

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA**

**INSTITUTO DE SEVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO  
E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)**



**DETERMINACION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO  
DE ALTO RIESGO (VPH-AR) ONCOGENICO EN  
MUJERES DE LA PAZ Y SANTA CRUZ EN BOLIVIA**

**Tesis para optar al Grado de Licenciatura en Bioquímica**

**POR: RHICELLY GEORGINA SALINAS SALAS**

**TUTORES: Dra. KATTY TERRAZAS ARANDA  
Dr. JAIME SANCHEZ OZINAGA**

**LA PAZ-BOLIVIA**

**2013**

## DEDICATORIA

A mis padres por todo el amor,  
consejos y ayuda  
incondicional que me  
proporcionan para seguir  
adelante.

## AGRADECIMIENTOS

- ✓ Agradezco en primer lugar a Dios por guiar mi vida.
- ✓ Agradezco a la Dra. Katty Terrazas Aranda por todo su apoyo, comprensión y tiempo durante la realización de esta meta personal.
- ✓ Agradezco al Dr. Jaime Sánchez y al Dr. Osvaldo Lassio por todo el apoyo brindado.
- ✓ Agradezco a la Dra. Sílvia Mancilla por sus consejos y apoyo en este trabajo.
- ✓ A todas y cada una de las mujeres que participaron en esta investigación.
- ✓ Agradezco a mis padres y hermanos por toda su comprensión y por su apoyo en los momentos difíciles y buenos de esta etapa de mi vida.
- ✓ Agradezco al Instituto SELADIS por lograr permitir la realización del presente trabajo.

**RESUMEN.**

En Bolivia, el cáncer cérvico uterino (CCU) representa la primera causa de mortalidad en mujeres, aproximadamente fallecen 27/100.000 mujeres, y la tasa de incidencia es 57/100.000 quiere decir que al día mueren 4 a 5 mujeres, se conoce que el principal responsable del desarrollo de esta patología es la infección persistente del virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) sobre todo los genotipos VPH 16 y 18 a nivel mundial. El propósito del estudio fue determinar la presencia del virus del papiloma humano de alto riesgo VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) mediante captura de híbridos II (hc2) y asociar con los factores de riesgo: edad, consumo de tabaco, anticonceptivos orales, bebidas alcohólicas y características gineco obstétricas, en mujeres asintomáticas que asistieron a su consulta ginecológica en el Hospital El Torno de la Ciudad de Santa Cruz y en el Hospital de la Mujer de la ciudad de La Paz. A cada paciente se informó del estudio y aceptaron participar, posterior se realizó la toma de muestra de la región cervical para captura de híbridos II. Se incluyeron 160 pacientes. Se determinó mayor número de casos positivos a la infección por el VPH-AR en mujeres de la ciudad de La Paz con 17% (n=14/88) en relación a la ciudad de Santa Cruz con 12% (n=9/77). Por otro lado las mujeres de La Paz  $\leq 30$  años de edad registraron mayor reactividad a la infección viral en relación a las mujeres de Santa Cruz. El consumo de tabaco, alcohol y anticonceptivos orales en mujeres de La Paz, probablemente no represente riesgo para la infección del VPH, tal vez otros sean los factores implicado, pero en mujeres de Santa Cruz, el consumo de alcohol si representa un factor de riesgo. También se registró un aumento de casos positivos de infección a mayor número de partos y abortos en mujeres de La Paz. Sin embargo en mujeres de Santa Cruz el aborto no representa un factor de riesgo y la cesárea si favorece a la reducción de infección por el VPH-AR en ambas poblaciones estudiadas. Por último el riesgo de infección por los dos genotipos oncogénicos VPH 16 y 18 en ambas poblaciones de estudio es alto en relación a la infección por un solo genotipo, dando referencia el porqué de la alta incidencia de CCU en nuestro país ya que estos genotipos son responsables del desarrollo de CCU EN UN 70% a nivel mundial y un 100% en países en vías de desarrollo.



## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>MARCO TEORICO</b>	<b>5</b>
2.1	Virus del Papiloma Humano (VPH)	5
2.1.1	Generalidades	5
2.1.2	Estructura del virión	6
2.1.3	Genoma de VPH	6
2.1.3.1	La Región Reguladora	7
2.1.3.2	Zonas de lectura abierta (ORF) con dos regiones	7
	a) La Región Temprana (Early) o de expresión precoz (segunda región)	7
	b) La Región Tardía (Late) o de expresión tardía (tercera región)	9
2.1.3.3	Función de las proteínas virales	9
	a) Proteína E1	9
	b) Proteína E2	9
	c) Proteína E4	9
	d) Proteína L1	10
	e) Proteína L2	10
2.1.3.4	Proteínas virales con potencial oncogénico	10
	a) Proteína E5	10
	b) Proteína E6	11
	c) Proteína E7	11
2.1.3.5	Función de los blancos celulares de las proteínas virales E6 y E7: p53, pRb	12
	Proteína p53	12
	Proteína Rb	13
2.1.4	Clasificación de VPH	14
2.1.4.1	Clasificación del VPH según riesgo oncogénico	14
	a) VPH de Alto Riesgo	14
	b) VPH de Bajo Riesgo	15
2.2	Cáncer Cervical	15
2.2.1	Cáncer	15
2.2.2	Carcinogénesis del CCU	16
2.3	Cuello uterino o cérvix	17
2.3.1	Anatomía cervical	18
2.3.2	Estroma cervical	19
2.3.3	Epitelio cervical	19

2.3.3.1	Exocérvix o Ectocérvix	19
2.3.3.2	Endocérvix	21
2.3.3.3	Unión Escamoso-cilíndrica (UEC) y zona de transformación	24
2.3.3.4	Ectropión	26
2.4	Nomenclatura citopatológica e histopatológica de las lesiones cervicales preneoplásicas y neoplásicas.	27
2.4.1	Terminología actualmente utilizada	28
2.4.1.1	Calidad de la muestra	29
2.4.1.2	Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad	29
2.4.1.3	Terminologías para Células Escamosas Atípicas (ASC)	30
	a) Atipia escamosa de significado indeterminado (ASCUS)	30
	b) Atipia de células escamosas,( ASC-H)	30
	c) Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIE-BG)	31
	d) Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE-AG)	31
	e) Carcinoma escamosa	32
	f)Anomalías epiteliales glandulares	32
2.5	Patogenia de las Infecciones y desarrollo de CCU por el VPH	32
2.5.1	Integración Viral	35
2.5.2	Sitios de integración viral y su efecto	38
2.5.3	Integración y oncoproteínas virales	37
2.5.4	Sitios de integración celular y su efecto	37
2.5.5	Integración y otros factores virales	38
2.6	El Sistema Inmune y La Infección por VPH	38
2.6.1	Respuesta Inmune Humoral	40
2.6.2	Respuesta Inmune Celular	40
2.6.3	Estrategias virales de evasión immune	42
2.7	Mecanismo de Transmisión	42
2.8	Epidemiología de CCU	45
2.8.1	Cáncer de Cuello Uterino y su relación con El VPH	48
2.9	Factores y Cofactores de Riesgo para el desarrollo de CCU	51
2.9.1	Factores del hospedero	51
	a) Elevado número de parejas sexuales	51
	b) Actividad sexual a temprana edad	51
	c) Multiparidad	51
	d) Edad	52
	e) Predisposición genética	52
	f) El consumo de tabaco	52
	g) Consumo de Alcohol	53
2.9.2	Factores medio-ambientales o exógenos	53

	a) Uso Prolongado de anticonceptivos orales	53
	b) Coinfección con otros virus	53
	c) Dieta y el estado nutricional	54
2.9.3	Factores virales relacionados con VPH	54
	a) Genotipo viral	54
	b) Persistencia viral	55
	c) Carga viral	55
2.10	Diagnóstico	56
2.10.1	Antecedentes de Diagnóstico	56
2.10.2	Pruebas Screening de prevención para el desarrollo de CCU	57
2.10.2.1	Método Citológico convencional o test de Papanicolaou	57
2.10.2.1.1	Conductas según reporte de citología	59
2.10.2.1.2	Reporte de resultados	59
2.10.2.2	Colposcopia	60
2.10.2.2.1	Reporte de resultados	61
2.10.2.3	Test de IVA	62
2.10.2.4	Test de Schiller	62
2.10.2.5	Histopatología	62
2.10.2.5.1	Reporte de resultado	63
2.10.3	Pruebas Moleculares	64
2.10.3.1	Ensayo de Captura de Híbridos 2 (hc2) ó test de ADN del VPH-Hc2	65
2.10.3.1.1	Principio del procedimiento	65
2.10.3.1.2	Aplicaciones clínicas del ensayo hc2	67
	a) Tamización primaria	67
	b) Estudios de citologías dudosas (ASC-US)	68
	c) Seguimiento del tratamiento de LIE-AG	69
2.10.3.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	70
2.11	Tratamiento	72
2.12	Prevención/ Profilaxis de la Infección por VPH	72
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACION DEL ESTUDIO</b>	<b>75</b>
<b>4.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>77</b>
4.1	Hipótesis General	77
4.2	Hipótesis Específicas	77
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>78</b>
5.1	Objetivo General	78
5.2	Objetivos Específicos	78
<b>6.</b>	<b>DISEÑO METODOLOGICO</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>80</b>
7.1	Tipo de estudio	80
7.2	Tamaño de muestra	80



7.3	Descripción del ambiente de Investigación	80
7.4	Población en estudio	81
7.4.1	Criterios de Inclusión	81
7.4.2	Criterios de Exclusión	81
7.4.3	Selección de pacientes e informe consensuado	81
7.5	Obtención de la muestra biológica	82
7.6	Detección Molecular de ADN de VPH de alto riesgo	84
	a) Desnaturalización del DNA viral	86
	b) Hibridación molecular	86
	c) Captura de Híbridos ARN:DNA	86
	d) Detección de híbridos ARN:DNA	87
	e) Lectura e Interpretación de los resultados	87
	1. Calibrador o Control Negativo	88
	2. Calibrador o Control Positivo	88
	3. Control de calidad	88
7.7	Análisis Estadístico	89
7.8	Genotipificación de los Virus del Papiloma Humano VPH 16 y VPH 18 mediante el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa	90
	a) Extracción y purificación del genoma en muestras cervicales	90
	b) Cuantificación y determinación de pureza de Ácidos Nucleicos	91
	c) Detección de VPH tipo 16 y 18 por Reacción en Cadena de la Polimerasa	92
	d) Revelado de amplicones	93
	e) Interpretación de los resultados:	93
	f) Análisis Estadístico	94
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>95</b>
8.1	Población en Estudio	95
8.2	Frecuencia de VPH de Alto Riesgo Oncogénico en la Población de Estudio	96
8.3	Diagnostico de VPH-AR en la población en estudio	98
8.4	Correlación del diagnostico de VPH-AR positivo con factores de riesgo socio demográficos de la población en estudio	99
8.4.1	Grupos etáreos	99
8.4.2	Consumo de Tabaco	100
8.4.3	Consumo de Anticonceptivos Orales (AO)	101
8.4.4	Consumo de Bebidas Alcohólicas	102
8.4.5	Estado civil (Grupo 1: Solteras/Divorciadas/Viudas y Grupo 2: Casadas y Concubinas)	104
8.4.6	Características Gineco-obstétricas: Embarazos, partos, abortos y cesáreas	109

8.5	Frecuencia de genotipos VPH 16 y VPH-18 de alto riesgo oncogénico en la población estudiada	105
<b>9.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>109</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>120</b>
10.1	Conclusión General	120
10.2	Conclusiones Específicas	120
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>122</b>
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>123</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1	Estructura del Virus del Papiloma Humano. Virus pequeño de 52-55nm de diámetro, sin envoltura, 72 capsómeros, cápside icosaédrica	6
Figura Nro. 2	Esquema del mapa genómico del VPH 16. Estructura aproximadamente 8.000 pares de bases, destacando una región temprana (E), una región tardía (L), una región larga de control (LCR) y 8 regiones de lectura abierta (ORF)	8
Figura Nro. 3	Ciclo celular	12
Figura Nro. 4	Mecanismos de oncogénesis. Regulación del ciclo celular.	13
Figura Nro. 5	Aparato Reproductor Femenino	18
Figura Nro. 6	Exocérvix o Ectocérvix	20
Figura Nro. 7	Epitelio escamoso estratificado	21
Figura Nro. 8	Estructura Endocérvix	22
Figura Nro. 9	Epitelio y Criptas Cilíndricos	23
Figura Nro. 10	Unión Escamoso-cilíndrica (UEC) y zona de transformación	24
Figura Nro. 11	Zona de Transformación	24
Figura Nro. 12	a) Diagrama esquemático de la zona de transformación normal; b) Diagrama esquemático de la zona de transformación anormal o atípica, con displasia	25
Figura Nro. 13	Ectropión	26
Figura Nro. 14	Ciclo de Replicación Productivo del VPH	33
Figura Nro. 15	Incidencia mundial de cáncer cervical por 100.000 mujeres (todas las edades)	45
Figura Nro. 16	Mortalidad mundial de cáncer cervical por 100.000 mujeres (todas las edades)	46
Figura Nro. 17	Incidencia y Mortalidad por Cáncer Cérvico Uterino	47
Figura Nro. 18	Prevalencia de VPH específica por edad y por región mundial en mujeres con citología normal	50
Figura Nro. 19	Test de Papanicolau	58
Figura Nro. 20	Colposcopia	61
Figura Nro. 21	Biopsia	63
Figura Nro. 22	Captura de híbridos	66
Figura Nro. 23	Algoritmo propuesto para cribado	67
Figura Nro. 24	Guía de historia clínica de Mujeres con Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASC-US).	69

