05	miR-9, miR-125b, miR-451a, miR-30b, miR-145, miR-320e, miR-143, miR-223
Carcinoma, Renal Cell, Clear-Cell	Carcinoma	4	9,76E-05	miR-9, miR-125b, miR-145, miR-223
Nervous System Diseases [unspecific]	Sistema nervioso y músculos	2	1,05E-04	miR-9, miR-145
Adenocarcinoma, Gastric	Carcinoma	5	1,08E-04	miR-125b, miR-145, miR-223, miR-320e, miR-143
Lymphoma	Cáncer (Otros)	5	1,16E-04	miR-125b, miR-26a, miR-494, miR-150, miR-143
Lymphoma, Hodgkin	Cáncer (Otros)	3	1,16E-04	miR-9, miR-1973, miR-494
Aortic Aneurysm	Cardiovascular	3	1,53E-04	miR-125b, miR-145, miR-143
Neuroinflammation	Sistema nervioso y músculos	2	1,53E-04	miR-9, miR-494
Cardiovascular Diseases [unspecific]	Cardiovascular	6	1,69E-04	miR-451a, miR-26a, miR-145, miR-223, miR-150, miR-143
Aortic Insufficiency	Cardiovascular	2	1,71E-04	miR-30b, miR-26a
Cardiomyopathy	Cardiovascular	3	1,74E-04	miR-9, miR-30b, miR-451a
Carcinoma, Thyroid, Anaplastic	Carcinoma	2	2,02E-04	miR-125b, miR-26a
Leukemia, Myeloid, Chronic	Cáncer (Otros)	4	2,09E-04	miR-9, miR-1973, miR-26a, miR-145
Acute Myocardial Infarction	Cardiovascular	4	2,65E-04	miR-125b, miR-26a, miR-145, miR-150
Leukemia, Lymphoblastic, Acute, B-Cell	Cáncer (Otros)	3	2,78E-04	miR-223, miR-451a, miR-26a
Ischemic Diseases [unspecific]	Cardiovascular	4	2,78E-04	miR-30b, miR-494, miR-26a
Ectopic Pregnancy	Enf. Ginecológicas No cáncer	4	2,78E-04	miR-223, miR-451a, miR-4286, miR-575
Lupus Nephritis	Sistema nervioso y músculos	4	2,78E-04	miR-638, miR-663a, miR-145, miR-150
Kidney Injury	Sistema urinario	4	3,25E-04	miR-125b, miR-30b, miR-494, miR-150
Diabetes Mellitus	Metabolismo y aparato digestivo	5	3,66E-04	miR-9, miR-30b, miR-145, miR-223, miR-143
Malignant Neoplasms [unspecific]	Neoplasia	3	4,15E-04	miR-638, miR-125b, miR-451a, miR-145, miR-143
Medulloblastoma	Cáncer (Otros)	2	4,42E-04	miR-9, miR-125b
Chronic Kidney Disease	Sistema urinario	4	6,00E-04	miR-125b, miR-30b, miR-150, miR-143

VIII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Gastrointestinal Neoplasms	Neoplasia	6.55E-04	miR-150, miR-9, miR-451a, miR-145, miR-223
Positais	Dermatología y alergia	6.56E-04	miR-125b, miR-223, miR-150, miR-143
Cervical Dysplasia	Neoplasia	6.56E-04	miR-125b, miR-143
Carcinoma, Thyroid, Papillary	Carcinoma	7.21E-04	miR-9, miR-451a, miR-26a
Human Papilloma Virus Infection	Infección	7.47E-04	miR-125b, miR-145, miR-150, miR-143
Pulmonary Hypertension	Cardiovascular	9.75E-04	miR-26a, miR-145, miR-223, miR-143
Carcinoma, Breast, Triple Negative	Carcinoma	1.01E-03	miR-9, miR-145, miR-223, miR-143
Cervical Neoplasms	Neoplasia	1.07E-03	miR-125b, miR-145, miR-143
Stroke	Sistema nervioso y músculos	1.07E-03	miR-30b, miR-26a, miR-145, miR-150
Polycythemia Vera	Cáncer (Otros)	1.31E-03	miR-150, miR-451a, miR-125b
Congenital Heart Diseases	Cardiovascular	1.84E-03	miR-30b, miR-26a, miR-143
Leukemia-Lymphoma, Adult T-Cell	Cáncer (Otros)	2.13E-03	miR-223, miR-145, miR-150
Leukemia-Lymphoma, Precursor B-Cell Lymphoblastic	Cáncer (Otros)	2.13E-03	miR-451a, miR-57b
Alopecia	Dermatología y alergia	2.13E-03	miR-125b, miR-26a
Diabetic Nephropathy	Metabolismo y aparato digestivo	2.30E-03	miR-9, miR-451a
Brain Neoplasms	Neoplasia	2.30E-03	miR-9, miR-451a
Reinoblastoma	Cáncer (Otros)	2.31E-03	miR-125b, miR-26a, miR-494
Aplastic Anemia	Cardiovascular	2.66E-03	miR-223, miR-145, miR-150
Aortic Stenosis	Cardiovascular	2.66E-03	miR-30b, miR-451a, miR-26a
Multiple Sclerosis	Sistema nervioso y músculos	2.74E-03	miR-26a, miR-145, miR-223, miR-494