---

Figura Nro. 25	Medio de transporte y cepillo citológico	82
Figura Nro. 26	Inicio del proceso de toma de muestra	83
Figura Nro. 27	Lugar de Toma de muestra. Canal Endocervical	83
Figura Nro. 28	Finalización del proceso de Toma de Muestra	84
Figura Nro. 29	Preservación de la Muestra	84
Figura Nro. 30	Esquema de la metodología del ensayo molecular Captura de Híbridos	85
Figura Nro. 31	Detección molecular de VPH oncogénicos de alto riesgo VPH 16 y 18. CN= Control Negativo; CP= Control Positivo; M1= Muestra 1; M2= Muestra 2; pb= Pares de bases	105
Figura Nro. 32	Resultados de la detección molecular de VPH-16 y VPH-18 en las muestras en estudio de la ciudad de La Paz. CN= Control Negativo; CP= Control Positivo; M1= Muestra 1; M2= Muestra 2; pb= Pares de bases	106
Figura Nro. 33	Resultados de la detección molecular de VPH-16 y VPH-18 de las muestras en estudio de la ciudad de Santa Cruz. CN= Control Negativo; CP= Control Positivo; M1= Muestra 1; M2= Muestra 2; pb= Pares de bases	106

---

## INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico Nro. 1	Frecuencia de casos positivos de infección por virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo (VPH-AR) de la ciudad de La Paz y Santa Cruz	98
Gráfico Nro. 2	Presencia de VPH-AR en Relación a la edad de la población en estudio	100
Gráfico Nro. 3	Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección de ADN/VPH-AR según el consumo de tabaco en las pacientes de estudio	101
Gráfico Nro. 4	Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección del ADN/VPH-AR según el consumo de anticonceptivos orales de las pacientes en estudio	102
Gráfico Nro. 5	Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección de ADN/VPH-AR según el consumo de bebidas alcohólicas de las pacientes en estudio	103
Gráfico Nro. 6	Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección de ADN/VPH-AR según características Gineco-obstétricas de la población en estudio de la ciudad de La Paz	104
Gráfico Nro. 7	Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección de ADN/VPH-AR según características Gineco-obstétricas de la población en estudio de la ciudad de Santa Cruz	104
Gráfico Nro. 8	Frecuencia porcentual de casos positivos a la detección de infección por VPH-16; VPH 18 y Co-infecciones VPH-16/VPH-18 de las pacientes en estudio	107

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro Nro. 1	Control y Rangos de Calidad	89
Cuadro Nro. 2	Calculo del valor de Corte	89
Cuadro Nro. 3	Amplificación de ADN de VPH16/18	92
Cuadro Nro. 4	Interpretación de Resultados	93
Cuadro Nro. 5	Características Socio Demográficas y Ginecológicas de la Población en Estudio	95
Cuadro Nro. 6	Muestras positivas por ensayo de la captura de híbridos para VPH de alto riesgo, según lecturas por quimioluminiscencia en unidades de luz relativas (URL)	97

**ABREVIATURAS**

<b>AECID</b>	Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo
<b>AO</b>	Anticonceptivos Orales
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ASC</b>	Células Escamosas Atípicas
<b>ASCCP</b>	Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical
<b>ASC-H</b>	Células Escamosas Atípicas sugestivas de Lesión Intraepitelial de Alto Grado
<b>ASC-US</b>	Células escamosas atípicas de significado Indeterminado
<b>ATP</b>	Adenosín Trifosfato
<b>CCU</b>	Cancer Cérvico Uterino
<b>CCV</b>	Citología Cérvico Vaginal
<b>CD</b>	Dominios Conservados
<b>Cdks</b>	Kinasas Dependientes de Ciclinas
<b>CFS<sub>s</sub></b>	Common Fragile Sites, regiones altamente susceptibles a la ruptura
<b>CIS</b>	Carcinoma in Situ.
<b>CL</b>	Células de Langerhans
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CMH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>CN</b>	Control Negativo
<b>COV</b>	Valor de corte

---

<b>CP</b>	Control Positivo
<b>CPA</b>	Células Presentadoras de Antígenos
<b>CU</b>	Cuello Uterino
<b>CV</b>	Coeficiente de Variación
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina 5'-trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina 5'-trifosfato
<b>DHCS V.2</b>	Sistema Digene de Captura de Híbridos
<b>DIU</b>	Dispositivo Intrauterino
<b>DML</b>	Luminómetro de Microplacas Digene
<b>DNA</b>	Acido Desoxirribonucleiico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato
<b>E1</b>	Early (región temprana)
<b>ECFR</b>	Receptor del Factor de Crecimiento epidermal.
<b>EDTA</b>	Acido Etilén Diamino Tetra Acético
<b>EE.UU</b>	Estados Unidos de América.
<b>FCFB</b>	Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration: Agencia de Alimentos y Medicamentos o Agencia de Drogas y Alimentos).
<b>FIBELx</b>	Hospital General Universitario de Elche
<b>Hc2</b>	Captura de Híbridos de segunda generación
<b>HHV-6</b>	Herpesvirus Humano 6
<b>HSV</b>	Virus Herpes simple



---

<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer.
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>INLASA</b>	Instituto Nacional de Laboratorios en Salud.
<b>IRF</b>	Factor Regulador de Interferón
<b>IVA</b>	Inspección Visual con Acido Acético
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>Kpb</b>	Kilo pares de bases
<b>L</b>	Late (región tardía)
<b>LCR</b>	región larga de control
<b>LIE</b>	Lesión Intraepitelial Escamosa
<b>LIEBG</b>	Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado
<b>LTC</b>	Linfocitos T Citotóxicos
<b>LTh</b>	Linfocitos T colaboradores “helper”
<b>M</b>	muestra
<b>NIC/CIN</b>	Neoplasia Intraepitelial Cervical
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de Salud
<b>ORF</b>	zonas de Lectura abierta
<b>ORF<sub>s</sub></b>	(Open Reading Frame) Marco de Lectura Abierta
<b>p53</b>	proteína 53
<b>Pb</b>	Pares de Bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa

<b>PRb</b>	proteína Retinoblastoma
<b>QC1-LR</b>	Control de Calidad para VPH de Bajo Riesgo
<b>QC2-HR</b>	Control de Calidad para VPH de Alto Riesgo
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico
<b>SELADIS</b>	Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud.
<b>TBE</b>	Tampón (Tris, Borato y EDTA)
<b>TCR</b>	Receptor de Células T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante beta
<b>TLR</b>	Toll-like-Receptor
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UEC</b>	Unión Escamoso-cilíndrica
<b>UMSA</b>	Universidad Mayor de San Andrés
<b>URL</b>	Unidades Relativas de Luz
<b>URR</b>	(upper regulatory región) Unidad reguladora no codificada
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano
<b>VPH-AR</b>	Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo
<b>VPH-BR</b>	Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo
<b>VPN</b>	Valor Predictivo Negativo

## 1. INTRODUCCION

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es uno de los agentes de transmisión sexual más frecuentes en el mundo, afecta a más del 85% de la población tanto en hombres y mujeres sexualmente activos <sup>1</sup>. En Bolivia la infección por VPH es de gran importancia en la salud pública de nuestra población.

Existen más de 100 genotipos del VPH definidos completamente, y 40 de estos han sido identificados en el tracto genital <sup>(11, 45)</sup>. Los VPH que infectan el tracto genital se subdividen de acuerdo a su potencial oncogénico en grupos de alto riesgo y bajo riesgo. Solo los tipos VPH de Alto Riesgo (VPH-AR), son asociados al desarrollo de cáncer cérvico uterino (CCU), y en menor frecuencia a cáncer de vulva y vagina en mujeres, cáncer de pene en hombres y cáncer anal y oral en ambos; esto debido a su gran capacidad transformante y a su frecuente presencia en lesiones neoplásicas avanzadas <sup>(40, 52, 53, 45)</sup>. Los virus VPH de Bajo Riesgo (VPH-BR), se encuentran principalmente en lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG), producen lesiones benignas anogenitales y papilomatosis laríngea o atipias que en la mayoría de los casos se curan espontáneamente sin ocasionar problemas en el tejido que infectan. Los VPH 16 y 18, son los VPH-AR más frecuentes, mientras que los VPH 6 y 11 son los virus de Bajo Riesgo más frecuentes.

El CCU, es el segundo más frecuente en la población femenina a nivel de los países en desarrollo <sup>(14, 15)</sup> y el primero más frecuente a Nivel Nacional <sup>81</sup>. En el mundo en el 2008 se estimó que anualmente ocurrieron más de 500.000 casos nuevos y cerca de 280.000 defunciones <sup>(15, 16, 17)</sup> por lo que se constituye en un problema de salud pública, en diversos países en desarrollo, especialmente en África y América Latina. El CCU está altamente asociado con los VPH-AR 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, ocupando el primer lugar en incidencia <sup>(1, 2, 3, 17)</sup>. De estos, el VPH 16 es el más frecuente en el mundo, excepto en Argelia e Indonesia donde el VPH 18 es el más frecuente <sup>(14, 15, 16, 17, 18)</sup>. El VPH 45 tiene alta incidencia en África Occidental y los tipos 33, 39 y 59 se encuentran con mayor frecuencia en Centro América y Sudamérica <sup>18</sup>.

En Bolivia los genotipos encontrados con mayor frecuencia son los VPH 16, 18, 26, 31, 39, 51, 52 y 59<sup>(114, 115)</sup>.

La prevalencia de la infección por VPH está relacionada con el comportamiento sexual de la comunidad. Es más frecuente entre los 15 – 25 años de edad, al inicio de relaciones sexuales. La prevalencia va disminuyendo entre los 25 – 40 años de edad, ya que la mayoría de las infecciones son eliminadas por el sistema inmunitario<sup>19</sup>.

Según reportes del Ministerio de Salud y la OMS/OPS, Bolivia tiene una de las tasas de incidencia y mortalidad más altas del mundo. De cada 100.000 mujeres, 56 presentan cáncer de útero y 4 - 5 mujeres mueren al día por dicha causa<sup>(78, 81)</sup>.

El CCU, al igual que muchos otros cánceres, se desarrolla como resultado de múltiples factores, incluyendo condiciones genéticas e inmunológicas; influenciadas por otros como la interacción entre el micro y medio ambiente y la célula. Estos pueden facilitar la promoción de los procesos de transformación neoplásica. Entre estos, la infección persistente con el VPH-AR, es considerada, como el principal factor de riesgo de este tipo de cáncer, pero no la única suficiente. Otros factores adicionales que actúan conjuntamente con el VPH incluyen el comportamiento sociocultural, entre ellos la paridad, uso prolongado de anticonceptivos orales, consumo de tabaco, la promiscuidad, otras enfermedades/infecciones de transmisión sexual. Así mismo, la condición biológica del huésped, estados de inmunodeficiencia y la desnutrición se han asociado en grado variable con el desarrollo de CCU<sup>6</sup>.

Cuando un virus infecta una célula, el genoma del VPH se encuentra en una configuración episomal intracelular<sup>10</sup>. Sin embargo, uno de los procesos que parece estar más involucrado en el origen de las células malignas es el evento de integración del genoma viral al del huésped, proceso actualmente considerado como una alteración genética importante que caracteriza las lesiones malignas y que se relaciona con la inactivación de genes celulares del huésped. Las proteínas virales E6 y E7, se unen a dos proteínas celulares: p53 y pRb alterando en importantes puntos de control del ciclo celular y de esta

manera, favorecen la progresión de lesiones preinvasivas. Por tanto, considerando el evento de integración del genoma viral al genoma del huésped ha sido propuesto como un marcador potencial de la progresión de neoplasias cervicales<sup>12</sup>.

En el mundo, el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad aborda el aspecto virológico e inmunológico. La prevención del cáncer cervical se basa fundamentalmente en programas de tamizaje citológico (inspección visual con ácido acético, Papanicolaou, colposcopia y biopsia)<sup>(4,7)</sup> y tratamiento de lesiones. Sin embargo los genotipos de VPH-AR están etiológicamente ligados con el cáncer cervical e introdujo nuevas perspectivas en el campo del diagnóstico que incluyen el uso de pruebas moleculares (hibridación in situ, amplificación de señal y Reacción en Cadena de la Polimerasa). La detección precoz del genoma de VPH y el desarrollo de vacunas profilácticas ofrece importantes alternativas de control y prevención del CCU<sup>(7,11)</sup>.

La infección por VPH se identifica de forma directa, mediante la detección del genoma del virus. El procedimiento aprobado Internacionalmente por *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos (FDA) y la Unión Europea para la detección molecular del DNA viral, es la Hibridación directa ya sea en soportes líquidos (captura de híbridos, que incluye sondas de alto riesgo para la detección de 13 tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). o soportes sólidos (hibridación in situ). El método de hibridación en soporte líquido, tiene una sensibilidad clínica muy alta (1pg de DNA de VPH-16 o VPH-18 por ml de muestra, el mismo que equivale a 100.000 copias por ml de muestra)<sup>11</sup>. Esta prueba se aprobó para ser utilizada conjuntamente con la prueba de Papanicolaou, y debería ser realizada de manera complementaria a una revisión ginecológica para aumentar la sensibilidad de una citología para identificar de modo precoz y oportuno la presencia del VPH. Así mismo métodos moleculares basados en la amplificación del genoma (PCR) también son utilizados con oligonucleótidos sintéticos específicos diseñados principalmente para la región L1, del genoma del VPH<sup>(9,19)</sup>.

En nuestro país, la estrategia de diagnóstico y prevención del CCU están únicamente basados en la aplicación de estudios citológicos y se quiere incluir pruebas moleculares

para detectar de modo oportuno y reducir la incidencia de este virus. El VPH se ve reflejado en la alta prevalencia de CCU en nuestra población que es coadyuvado con el proyecto “Cáncer de Cuello Uterino en mujeres Bolivianas: Estudio de Prevalencia de tipos oncogénicos de VPH. Cooperación (FIBEX y AECID – UMSA- FCFB)” con financiamiento de la Agencia Española de Cooperación Integral para el desarrollo (AECID) y la Universidad de El Che, España.

En el presente trabajo planteamos la determinación del Virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico en mujeres que asisten a sus consultas ginecológicas del Hospital de la Mujer, en la Ciudad de La Paz y del Hospital El Torno en la ciudad de Santa Cruz. La determinación del VPH-AR se realizará con la aplicación de tecnología de última generación en el diagnóstico de VPH a través del ensayo de *captura Híbrida* (hc2). Esta tecnología provee menor contaminación cruzada debido a que amplifica la señal de detección, en lugar de amplificación del genoma viral, lo que permite un resultado con validez clínica. El uso de este procedimiento avalado por múltiples estudios internacionales que incluyen a cientos de miles de mujeres en todo el mundo y en la actualidad es la única prueba con la aprobación FDA de EE.UU y la UE <sup>(20, 21)</sup>. Adicionalmente, para determinar la importancia de VPH-AR 16 y 18 en nuestra población, las muestras positivas por hibridación molecular serán tipificadas por PCR específicos. La presencia de genotipos de VPH-AR en la población, será correlacionada con hábitos Socio Culturales que la literatura establece como factores de riesgo de CCU.

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)**

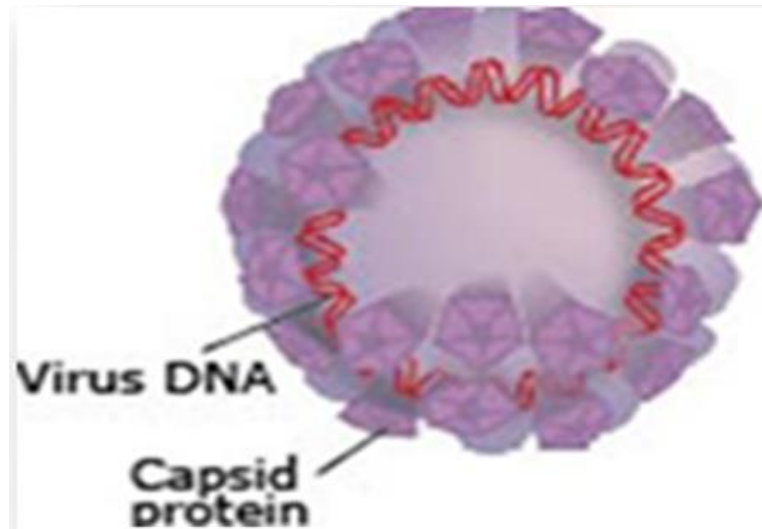
#### **2.1.1 Generalidades**

Desde la década del 70 se ha considerado directamente al VPH como el agente causal del CCU, considerado en la actualidad el factor de mayor riesgo para el desarrollo de lesiones preinvasivas o invasivas de cérvix y otros en región genital femenina y masculina, así como también en región anal, debido al conocimiento de su potencial oncogénico y la asociación con tumores humanos. Este virus despierta una creciente importancia en Salud Pública y en la vigilancia epidemiológica, por cuanto ha aumentado su frecuencia, sobre todo en la población sexualmente activa con inicio temprano de relaciones sexuales <sup>(1, 8, 11, 19)</sup>.

Taxonómicamente el VPH pertenece a la familia Papovaviridae, incluida en el género Papilomavirus, se caracteriza por ser causante de lesiones mucosas y cutáneas en humanos y primates, infecta a la mayoría de los mamíferos y aves, existiendo una posible excepción con ratones de laboratorio <sup>(8, 15, 16, 22, 23)</sup>.

Los VPH que tienen afinidad por las células de la mucosa anogenital, son agentes de transmisión sexual más comunes en hombres y mujeres a nivel mundial. Su persistencia es considerada como el principal factor de riesgo para el desarrollo del CCU. No existen datos precisos de la prevalencia o incidencia debido a la existencia de individuos infectados que no presentan signos ni síntomas de la infección por VPH <sup>16</sup>.

### 2.1.2 Estructura del virión



**Figura Nro. 1. Estructura del Virus del Papiloma Humano.** <sup>23</sup>

Son virus pequeños y sin envoltura, con un diámetro de 52-55 nm la cápside viral es icosaédrica, organizada por 72 capsómeros, (60 hexámeros y 12 pentámeros). Cada uno de estos capsómeros está constituido por dos proteínas estructurales codificadas por el virus, que se encuentran unidas por puentes de disulfuro, generando estabilidad de la cápside, La proteína mayor L1, responsable de la adherencia específica del virus a la célula, representa el 80% del total de la Cápside y la proteína menor L2, en menor proporción que L1 y es contra estas proteínas que se dirige la respuesta inmune del huésped <sup>(3, 15, 23, 24, 25, 27, 40)</sup>.

### 2.1.3 Genoma de VPH

El genoma de VPH es de doble cadena circular de DNA, aproximadamente 8Kpb, organizada con 8 a 10 secuencias de lectura abierta (ORFs: Open Reading frames) la cual es semejante para todos los VPH, asociado a proteínas tipo histonas. Los genes que



codifican las proteínas, residen exclusivamente en una de las dos cadenas de DNA y se constituyen en ORFs<sup>(14, 16, 19, 26, 27)</sup>.

El genoma de VPH no codifica las enzimas necesarias para la replicación del DNA y la transcripción viral; por ello, tiene que utilizar el mecanismo celular para replicarse, mediante sus tres proteínas de transformación: E5, E6 y E7<sup>(14, 32)</sup>. A efectos funcionales puede dividirse el genoma en tres regiones:

### **2.1.3.1 La Región Reguladora**

Denominada unidad reguladora superior no codificada, URR (upper regulatory región) o también unidad larga de control (LCR), que no tiene potencial para codificar proteínas, con una longitud de 0,4-1 (Kb), encargada de funciones reguladoras del genoma, del control de la transcripción del DNA viral a través de la transcripción de los marcos abiertos de lectura, a su vez esta región está comprendida por secuencias promotoras, potenciadoras (enhancers) y silenciadoras<sup>(3, 16, 19, 26, 27)</sup>.

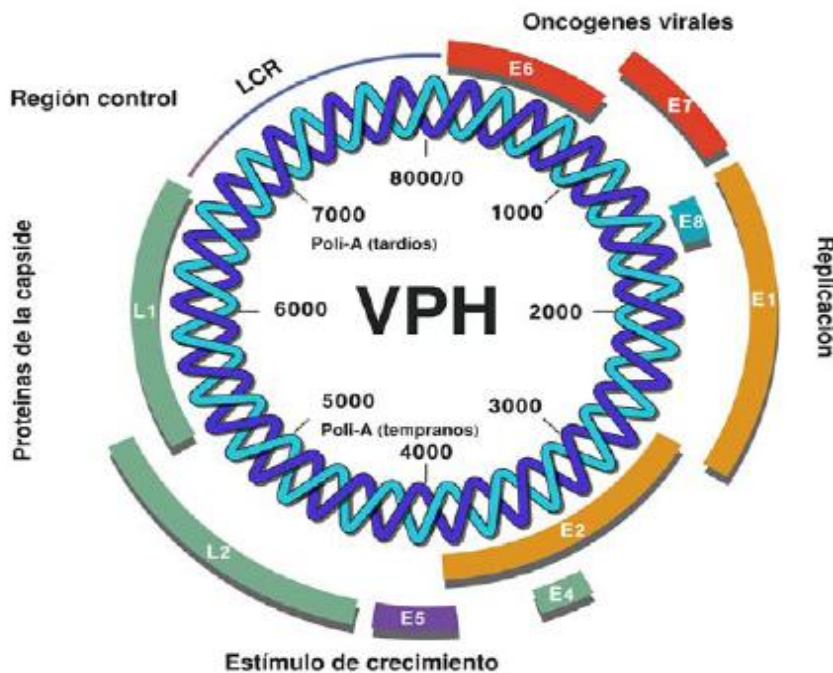
### **2.1.3.2 Zonas de lectura abierta (ORF) con dos regiones**

#### **a) La Región Temprana (Early) o de expresión precoz (segunda región)**

Conformadas por varias secuencias E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que se transcribe al inicio del ciclo vital del virus y codifican las proteínas encargadas de la replicación viral, transformación celular, y de la persistencia del DNA integrado en las células a las que infecta. Las proteínas más relevantes que participan en la replicación viral son E1, E2. Las que participan en el control transcripcional de la expresión genética E2, regulación del ciclo celular, participan en los procesos de transformación celular E6, E7, y evasión de la respuesta inmune E5<sup>(3, 14, 16, 19, 26)</sup>. (Fig. 2)

Los productos codificados por los genes E6 y E7, son de interés, ya que estos juegan un importante papel en los mecanismos de transformación celular, depende de estas proteínas el potencial oncogénico. Estas proteínas codificadas por estos genes virales se unen a proteínas celulares supresores de tumores p53 y pRb, respectivamente, causando inactivación de su función. Esta inactivación explicaría, en parte, el rol que desempeñaría los VPH en los procesos oncogénicos <sup>(14, 16,19, 26, 27)</sup>.

Estos genes se expresan en las células no diferenciadas de la mucosa, a través de un promotor (P<sub>E</sub>), de esta manera dará lugar a las proteínas virales tempranas no estructurales: E1, E2, E4, E5, E6 y E7, dicha expresión de estas proteínas, está regulada por factores celulares específicos y a su vez por las proteínas virales <sup>(14, 16,19, 26, 27)</sup>.



**Figura Nro. 2.** Esquema del mapa genómico del VPH 16. Estructura aproximadamente 8.000 pares de bases, destacando una región temprana (E), una región tardía (L), una región larga de control (LCR) y 8 regiones de lectura abierta (ORF) <sup>115</sup>

**b) La Región Tardía (Late) o de expresión tardía (tercera región)**

Contiene los ORFs de las proteínas L1 y L2, que constituyen la cápside viral<sup>11</sup>. Los genes de expresión tardía se expresan en la capa escamosa madura del epitelio cervical a partir de un promotor tardío (P<sub>L</sub>) para sintetizar las proteínas estructurales de la cápside viral<sup>(14, 16, 19, 26, 27)</sup>.

**2.1.3.3 Función de las proteínas virales****a) Proteína E1**

Proteína multimérica, con secuencia altamente conservada entre los diferentes genotipos VPH. Controla la replicación episomal del DNA, mientras que ésta se encuentre completa y funcional se produce una replicación normal de la célula huésped, evitando la integración del DNA viral al genoma celular<sup>(14, 24, 31,33)</sup>.

**b) Proteína E2**

Proteína dimérica, que posee la capacidad de reprimir o activar los promotores virales. E2 proteína reguladora de la transcripción y de la replicación vírica.<sup>(14, 32, 33, 58)</sup>.

**c) Proteína E4**

Se expresa sólo en células ya diferenciadas, se cree que esta proteína induce los cambios coilocíticos en células epiteliales, la ruptura de redes citoqueratina, lo que permite la liberación de los viriones y también participa en el detenimiento del avance del ciclo celular en fase G2 del ciclo celular<sup>(14, 24,32, 33)</sup>.

**d) Proteína L1**

Proteína mayor de la cápside, 57 kDa, permite la adherencia específica a la célula huésped (14, 31, 32).

**e) Proteína L2**

Es una proteína de 78 kDa, es el componente menor de la cápside viral. La formación de una partícula viral requiere el ensamblaje de las proteínas L1 y L2 para formar una estructura proteica cuya función es proteger el genoma viral (14, 24, 31, 58).

**2.1.3.4 Proteínas virales con potencial oncogénico****a) Proteína E5**

Proteína pequeña que se une a la membrana intracelular, específicamente a la ATPasa vacuolar (v-ATPasa) e inhibe la acidificación endosomal en los queratinocitos humanos. Esto impide la degradación del receptor del factor de crecimiento epidermal (ECFR), potenciando su reciclamiento a la superficie de la célula, al amplificar la señal del factor de crecimiento de la célula. La vacuola eucariota es un organelo central que interviene en numerosos procesos celulares como: la internalización ligando-receptor, transporte de proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico, en la homeostasis de iones. La actividad de la ATPasa es acidificar el lumen vacuolar, esto es necesario para que se lleven a cabo de manera adecuada los procesos que tienen lugar en este organelo celular. E5 inhibe el procesamiento de péptidos antigénicos, alterando la presentación de antígenos a las células del sistema inmune. La alteración de las actividades de la ATPasa por la proteína E5 del VPH puede tener efectos importantes sobre el crecimiento, la respuesta a señales extracelulares, la producción y el procesamiento de proteínas recién sintetizadas (3, 24, 32, 33, 58)

**b) Proteína E6**

E6 es una proteína de 151 aminoácidos que realiza múltiples acciones: interfiere en varias vías celulares, crean un ambiente favorable para la replicación viral y neutralizan los sistemas de control del ciclo celular. E6 bloquea la apoptosis dependiente de p53 y promueve su degradación. La E6 inactiva a p53 al integrarse al genoma. La célula no detiene su ciclo ante daño sufrido en el DNA, tampoco se induce la apoptosis para eliminar a las células alteradas, lo que genera inestabilidad genética y permite acumular alteraciones en diversos genes. E6 inhibe la diferenciación y la senescencia celular al estimular la inmortalización<sup>(2, 3, 30, 31, 33)</sup>. E6 también interfiere con el sistema inmune, debido a la unión con el IRF-3 (induce la progresión apoptosis) evitando su activación y capacidad para inducir la muerte celular. Estas interacciones de E6 con las diferentes proteínas del sistema inmune, dan como resultado una inhibición de la apoptosis y una persistencia del virus en la célula huésped, factor importante para el desarrollo de CCU<sup>(34, 37, 55)</sup>.