Tuberculosis	Sistema respiratorio	3.04E-03	miR-125b, miR-30b, miR-223
Colon Neoplasms	Neoplasia	3.19E-03	miR-143, miR-630, miR-125b, miR-145, miR-223
ACTH-Secreting Pituitary Adenoma	Metabolismo y aparato digestivo	3.44E-03	miR-145, miR-150, miR-143
Muscular Dystrophy	Sistema nervioso y músculos	4.41E-03	miR-145, miR-223, miR-320e, miR-150
Carcinoma, Renal Cell	Carcinoma	4.72E-03	miR-630, miR-451a, miR-26a, miR-30b, miR-145, miR-143
Systemic Lupus Erythematosus	Sistema nervioso y músculos	5.25E-03	miR-638, miR-145, miR-223, miR-494, miR-150
Coronary Heart Diseases	Cardiovascular	5.27E-03	miR-125b, miR-451a, miR-145, miR-223
Lymphoma, Burkitts	Cáncer (Otros)	5.49E-03	miR-145, miR-150, miR-143
Tuberculosis	Sistema respiratorio	5.49E-03	miR-223, miR-125b
Liver Cirrhosis	Metabolismo y aparato digestivo	5.69E-03	miR-9, miR-145, miR-494
Pleural Mesothelioma	Neoplasia	5.79E-03	miR-145, miR-223, miR-320e, miR-143
Atrial Fibrillation	Cardiovascular	7.06E-03	miR-30b, miR-451a, miR-26a, miR-150
Sepsis	Infección	7.17E-03	miR-145, miR-223, miR-150, miR-143
Carcinoma, Urothelial	Carcinoma	7.57E-03	miR-663a, miR-630, miR-145
Adenovirus Infection	Infección	8.84E-03	miR-125b, miR-30b, miR-150
Liposarcoma	Cáncer (Otros)	9.43E-03	miR-451a, miR-145
Marek Disease	Infección	9.43E-03	miR-223, miR-150
Alzheimer's Disease	Sistema nervioso y músculos	1.03E-02	miR-9, miR-125b, miR-143,
Acute Kidney Injury	Sistema urinario	1.05E-02	miR-125b, miR-145
Hepatitis B Virus Infection	Infección	1.10E-02	miR-125b, miR-26a, miR-143
Leukemia, Myeloid	Cáncer (Otros)	1.24E-02	miR-150, miR-125b
Carcinoma, Hepatocellular, HBV-Related	Carcinoma	1.24E-02	miR-223, miR-125b
Adenocarcinoma, Pancreatic Ductal	Carcinoma	1.38E-02	miR-125b, miR-145, miR-494, miR-143
Wounds and Injuries (unspecific)	Dermatología y alergia	1.43E-02	miR-145, miR-143
Reflux Esophagitis	Metabolismo y aparato digestivo	1.43E-02	miR-145, miR-143
Preclampsia	Cardiovascular	1.59E-02	miR-125b, miR-26a, miR-223
Prostate Neoplasms	Neoplasia	1.68E-02	miR-125b, miR-145, miR-223, miR-143
Carcinoma, Lung, Small-Cell	Carcinoma	1.80E-02	miR-30b, miR-26a
Allergy	Dermatología y alergia	1.80E-02	miR-223, miR-145, miR-150
Lupus Vulgaris	Dermatología y alergia	2.00E-02	miR-638, miR-663a
Carcinoma, Rectal	Infección	2.02E-02	miR-125b, miR-223, miR-150
Human Immunodeficiency Virus Infection	Carcinoma	2.17E-02	miR-145, miR-150, miR-143
Depression Disorder	Sistema nervioso y músculos	2.24E-02	miR-451a, miR-145, miR-223
Carcinoma, Pancreatic	Carcinoma	2.47E-02	miR-663a, miR-150, miR-30b, miR-145, miR-143, miR-223
Obesity	Metabolismo y aparato digestivo	2.61E-02	miR-26a, miR-223, miR-143
Carcinoma, Endometrial	Carcinoma	2.62E-02	miR-145, miR-143
Reinal Neovascularization	Cardiovascular	2.62E-02	miR-451a, miR-150
Hepatitis C Virus Infection	Infección	2.93E-02	miR-125b, miR-145, miR-638, miR-223
Schizophrenia	Sistema nervioso y músculos	2.96E-02	miR-9, miR-30b
Hepatoblastoma	Cáncer (Otros)	3.03E-02	miR-145, miR-223, miR-150
Squamous Cell Carcinoma, Tongue	Carcinoma	3.30E-02	miR-26a, miR-494
Hemophagocytic Lymphohistiocytosis	Cardiovascular	3.30E-02	miR-223, miR-143
Myelodysplastic Syndromes	Carcinoma	3.65E-02	miR-125b, miR-145
Metabolic Syndrome	Metabolismo y aparato digestivo	4.06E-02	miR-320e, miR-145
Esophageal Neoplasms	Neoplasia	4.06E-02	miR-145, miR-143
Carcinoma, Adrenocortical	Carcinoma	4.27E-02	miR-125b, miR-145