**c) Proteína E7**

Es una Proteína nuclear de 18 kDa conformada por tres dominios CD1, CD2 y CD3 por los que interactúan con una variedad de proteínas celulares, incluyendo al producto del gen supresor de tumor del retinoblastoma (pRb), que es el principal regulador negativo del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S. El extremo amino de E7 interactúa con sus proteínas blanco, muchas de las cuales son importantes reguladores del ciclo celular, E7 se une a la proteína Rb, (regula negativamente la progresión del ciclo celular). La interacción de E7 con Rb provoca la liberación de los factores de transcripción necesarios para la progresión del ciclo celular a la vez asociado a la activación de los complejos quinasas dependientes de ciclinas (cdks/ciclinas). Estas interacciones son las que desregulan el ciclo celular, potencializan la proliferación, la inmortalización y finalmente provocan la transformación de la célula<sup>(2,3)</sup>. Varios estudios también reportaron la capacidad de E7 de inhibir la apoptosis en queratinocitos. Uno de los mecanismos más

conocidos es el que se relaciona con su capacidad para producir una desregulación de E2F, a través de su interacción con pRb <sup>(33, 37, 55)</sup>

### 2.1.3.5 Función de los blancos celulares de las proteínas virales p53, pRb (Fig.4)

Según bibliografía las proteínas virales E6 y E7 tienen varios blancos celulares, pero los más conocidos son las proteínas supresoras de tumores p53 y Rb respectivamente.

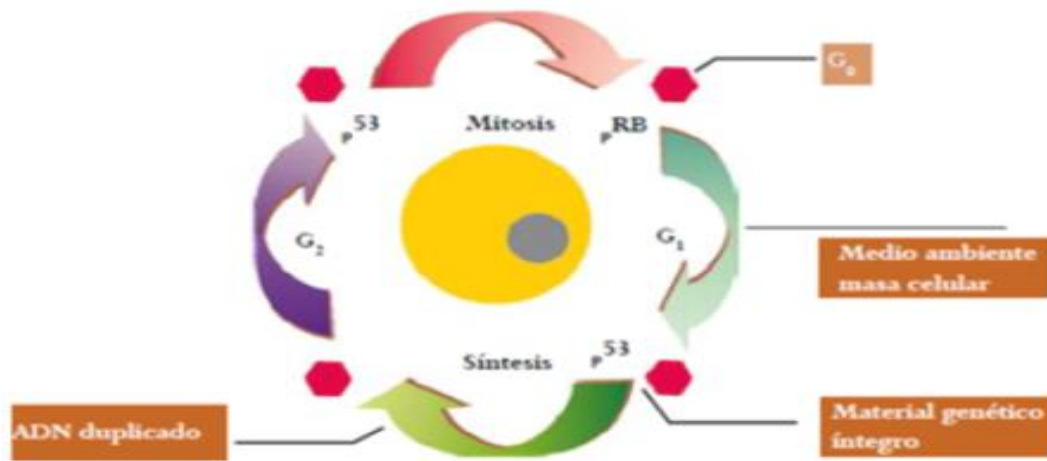


Figura Nro. 3. Ciclo celular <sup>2</sup>

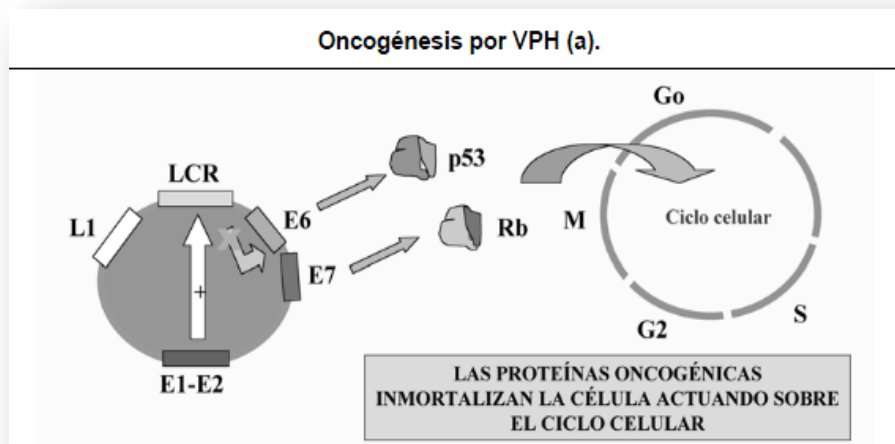
- **Proteína p53**

Denominada el “guardián del genoma” su función consiste en controlar la progresión del ciclo celular monitoreando la integridad del DNA. La concentración de p53 en la célula es normalmente baja pero cuando la célula es sometida a estrés o el DNA sufre daño, p53 aumenta su concentración en la célula, al disminuir su tasa de degradación. Una vez detectado el daño, p53 actúa como factor de transcripción induciendo la expresión de genes necesarios para reparar el daño, así como proteínas encargadas de generar un paro en la progresión del ciclo celular como p27 y p21. Estas proteínas se encargan de regular negativamente el ciclo celular al bloquear a los complejos ciclinas/cdks. El paro en el ciclo

celular tiene como finalidad dar tiempo a la célula de que el daño sea reparado, pero si este daño no es susceptible de reparación, p53 induce la apoptosis. De esta forma p53 impide que se acumulen mutaciones que podrían llevar a la transformación celular <sup>(3, 14, 33, 35, 57)</sup>.

- **Proteína pRb**

Esta proteína cumple un papel importante en el control de la división y la diferenciación celular. Esta proteína secuestra factores de transcripción como E2F y DP1 los cuales son necesarios para la progresión del ciclo celular y solo se regula por fosforilación. Así la proteína (pRb hipofosforilada) se encuentra activa secuestrando a los factores de transcripción E2F y DP1 que al no estar disponibles, generan un paro en el ciclo celular. Cuando la célula recibe señales mitogénicas, el complejo cdk/ciclinas se encarga de fosforilar a la proteína Rb, (pRb hiperfosforilada) inactivándola, liberando así a los factores de transcripción necesarios para que el ciclo celular continúe <sup>(3, 14, 30, 33, 5)</sup>.



**Figura Nro. 4. Mecanismos de oncogénesis. Regulación del ciclo celular.**<sup>68</sup>

#### 2.1.4 Clasificación de VPH

Los Papilomavirus son una familia extensa de virus que causan varias enfermedades proliferativas. Han sido clasificados en base a la especie que infectan; su tropismo celular, la homología en su secuencia nucleotídica del gen L1 (la región más conservada del genoma viral) y en base a su potencial oncogénico, siendo ésta la más importante característica desde al punto de vista clínico <sup>(3, 27, 36)</sup>.

#### **2.1.4.1 Clasificación del VPH según riesgo oncogénico**

A la fecha se ha descrito más de 100 genotipos virales de los cuales 40 se han aislado de lesiones intraepiteliales del tracto genital inferior y entre 15 a 20, de carcinomas. De acuerdo a estudios realizados, se vio que los genotipos virales cuyas proteínas E6 y E7 tienen baja afinidad por sus blancos celulares tienen bajo poder oncogénico, por esto se agruparon como VPH de bajo riesgo (VPH-BR) y los genotipos virales cuyas oncoproteínas tienen gran afinidad por sus blancos, son potencialmente oncogénicos, denominándolos VPH de alto riesgo (VPH-AR) <sup>(15, 18, 30, 31)</sup>. De acuerdo con esto, La organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) <sup>24</sup>, los clasifica en virus de bajo riesgo y alto riesgo oncogénico.

##### **a) VPH de Alto Riesgo**

En este grupo, los VPH más importantes y frecuentes son los genotipos 16 y 18, siendo responsables de más del 70% de los cánceres cervicales. Este grupo de alto riesgo causa la mayoría de cánceres invasivos de vagina y ano (70-90%), un 40% de los cánceres de vulva y pene, un 35% de los cánceres de orofaringe y un 25% de los cánceres de la cavidad oral<sup>12</sup>. Siendo estos VPH-AR : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 . Los genotipos 26, 53 y 66 deben considerarse probables carcinógenos <sup>(11,37, 38, 39, 40)</sup>

##### **b) VPH de Bajo Riesgo**



Estos pueden causar cambios benignos en células cervicouterinas, son responsables de las verrugas genitales o condilomas acuminados o crestas de gallo, papilomas laríngeos en niños y jóvenes, pero rara vez, en asociación con cánceres invasivos. Se conoce a los VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 69, 70, 71, 72, 81. De estos, los más frecuentes a nivel mundial son VPH 6 y 11 que se encuentran con mayor frecuencia en las verrugas genitales (11, 18, 38, 39, 41).

## **2.2 Cáncer Cervical**

### **2.2.1 Cáncer**

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento y una propagación descontrolada de células anormales en el cuerpo, el resultado es, un clon de células que termina formando una masa denominada tumor, estos pueden ser benignos o malignos. La formación de este tumor obedece a cambios en el material genético (DNA) de células somáticas. Entre estos cambios, la alteración de genes preexistentes a oncogenes es el más importante. Los productos de los oncogenes son los causantes del crecimiento celular inapropiado, por lo que queda claro que la alteración del DNA parece ser la clave de la inducción del Cáncer<sup>(30, 42, 43)</sup>. Debido a que la acumulación de las células tumorales ocurre lentamente, la detección clínica de un tumor ocurre generalmente después de un periodo de latencia de varios meses o años. El cáncer se desarrolla como un proceso de etapas múltiples, el cual requiere de la presencia de varias alteraciones genéticas que bloquean tanto los mecanismos normales de control de proliferación celular, como de la apoptosis. Por lo tanto el desarrollo del cáncer constituye un proceso multifactorial.

Entre los factores que pueden desencadenar un proceso tumoral se encuentran los biológicos (virus, hormonas), compuestos cancerígenos (hidrocarburos aromáticos del tabaco, nitrosaminas, amidas, asbestos, etc.), físicos (radiación gamma, UV, etc.) y en general cualquier agente que dañe el DNA y por lo tanto, altere los genes. El hecho de que el cáncer se considere como una enfermedad multigénica se fundamenta en varias

observaciones que incluyen la predisposición hereditaria, la alta frecuencia de alteraciones cromosómicas en las células cancerosas, la relación entre el potencial mutagénico de algunas sustancias y su carcinogenicidad y por último, la alta frecuencia de alteraciones en genes involucrados en el control de la proliferación celular. Los genes relacionados con el cáncer frecuentemente son aquellos involucrados en el control del ciclo celular: los oncogenes y los genes supresores de tumor <sup>(30, 43, 44)</sup>.

El CCU empieza en las células basales del epitelio del cuello uterino. Diversos estudios y observaciones realizados indican que la etiología del CCU es multifactorial.

### **2.2.2 Carcinogénesis del CCU**

La primera etapa de la carcinogénesis, corresponde a la “fase de inducción” que se caracteriza por la **iniciación** debida a factores externos (químicos, virus, etc.) y/o factores internos (hormonas, condición inmunológica y mutación genética), que producen alteraciones, generalmente irreversibles, en las células del organismo. La segunda etapa: **promoción**, fenómeno reversible, consecuente con la iniciación del proceso neoplásico complementado por la exposición crónica a factores promotores y podría presentarse como consecuencia de la expresión genética. La fase de **progresión** de la enfermedad, que se caracteriza por el crecimiento y proliferación descontrolada de la masa celular y eventual infiltración de las estructuras donde asienta el tumor y se produce diseminación metastásica del mismo <sup>52</sup>.

El CCU, en países en desarrollo es un problema de la salud pública, ya que en estos países ocurre un 83% del medio millón de casos de CCU que se diagnostica anualmente en el mundo <sup>(1, 2, 30, 45)</sup>.

El CCU es una enfermedad neoplásica maligna que se inicia con cambios intraepiteliales en el cuello uterino y cuya progresión natural lleva a la muerte. Aún cuando el

conocimiento de la enfermedad es incompleta, los estudios realizados han mostrado que la mayoría de estos tumores tienen una progresión gradual y sus lesiones precursoras pueden mantenerse en fase reversible o in situ por varios años en la mayoría de las pacientes. Se encontró una evolución progresiva más rápida en mujeres de mayor edad que en las más jóvenes. El cáncer cervical es el estadio final de un conjunto de alteraciones epiteliales, progresivamente cada vez más atípicas, en las que un estadio da lugar al siguiente de manera imperceptible <sup>(30, 46, 54)</sup>.

La etiología del CCU se asocia a varios factores de riesgo, al igual que muchos otros cánceres se desarrolla como resultado de múltiples alteraciones genéticas, epigénéticas e inmunológicas; adicionalmente otros factores como la interacción entre medio ambiente y célula pueden facilitar la promoción de los procesos de transformación neoplásica. Una de dichas interacciones la constituye la infección con el virus del papiloma humano (VPH) considerado, el principal factor de este tipo de cáncer. Numerosos estudios epidemiológicos establecieron la relación causal entre la infección viral y el desarrollo de neoplasias de cuello uterino. El VPH es una causa necesaria pero insuficiente para el desarrollo de carcinomas invasivos de cuello uterino <sup>(45, 47)</sup>.

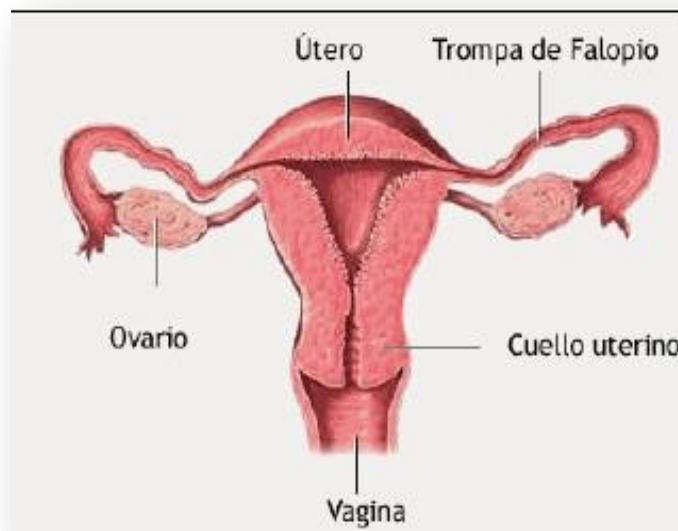
### **2.3 Cuello uterino o cérvix**

Es una frontera de epitelios, uno plano y otro cilíndrico que se modifica a lo largo de la vida: con el desarrollo sexual, con el ciclo menstrual, con el embarazo, con el parto, el postparto y la menopausia. Además es una zona susceptible a la infección por microorganismos y por consiguiente sujeto a procesos inflamatorios y oncogénicos.

#### **2.3.1 Anatomía cervical**

- El cuello uterino o cérvix, conecta el útero con la vagina.

- Durante la menstruación, la sangre fluye desde el útero por el cérvix hacia la vagina. La vagina conduce al exterior del cuerpo<sup>46</sup>.
- Las células del epitelio endocervical cilíndrico simple, secretan mucus, durante la relación sexual, el mucus ayuda a los espermatozoides a desplazarse desde la vagina por el cérvix hacia el interior del útero, además impide que gérmenes procedentes de la vulva, vagina, exocérvix asciendan a los órganos sexuales internos<sup>46</sup>. Durante el embarazo, el cérvix se encuentra fuertemente cerrado para ayudar a mantener al bebé dentro del útero. Durante el parto, el cérvix se abre para permitir el paso del bebé por la vagina<sup>(46, 48)</sup>.



**Figura 5. Aparato Reproductor Femenino**<sup>116</sup>

- Constituye la parte más baja del útero, tiene una longitud de 2,5 a 3 cm, y 2.5 cm de ancho, se continúa hacia arriba con el cuerpo uterino (5 cm.) y hacia abajo con la vagina. Se puede decir que tiene forma cilíndrica. Su forma cambia tras la gestación<sup>(46, 48)</sup>.

En el cérvix se distinguen dos partes: Una interna que se denomina *Endocérvix* y que constituye un canal que se dispone entre la cavidad uterina, y otra externa, orientada hacia la vagina, que se denomina *Exocérvix* <sup>(46, 48)</sup>.

Además de su topografía, ambas partes presentan diferencias morfológicas y funcionales a nivel de su mucosa, siendo su estroma similar.

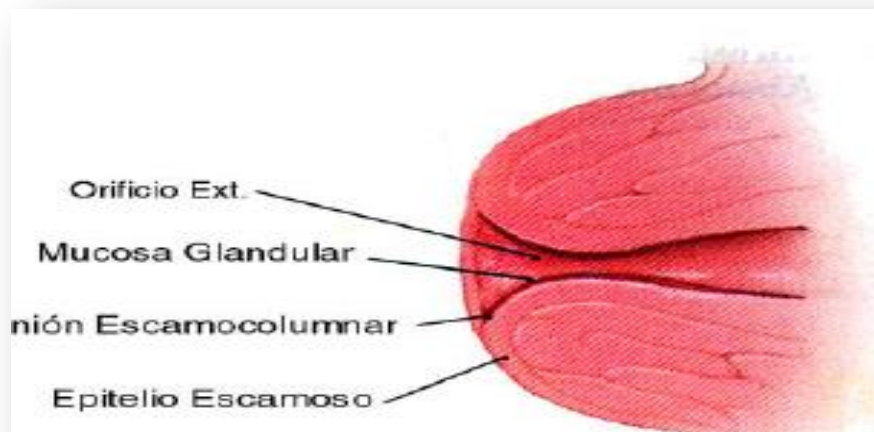
### **2.3.2 Estroma cervical**

Tanto a nivel del endocérvix como el exocérvix el estroma sobre el que descansan los epitelios es de tipo conectivo denso, rico en fibras de colágeno, con presencia de fibras elásticas y fibras musculares lisas siendo estas últimas más abundantes en la porción superior, donde se continúan con las fibras musculares del miometrio, y muy escasas en la porción más distal. Todo esto le confiere una consistencia firme y elástica. La proporción entre los componentes varía con la edad, de tal manera que en mujeres post- menopáusia predomina el tejido denso, confiriéndole al cérvix un aspecto fibroso y duro <sup>(46, 48)</sup>.

### **2.3.3 Epitelio cervical**

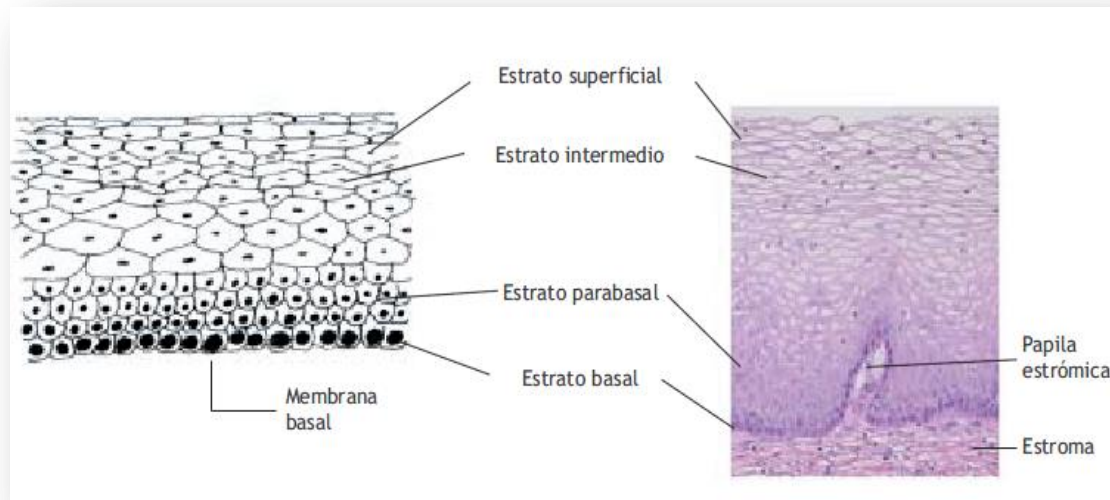
#### **2.3.3.1 Exocérvix o Ectocérvix**

El exocérvix continúa desde el orificio cervical externo hacia la vagina (la porción que se ve al colocar correctamente el espéculo, como también al realizar una colposcopia, que se denomina hocico de tenca o exocérvix). Está revestido en gran parte por epitelio escamoso estratificado no queratinizado que contiene glucógeno, que se continúa con el de la vagina <sup>(46, 48)</sup>.



**Figura Nro. 6. Exocervix o Ectocervix** <sup>46</sup>

La arquitectura histológica del epitelio escamoso del cuello uterino presenta, en el fondo, una única capa de células inmaduras denominada **Capa Basal o estrato germinativo** estas células basales presentan núcleos grandes de coloración oscura y poco citoplasma, cercanas a la membrana basal. Las células basales se dividen y maduran para formar la siguiente capa celular, llamada **Capa Parabasal**, que también tienen núcleos relativamente grandes y oscuros, y citoplasma basófilo. Estas células siguen diferenciándose y madurando hasta constituir capas intermedias de células poligonales con citoplasma abundante y núcleos redondos pequeños que forman un entramado como una cesta, estas corresponden a la **Capa Escamosa o estrato espinoso**. Al proseguir la maduración, se forman las células grandes y sensiblemente planas, de núcleo pequeño, denso y picnótico y citoplasma transparente, que corresponden a la **Capa Superficial o Estrato Corneo (granuloso)**. En términos generales, de la capa basal a la superficial, estas células aumentan de tamaño mientras se reduce el de su núcleo <sup>(48, 51)</sup>.

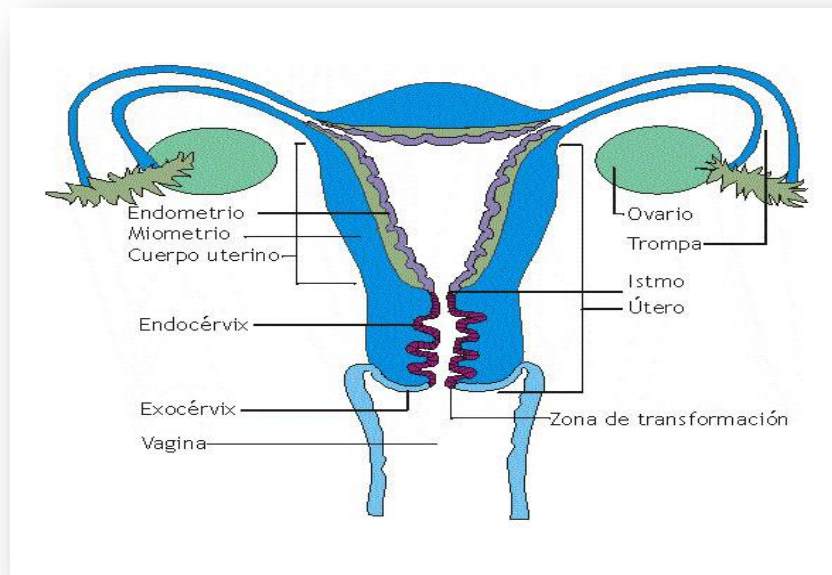


**Figura Nro. 7. Epitelio escamoso estratificado** <sup>48</sup>

Las células de las capas intermedias y superficial contienen glucógeno abundante en su citoplasma, es signo de maduración normal y de desarrollo del epitelio escamoso, que se tiñe intensamente de color pardo-caoba o negro tras aplicar la solución yodo yodurada de Lugol con ácido peryódico de Schiff en los cortes histológicos. La maduración anormal o alterada se caracteriza por la ausencia de glucogénesis. La maduración del epitelio escamoso del cuello uterino depende de la presencia de estrógeno, la hormona femenina. En ausencia de estrógeno no se producen maduración ni glucogénesis totales. En consecuencia, después de la menopausia, las células no maduran más allá de la capa parabasal y no se acumulan en capas múltiples de células planas. El epitelio se vuelve delgado y atrófico. A la inspección visual aparece pálido, con manchas petequiales subepiteliales, por ser muy propenso a los traumatismos <sup>(46, 48,51)</sup>.

### 2.3.3.2 Endocérvix

Posee una forma ligeramente cilíndrica dejando en su interior un canal estrecho menor de un centímetro de diámetro. El endocérvix aún se estrecha más en sus porciones superior e inferior, zonas denominadas: orificio cervical interno y externo, respectivamente <sup>(46, 48)</sup>.



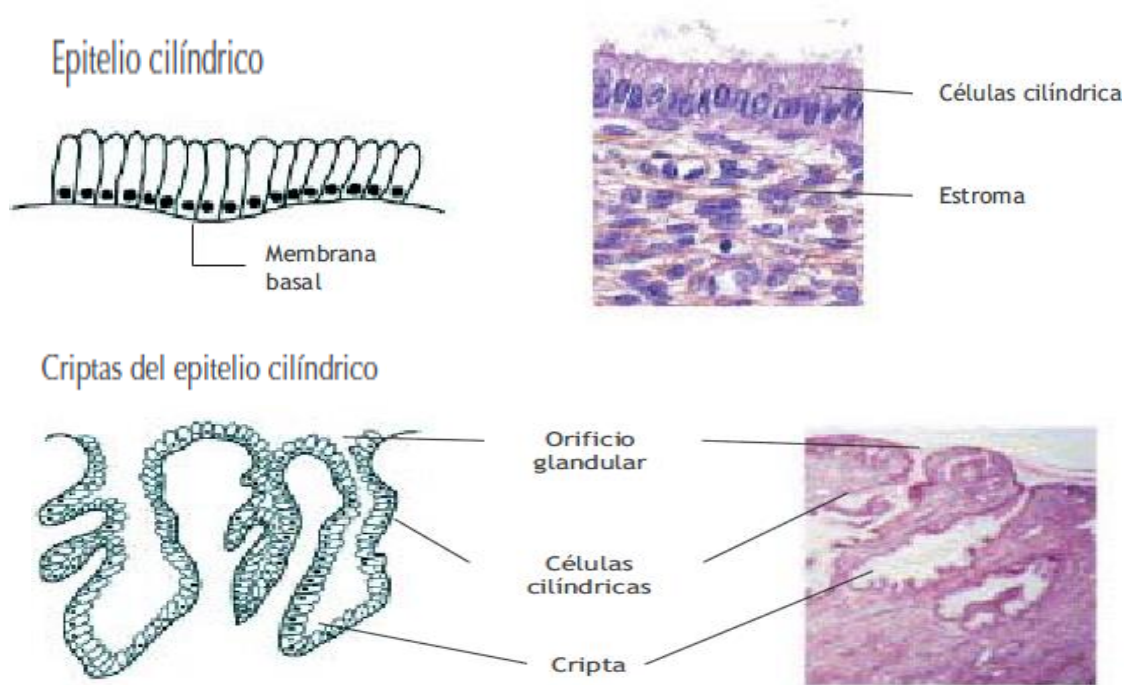
**Figura Nro. 8 Estructura Endocervix <sup>46</sup>**

La mucosa Endocervical normal consiste en una zona arborescente formada por hendiduras y túbulos que se invaginan en el estroma, y que inicialmente se pensó que eran glándulas por su aspecto en las secciones histológicas <sup>(46, 48)</sup>.

El endocervix está revestido por un epitelio cilíndrico simple. Compuesto de una única capa de células altas, con núcleos oscuros, cerca de la membrana basal. Con células epiteliales mucosas y algunas ciliadas interpuestas en la parte superior del cervix. Este epitelio cubre la superficie de la mucosa y reviste sus pliegues, hendiduras y túbulos <sup>(46, 48)</sup>.

<sup>51)</sup> Por tratarse de una única capa celular, su altura es mucho menor que la del epitelio escamoso estratificado del cuello uterino. A la inspección visual su color es rojizo, pues una sola y delgada capa celular permiten que aparezca la coloración de la vascularización subyacente del estroma. Cubre una superficie variable del exocervix según la edad, el número de partos y el momento hormonal de la mujer, fecunda o menopáusica.





**Figura Nro. 9. Epitelio y Criptas Cilíndricos**<sup>48</sup>

El epitelio cilíndrico no forma una superficie aplanada en el conducto cervical, sino que forma pliegues longitudinales múltiples que sobresalen en la luz del conducto, dando lugar a proyecciones papiliformes. También forma invaginaciones en el estroma cervical, dando lugar a la formación de criptas endocervicales. Las criptas pueden llegar a tener entre 5 y 8 mm desde la superficie del cuello uterino. Esta arquitectura compleja, con pliegues mucosos y criptas, da al epitelio cilíndrico una apariencia granular a la inspección visual. En el epitelio cilíndrico no se produce glucogénesis ni mitosis, debido a la falta de glucógeno citoplasmático, el epitelio cilíndrico no cambia de color tras aplicación de Lugol, o retiene una leve capa de la solución yodo yodurada<sup>(46, 48, 50)</sup>.

### **2.3.3.3 Unión Escamoso-cilíndrica (UEC) y zona de transformación**

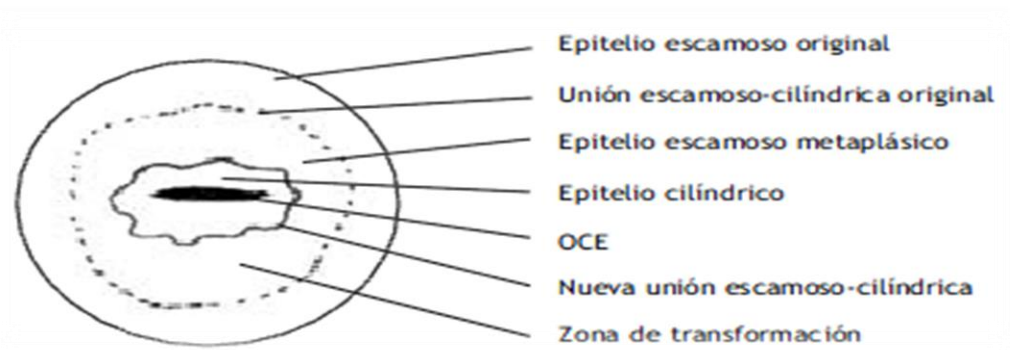
Más del 90% de los casos de CCU se desarrollan en la zona de transformación (unión escamo-columnar), que se define como el sitio de unión entre el epitelio cilíndrico simple

que recubre el canal endocervical y el epitelio escamoso estratificado que recubre el exocérnix<sup>30</sup>.



**Figura Nro. 10. Zona de Transformación**

La unión entre el epitelio mucoso del endocérnix y el escamoso del exocérnix normalmente se localiza a nivel del orificio cervical externo. La localización se modifica a lo largo de la vida de la mujer<sup>(46, 48)</sup>.

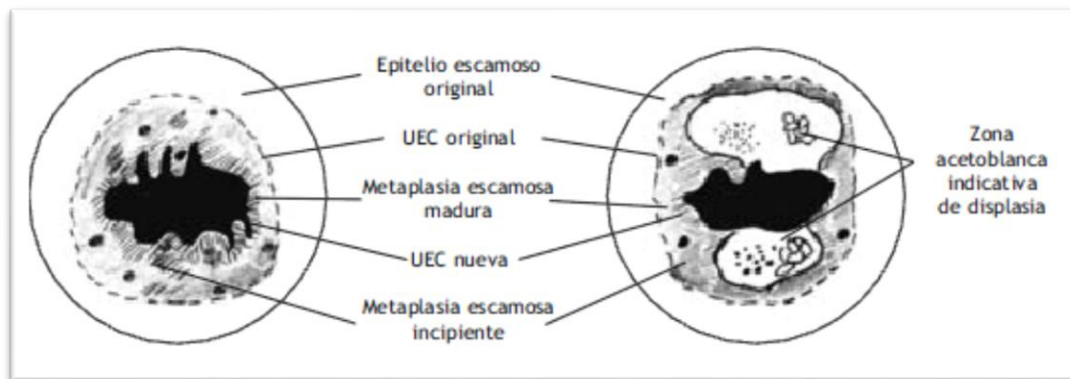


**Figura Nro. 11. Zona de Transformación**

La influencia de las hormonas sexuales en la pubertad promueve la eversión del epitelio mucoso endocervical hacia la vagina, formando lo que se denomina ectropión. La acidez existente en la vagina (como consecuencia de la degradación del glucógeno del epitelio escamoso vaginal y exocervical por parte de los bacilos de Döderlein) origina un cambio

en la diferenciación de las células de reserva del epitelio endocervical de esta zona, transformándose en escamoso. Esto implica la existencia de lo que se denomina zona de transformación, que se localiza entre el restante epitelio mucoso endocervical y el primitivo epitelio escamoso exocervical. En los estadios precoces, este epitelio regenerativo está constituido por células epiteliales diferenciadas y pobres en glucógeno pero posteriormente, cuando madura de forma completa, resulta imposible distinguir el epitelio escamoso metaplásico y regenerativo del epitelio exocervical primitivo adyacente (48,50)

Esto conlleva que la unión escamo-columnar existente antes de la pubertad no sea la misma y, además, en mujeres mayores esta unión tiende a desplazarse hacia dentro del canal endocervical. A menudo en este proceso se ocluyen los orificios de las glándulas endocervicales con lo que el moco se queda retenido y las glándulas se dilatan y se hacen quísticas, denominándose quistes de Naboth.

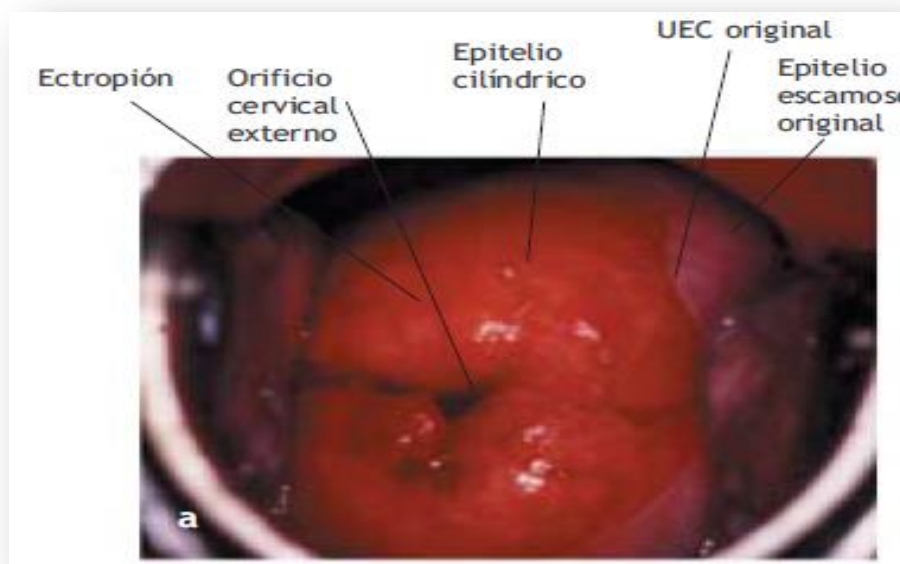


**Figura Nro. 12. a) Diagrama esquemático de la zona de transformación normal; b) Diagrama esquemático de la zona de transformación anormal o atípica, con displasia**

La importancia biológica de esta zona de transformación radica en su sensibilidad a infectarse por determinados tipos de virus (como el VPH). Cuando existe transición entre epitelios se mostrara al colposcopio como una línea que tras la aplicación del ácido acético es ligeramente blanca y tras el Lugol es ligeramente color pajizo (48,50).

### 2.3.3.4 Ectropión

El ectropión se define como la eversión del epitelio cilíndrico endocervical hacia el exocérnix. Se presenta como una zona rojiza en el exocérnix que rodea el orificio externo<sup>(48, 50)</sup>. La eversión del epitelio cilíndrico es un proceso normal, fisiológico, en la vida de una mujer.



**Figura Nro. 13. Ectropión**

## 2.4 Nomenclatura citopatológica e histopatológica de las lesiones cervicales preneoplásicas y neoplásicas.

Durante los últimos años se han utilizado diferentes nomenclaturas citológicas para denominar las lesiones intraepiteliales escamosas cervicales. Esta denominación ha ido

cambiando en relación con el incremento de conocimientos, morfológicos, evolutivos, etiológicos, carcinogénicos, sobre todo biológicos. Por otro lado, y a excepción de la clasificación numérica de Papanicolaou, la clasificación citológica ha ido siempre ligada de forma estrecha a la clasificación histológica <sup>(41, 59, 60, 61, 62)</sup>.

Con la progresiva introducción de la citología y biopsia se vio que el espectro de anomalías del epitelio cervical era mucho más amplio, siendo frecuentes otros cambios epiteliales menos severos que el cáncer in Situ (CIS). En 1949, Papanicolaou introduce los términos de “displasia” en histopatología y “discariosis” en citología para designar dichos cambios. En 1961, en el Primer Congreso Internacional de Citología celebrado en Viena, se acuerda que los términos para designar citológicamente las tres lesiones cervicales mayores sean: “carcinoma invasor, carcinoma in situ y **displasia**”. Esta última fue graduada como **leve, moderada, y severa o grave**, a las que habría que añadir el **CIS** ya definido <sup>(59, 60)</sup>.

La clasificación, utilizada tanto en material histológico como citológico, tuvo dos problemas fundamentales; por un lado, el gran desacuerdo respecto a cuándo una lesión debía ser considerada displasia grave o CIS, y por otro, el que muchos clínicos asumían que el CIS y la displasia eran dos lesiones biológicamente distintas e independientes, con distinto potencial maligno, no requiriendo tratamiento las lesiones displásicas. Para solventar estos problemas Richart (Nueva York), en 1967, propuso el término de **neoplasia intraepitelial cervical (NIC-CIN) con tres grados progresivos**, incluyéndose en el grado 3 la displasia grave y el CIS de la clasificación anterior. La ventaja principal, sobre esta, es el reconocimiento de la unidad del proceso patológico lo cual conlleva una relación con las técnicas terapéuticas. Esta clasificación ha sido considerada bastante adecuada durante más de 20 años y por lo tanto la más utilizada internacionalmente. Sin embargo, un número creciente de publicaciones señalaron el hecho de la baja seguridad diagnóstica, tanto en material cito como histológico, en la parte menos severa del espectro. Se sugirió, por lo tanto, que este sistema, debía ser modificado y sustituido por un sistema binario que

segregara los procesos con atipia celular muy discreta de aquellos con atipia franca<sup>(41, 59, 60, 61, 62)</sup>.

### 2.4.1 Terminología actualmente utilizada

Las razones expuestas anteriormente, junto con los avances en el conocimiento de la carcinogénesis cervical y la citología, motivaron una reunión de representantes de organismos internacionales, científicos y profesionales, en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos en Bethesda (Maryland). Fruto de dicha reunión fue un nuevo sistema de nomenclatura para informes citológicos ginecológicos (*Sistema o Clasificación Bethesda*) y se adoptó recomendaciones que la experiencia general acumulada aconsejaba. La parte fundamental de esta nueva clasificación fue la elaboración de un sistema binario para catalogar las anormalidades celulares preneoplásicas en el extendido citológico, nombrando así, **lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) clasificadas en dos categorías: de alto grado (LIE-AG) y bajo grado (LIE-BG)**<sup>(14, 25, 60, 61, 62)</sup>.

El término «alto grado» incluye el CIN 2 y CIN 3 de la clasificación de Richard, y el término «bajo grado» el CIN 1 y las alteraciones celulares producidas por Papilomavirus (VPH). Esta clasificación fue difundida en 1988, modificada en 1991 y actualizada en 2001<sup>(14, 25, 30, 41, 59, 60)</sup>.

Aparte de los datos de identificación y de localización de la toma de muestra, la clasificación Bethesda en su versión de 2001 tiene los siguientes apartados respecto a las lesiones cervicales:

#### 2.4.1.1 Calidad de la muestra

El Sistema Bethesda recomienda que el informe citológico deba empezar con una referencia a la calidad de la muestra. Esta puede ser: *a)* satisfactoria para su evaluación, o

b) no satisfactoria para su evaluación. La muestra satisfactoria para su evaluación debe incluir un mínimo de células escamosas para su evaluación, con preservación adecuada, para su correcta visualización. Por otro lado, una muestra citológica óptima debería incluir representación de la zona de transformación endocervical, aunque su ausencia no convierta la muestra en “no satisfactoria”, es un indicador de calidad destacable <sup>(60, 62)</sup>.

#### **2.4.1.2 Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad**

Se utiliza esta categoría cuando no hay evidencia de neoplasia, independientemente de si se observan o no microorganismos u otros hallazgos no neoplásicos. Los cuales pueden ser sustituidos por estas categorías <sup>(30, 41, 59)</sup>:

- a) Dentro de los límites normales
- b) Cambios celulares benignos
- c) Cambios reactivos (inflamación, cambios por DIU)
- d) **Reporte de microorganismos;** cambio en la flora sugestivo o indicativo de vaginosis bacteriana <sup>(30, 41, 59)</sup>.

#### **2.4.1.3 Terminologías para Células Escamosas Atípicas (ASC)**

##### **a) Atipia escamosa de significado indeterminado (ASC-US)**

ASC-US son las siglas de “*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*” o células escamosas atípicas de significado indeterminado o incierto. El término fue introducido para intentar acotar con más precisión la «zona gris» entre los cambios celulares benignos y la lesión intraepitelial, por lo que la catalogación de un proceso como

ASCUS se realiza por exclusión. Es decir, los cambios observados pueden deberse a un proceso benigno, pero intenso, o a una lesión potencialmente grave; por lo tanto, y debido a que no pueden ser inequívocamente clasificados, son interpretados como de significado indeterminado o incierto, e insuficientes para clasificarlos con seguridad como LIE. Como se puede deducir de la definición, esta categoría no es reproducible. No obstante, se ha comprobado que un 10 a 20% de casos de ASCUS corresponden realmente a una lesión intraepitelial, incluso de alto grado, que no se ha puesto en evidencia en el extendido citológico, por lo que eliminar el término no parece prudente. Todos estos datos han sido contemplados en la versión 2001 de Bethesda en la que el término ASCUS pasa a ser definido como «alteraciones citológicas sugestivas de una lesión intraepitelial pero insuficientes para una interpretación definitiva»<sup>(14, 30, 41, 59, 60)</sup>.

#### **b) Atipia de células escamosas, (ASC-H)**

Esta denominación se refiere a los casos en que las alteraciones celulares son en células de tamaño similar a las células metaplásicas y que son sugestivas, pero no concluyentes, de una lesión intraepitelial de alto grado.

Las nuevas pautas de diagnóstico y tratamiento elaboradas por la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP), recomiendan, para las pacientes con ASCUS, un seguimiento distinto al recomendado para las que tienen ASC-H. Se recomienda efectuar la prueba de DNA del VPH oncogénico (de alto riesgo) en los casos de ASC-US cuando puede efectuarse junto con la citología, pero también es aceptable volver a realizar el examen citológico y una colposcopia inmediata. Por el contrario, para los casos de ASC-H se recomienda efectuar una colposcopia. Respecto de las pacientes que presentan ASC-H tras una colposcopia que no confirma un diagnóstico histológico de CIN II ni una lesión de mayor grado, el tratamiento debe ser realizado sobre la base de todos los hallazgos anatomopatológicos y clínicos<sup>(14, 30, 41, 59, 60)</sup>.



**c) Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIE-BG)**

Los cambios de células escamosas asociados a la infección por VPH abarcan la displasia leve y el CIN I. Puesto que estas lesiones comparten tipos similares de VPH, y su comportamiento biológico y su tratamiento clínico son similares, está justificado emplear un solo término, LIE-BG, para describirlas. Recomiendan efectuar una colposcopia como primera medida en los casos de LIE-BG. Las pruebas para la detección de VPH probablemente sean de utilidad para detectar la persistencia de la infección viral de alto riesgo en las pacientes que tienen lesión intraepitelial <sup>(14, 30, 41, 59)</sup>.

**d) Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE-AG)**

La mayoría de pacientes que tienen un resultado citológico de LIE-AG tienen lesiones de CIN II o III confirmadas mediante biopsia dirigida por imagen observada en el momento de la colposcopia. Recomiendan que, si no se identifica ninguna imagen de CIN mediante biopsia en una paciente con una interpretación citológica de LIE-AG, es preciso, tras la revisión del material citológico e histológico, efectuar un procedimiento diagnóstico por escisión <sup>(14, 30, 41)</sup>.

**e) Carcinoma escamoso**

Se define como un tumor maligno invasor con diferenciación escamosa. El Sistema Bethesda no subdivide el carcinoma de células escamosa en queratinizantes y no queratinizantes. Aunque existen criterios citológicos para su identificación, a menudo estas entidades no son distinguibles con facilidad, ya que pueden coexistir en un mismo extendido citológico <sup>(14, 30, 59,62)</sup>.

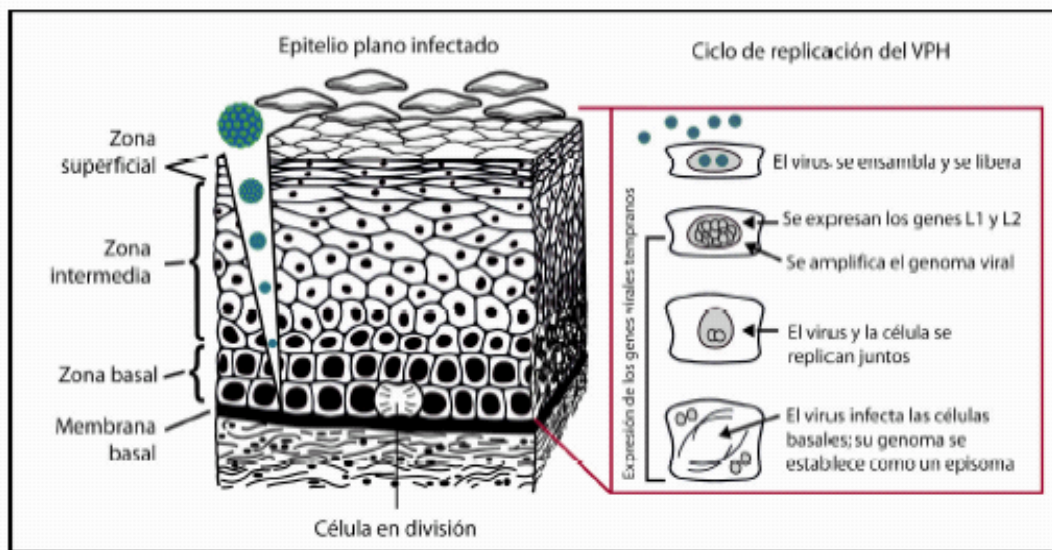
### **f) Anomalías epiteliales glandulares**

El estudio citológico cervical es principalmente un estudio de cribado en busca de lesiones escamosas intraepiteliales. Su sensibilidad para detectar lesiones glandulares está limitada por problemas relacionados con la obtención de la muestra y su interpretación. Los hallazgos glandulares atípicos deben clasificarse, siempre que sea posible, según la estirpe celular de origen, endocervical o endometrial. El seguimiento de las muestras citológicas interpretadas como “atipias glandulares” demuestra que se identifican lesiones de alto grado en un 10 a un 40% de los casos, y que éstas son escamosas (CIN II o III) con más frecuencia que glandulares <sup>(25, 41, 59, 60, 61)</sup>.

### **2.5 Patogenia de las Infecciones y desarrollo de CCU por el VPH**

El carácter oncogénico del VPH se debe a que carece de DNA y ARN polimerasas requeridas para el ciclo viral, por lo que debe integrar su genoma al de la célula huésped e inducir a un estado proliferativo para la producción de proteínas de replicación. En una infección típica, la penetración del virus en las células de la capa basal se facilita por la presencia de microtraumas en la capa superficial del epitelio. El virus expresa proteínas tempranas, tomando el control de la maquinaria de proliferación celular y produciendo la propagación del genoma viral. En este punto la viremia no es detectable pues las células blanco son los queratinocitos diferenciados que están destinados a descamarse en el estrato superficial del epitelio, donde las lesiones producidas no van acompañadas de inflamación <sup>(30, 54, 55)</sup>. La infección de VPH establece un periodo de incubación que oscila entre 6 semanas a 2 años, aunque este aspecto no está totalmente aclarado, viéndose expuestas las células de la capa basal a la entrada de las partículas virales. Una vez que ingresa el virus, su ciclo depende de la diferenciación de la célula, aprovechando la maquinaria celular para su replicación y propagación viral <sup>(27, 40, 54, 55)</sup>.

Se puede hablar de infección productiva, a la expresión de los genes tempranos que se dan en las capas basales y parabasales, y de los genes tardíos en las capas superficiales, paralelamente a la maduración del epitelio cervical, dando lugar a la producción de partículas infecciosas. Una infección es latente (persistente) cuando el genoma viral permanece en el núcleo de las células de la capa basal replicándose como un plásmido estable (episoma) pero sin la producción del virus infeccioso. Sin embargo por la influencia de ciertos factores endógenos y exógenos desconocidos, esta latencia evoluciona a infección productiva <sup>(15, 19, 40, 54)</sup>.



**Figura Nro. 14. Ciclo de Replicación Productivo del VPH <sup>117</sup>**

En las células basales se da la transcripción de los genes tempranos y en las células diferenciadas del estrato superficial se expresan los genes tardíos (L1, L2) por ende la síntesis y ensamblaje de la cápside. La secuencia L1 es la proteína principal de la cápside, responsable de la adherencia específica del virus a la célula, además de ser el antígeno que induce la respuesta humoral y celular. L1 está muy conservado, permite reactividad cruzada entre los distintos genotipos de VPH condiciona su interés estratégico en las vacunas profilácticas aplicables a una población <sup>(27, 30, 53,54)</sup>

En las lesiones benignas el DNA viral, se encuentra en forma extracromosomal del núcleo celular. Por lo contrario en las lesiones neoplásicas y cánceres, el DNA se encuentra integrado en el cromosoma celular y se inserta rompiendo la región E2, llevando a una desregulación de la expresión de las Oncoproteínas E6 y E7. Es decir, la transcripción de los genes E6 y E7 inicialmente es reprimida por la proteína E2 explicando así, la malignización de la lesión, cuyos productos interfieren con las proteínas supresoras de tumores, la p53 y la proteína retinoblastoma (pRb). Esta actividad transformadora es mayor en los genotipos de VPH-AR 16 y 18 <sup>(27, 30, 34, 38, 53)</sup>.

A su vez las infecciones por VPH con una elevada carga viral son capaces de producir grandes cantidades de proteínas E6 y E7, cuya acumulación en aquellos individuos inmunocompetentes, incrementa el riesgo de transformación maligna <sup>(30, 34, 53)</sup>.

Las Oncoproteínas E6 y E7, tienen la capacidad de immortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión continua de estos genes, es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células del cérvix. Estudios de mecanismos moleculares del proceso de transformación, mostraron un complejo patrón de interacciones de estas onco-proteínas virales con reguladores celulares, con funciones biológicas como: la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular, considerando que la integración del genoma de VPH al genoma de la célula hospedera es el evento fundamental en la progresión del cáncer, debido a la sobreexpresión de las Oncoproteínas E6 y E7 por la pérdida de E2, proteína implicada en su regulación <sup>(30, 35, 39, 53)</sup>.

### **2.5.1 Integración Viral**

El DNA viral puede encontrarse en la célula infectada de estas formas estructurales: integrado al genoma celular: forma integrada, libre en el núcleo celular: forma episomal y compartiendo las formas integrada y episomal: forma mixta <sup>(3, 35)</sup>. Diferentes trabajos han

demostrado que la integración viral es un evento importante en la progresión de lesiones intraepiteliales a carcinomas invasivos de cuello uterino, sin embargo, más de dos décadas de investigación sobre el VPH, no son claros los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de integración. En etapas tempranas, la expresión de oncoproteínas virales en células epiteliales generalmente conduce al desarrollo de diferentes tipos de anomalías cromosomales, no obstante, la posterior activación de mecanismos de reparación celular facilitan la inserción de secuencias foráneas como las de VPH. Así, se ha observado que la homología entre secuencias del virus y del genoma celular que se recombinan es prácticamente nula, lo que permite considerar el proceso de inserción viral como un mecanismo que se facilita por eventos de recombinación no homóloga, proceso empleado frecuentemente por las células en la reparación de daños genéticos<sup>(3, 35)</sup>. La frecuencia de formas integradas o mixtas aumenta con la progresión de la enfermedad del CCU, de esta manera, la transición de LIEAG a carcinomas micro invasivos, se caracteriza por la integración de secuencias del genoma de VPH-AR. Estudios experimentales demuestran que la integración del genoma viral es común en CCU y poco frecuente en epitelios normales y LIEBG<sup>(3, 35)</sup>.

### **2.5.2 Sitios de integración viral y su efecto**

En el proceso de integración, la linearización del genoma circular es una etapa necesaria que involucra el rompimiento de la doble cadena viral principalmente en la región E1/E2. Adicional al rompimiento, en la mayoría de casos se presentan deleciones de fragmentos virales, actualmente se considera que el fragmento viral correspondiente a los genes E1 y E2 es la región con mayor tasa de rompimiento. Sin embargo, dentro de esta región a su vez existen varias secuencias específicas que han sido reconocidas como blancos de rompimiento viral tanto en: E1 como E2. Es posible que así como la dinámica de integración varíe con la población de estudio, ocurra lo mismo con los sitios específicos de corte viral. En VPH 18 aproximadamente la mitad del genoma viral se pierde en la integración comprometiendo total o parcialmente los genes E2, E4, E5, L1 y L2. De otro

lado, se han identificado regiones virales que no son blancos de rompimientos en el proceso de inserción como las correspondientes a los genes E6, E7 y LCR <sup>(3, 30, 35)</sup>.

Teniendo en cuenta que frecuentemente ocurren rupturas y/o deleciones a nivel de la región E1 y E2, parte de los efectos de la integración viral van a depender de la alteración de las funciones biológicas de E1 y E2. La proteína E2 de VPH 16 controla negativamente la transcripción de los genes virales E6 y E7. En presencia de la proteína E2 hay represión continua de la transcripción de las oncogenes E6 y E7, contrariamente, la ausencia del represor E2 permite el libre acceso de factores de transcripción celulares que se agrupan en el promotor viral y regulan positivamente la transcripción de E6 y E7 <sup>(3, 30, 35, 45)</sup>.

La pérdida de la función represora de E2 es un factor crítico en la progresión maligna, estudios realizados *in vitro* demostraron que la reintroducción de E2 en líneas celulares de carcinoma de cuello uterino causa supresión del crecimiento debido a la represión de la transcripción de E6 y E7. Las proteínas E2 de tipos virales de alto riesgo localizadas en núcleo y citoplasma pueden inducir apoptosis. Otras consecuencias de la pérdida de la actividad represora de E2 son el aumento en la capacidad de inmortalización celular. La ruptura del gen viral E2 ha sido asociado a la progresión de lesiones de cuello uterino, particularmente de LIEBG a LIEAG, con bajas tasas de supervivencia en pacientes con CCU, no obstante la presencia de regiones E2 inalteradas junto con la expresión concomitante de oncoproteínas virales en algunos casos de lesiones avanzadas plantea que la ruptura de la secuencia viral en E2 no es siempre un paso indispensable en el desarrollo de CCU, ya que la alteración de la función biológica de E2 puede darse por otros mecanismos alternos tales como cambios en la secuencia nucleotídica <sup>(3, 30, 35)</sup>.

### **2.5.3 Integración y oncoproteínas virales**

Varios estudios, han demostrado que la inserción de genotipos de alto riesgo en el genoma de la célula huésped está asociada con el aumento en los niveles de transcripción de los

genes E6 y E7. Esta observación también ha sido corroborada *in vitro*, empleando una línea celular derivada de una LIEBG, donde las secuencias VPH integradas sobre expresaron E7 y no generaron transcritos para E2. Si se considera que en lesiones avanzadas prevalecen las formas integradas y que E2 es un represor transcripcional de los oncogenes virales, es posible predecir que en displasias severas y en CCU se presente mayor expresión de E6 y E7 <sup>(3, 30, 35,45)</sup>.

#### **2.5.4 Sitios de integración celular y su efecto**

Han identificado más de 200 sitios de integración celular, descritos en tumores primarios de cuello uterino y líneas celulares. La integración de secuencias VPH ocurre dentro de regiones del genoma de baja condensación de la célula hospedera, transcripcionalmente activas, que permite mayor accesibilidad para la integración de DNA foráneo. Se plantea que el evento de integración viral ocurre aleatoriamente a lo largo del genoma celular, un alto porcentaje de los sitios celulares de integración corresponden a regiones genómicas altamente susceptibles a la ruptura que facilitan la inserción de DNA viral <sup>(3, 30, 35, 45)</sup>.

#### **2.5.5 Integración y otros factores virales**

Dentro de los factores de riesgo virales asociados con CCU, pueden ser: el genotipo y la carga viral. La mayoría de estudios de integración viral se han realizado en los dos principales genotipos de alto riesgo, VPH 16 y VPH 18. No obstante, tanto la tipificación viral como la evaluación del estado de integración son parámetros que permitirán un diagnóstico más preciso y un tratamiento más adecuado <sup>(3, 30, 35)</sup>.

### **2.6 El Sistema Inmune y La Infección por VPH**

Más del 85% de las infecciones producidas por el VPH tienen un patrón transitorio, se eliminan a lo largo del tiempo (la duración media de la infección para los virus de alto riesgo es de 8 a 24 meses), por lo que la mayoría de los individuos (70% a 90%) eliminan el virus, después de la infección inicial. Sin embargo algunas de estas infecciones no son eliminadas, lo que puede llevar a una infección persistente. Entre 10% a 30% de los casos es más común en los casos oncogénicos, con un mayor riesgo de desarrollar LIEAG y cáncer. El aumento de la incidencia y la progresión de las infecciones por VPH en individuos inmunodeficientes demuestran la gran importancia de la respuesta inmune mediada por células en la resolución y el control de las infecciones por VPH.

Mujeres infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) muestran múltiples recurrencias de neoplasia intraepitelial cervical, aumento en la incidencia de verrugas genitales, mayor persistencia de las infecciones por VPH y mayor incidencia de LIEAG, cuando se comparan con mujeres sin la infección por VIH<sup>(64, 41, 64, 65)</sup>.

Se conoce, que la mayoría de los casos de infección por el VPH es eliminado por el sistema inmunológico y que la duración prolongada de la infección parece estar asociado a una evasión efectiva del virus de la respuesta inmunológica; la replicación del DNA viral y su liberación no causa la muerte celular, ya que el queratinocito infectado ya está programado para morir de forma natural, por lo que no se disparan señales de peligro hacia el sistema inmune, esto se refleja en la ausencia de inflamación (no existiendo la liberación de citoquinas pro inflamatorias, importantes para la activación y migración de las células presentadoras de antígenos). Así mismo, no hay fase de viremia y pequeñas cantidades del virus son expuestas al sistema inmunológico, por lo que el virus es invisible. Adicionalmente, existe una baja regulación de la expresión de IFN- *alpha* e IFN- *beta* y las Oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16 alteran la expresión de IFN- *alpha* de genes reguladores del ciclo celular y otros genes involucrados en la resistencia del huésped a la infección; permitiendo al virus permanecer durante largos periodos sin ser reconocido, lo cual demora la activación de la respuesta inmune adaptativa. A pesar de la evasión del



virus, de las defensas del huésped, se puede generar una respuesta serológica dirigida contra epítopes conformacionales presentes en el virión o hacia partículas semejantes a virus. Y esta respuesta de anticuerpos se genera en la mayoría pero no en todos los individuos infectados, y sus niveles, aunque en general son bajos, parecen proteger al individuo de una infección posterior.

En la actualidad no es claro el papel de las respuestas tipo IgG e IgA tanto en la persistencia como en la eliminación de infecciones por diferentes tipos de VPH, debido a la existencia de pocos reportes y contradicciones entre los resultados presentados, por lo que se hace necesario realizar investigaciones en las que se analice este tipo de respuestas en estudios de seguimiento <sup>(30, 31, 41, 47, 63, 64)</sup>.

Inicialmente las infecciones virales son intracelulares, y los antígenos escapan al alcance de los anticuerpos. El sistema inmune está involucrado en la infección primaria y en la progresión maligna de las lesiones por el VPH, en especial la respuesta inmune mediada por células <sup>(30,47, 64, 68, 69)</sup>.

### **2.6.1 Respuesta Inmune Humoral**

La respuesta humoral es importante sólo para infecciones virales productivas, en las que partículas virales salen al espacio extracelular por exocitosis o durante la lisis celular por efecto del propio virus o las células citotóxicas del paciente. En el espacio extracelular las partículas virales son atrapadas por linfocitos B con receptores (anticuerpos de membrana), específicos para algunos epítopes de las proteínas virales. Una vez en el receptor, el antígeno es internalizado por endocitosis y digerido en el lisosoma para producir pequeños péptidos que se unen a moléculas de clase II, del complejo principal de histocompatibilidad. Posteriormente, los péptidos son presentados en la superficie celular para ser reconocidos por linfocitos T ayudadores CD4+. Una vez activados, los linfocitos

CD4<sup>+</sup> estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos neutralizantes contra las partículas virales, los cuales juegan un papel muy importante para evitar la diseminación de la infección <sup>(31, 68, 69, 70)</sup>.

### **2.6.2 Respuesta Inmune Celular**

En la respuesta inmune celular participan, componentes del sistema inmune, células como: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, macrófagos, Células Presentadoras de Antígenos y las citocinas producidas por estas mismas.

En las etapas iniciales de la enfermedad, la respuesta inmune es aún efectiva porque las células infectadas por el VPH expresan todavía las moléculas de clase I del CMH, que exponen péptidos virales en la superficie celular, permitiendo que las células infectadas sean reconocidas como blancas por los LTC (CD8<sup>+</sup>), los cuales a su vez son llamados de los capilares vasculares por citocinas secretadas por las células infectadas.

En los queratinocitos infectados, las proteínas virales se encuentran en el citosol mezcladas con las proteínas celulares, y ambas son degradadas en los proteosomas, de modo que se producen pequeños oligopéptidos de 8 a 11 aminoácidos, que posteriormente son transportadas al retículo endoplásmico rugoso por las proteínas transportadoras PTA1 y PTA2. Ahí se unen a las moléculas CMH de clase I para ser transportadas a la membrana celular y ser presentadas a los LTC, las cuales reconocen péptido viral por medio del receptor de células T (TCR) específico para cada epítipo. La participación de los linfocitos Th1 en la activación de los LTC y otras células inflamatorias es muy importante: secretan interleuquina IL-2, que activa a los LTC, e interferón gamma, que activa a los macrófagos. Los linfocitos Th1 pueden ser activados por las citoquinas liberadas (IL-1) por las células infectadas por el VPH o por células presentadoras de antígeno (CPA) que presentan péptidos virales en el contexto de moléculas de clase I y II. Las células de Langerhans (CD1<sup>+</sup>), con sus prolongaciones dendríticas típicas son las CPA más potentes dentro del

tejido epitelial y se presentan en los dos tercios inferiores del epitelio estratificado del cérvix normal. La activación de LTC y Th requiere también la interacción de moléculas accesorias coestimuladoras entre las células T y las CPA o las células epiteliales. La presentación de antígenos en la ausencia de estas moléculas coestimuladoras puede inducir energía, con una falla en la inducción de la proliferación y diferenciación de las células T, lo que conduce a una tolerancia al estímulo antigénico. Una vez activados, los LTC proliferan, se diferencian y participan en la lisis de las células blanco por tres caminos diferentes: Secretan perforinas y otras proteínas que perforan la membrana celular, Liberan sustancias que inducen la muerte celular programada (apoptosis). Liberan citocinas como el INF- gama y el Factor de Necrosis Tumoral que limitan la actividad viral dentro de las células y atraen macrófagos y otros fagocitos que pueden destruir a la célula. El INF-gama inhibe la expresión de los genes virales y estimulan la expresión de las moléculas de clase I del complejo CMH en los queratinocitos humanos, lo que permite una mejor presentación de los antígenos virales y con ello una respuesta inmune aumentada <sup>(68, 70)</sup>.

### **2.6.3 Estrategias virales de evasión inmune**

Uno de los factores que influyen en la respuesta inmune anti-VPH es la poca destrucción de tejido que se produce en el proceso infeccioso. Esto resalta la importancia de la respuesta inmune innata, e inhibe la respuesta inmune adaptativa por lo que no resulta extraño que el huésped permanezca sin presentar signos de la infección <sup>(64, 65, 68)</sup>.

La proteína E6 bloquea la interacción entre la célula infectada con las células dendríticas; la proteína E5 bloquea el procesamiento de antígenos dependientes de pH; las proteínas E6 y E7 impiden la producción de interferones.

El VPH cuando ingresa al epitelio cervical, se ubica en la zona de transformación en la que se mantiene la replicación del DNA viral, pero en bajas concentraciones (30-50 copias por

célula infectada), en forma episomal. Las células basales proliferantes ascienden a las últimas capas del epitelio (estratos parabasales y espinoso), amplificando la expresión de genes virales tempranos las cuales permiten producir DNA a cientos de copias por célula, y posterior la expresión de genes virales tardíos <sup>(30, 47, 64, 68)</sup>.

La proteína E7 del VPH16 inhibe la inducción de  $INF\alpha$ , de este modo interfiere con la eliminación efectiva del VPH. La constante variación de los residuos expuestos en la superficie de L1 se relaciona con una evasión de la respuesta inmune por alteración de los epítopes neutralizantes <sup>(30, 47, 64, 65, 67)</sup>.

La persistencia viral, progresión de la enfermedad y transformación maligna pueden deberse a mecanismos de evasión de citoquinas:  $TGF-\beta$ , TNF, IL-1,  $IFN-\alpha$ ,  $IFN-\delta$  <sup>(66, 67)</sup>.

## 2.7 Mecanismo de Transmisión

La infección ano-genital por el VPH, se transmite por vía sexual, por contacto directo de piel y mucosa. Debido a que existe una única y común vía de transmisión, se estima que diferentes tipos de VPH se transmiten a la vez, resultando en una elevada proporción (20-30%) de infecciones concurrentes con diferentes genotipos virales <sup>(14,18, 46, 71)</sup>.

Un estudio, determinó valores de transmisión del VPH coincidentes con la incidencia observada entre estudiantes universitarias en que la probabilidad de transmisión por cada acto sexual oscilaba entre el 5% y el 100% con una mediana del 40% <sup>(39,46, 71)</sup>. Otro estudio, la probabilidad por cada nuevo compañero sexual de transmisión del hombre a la mujer es del 60% para el VPH 16. Este porcentaje es idéntico al observado en relación a la probabilidad por cada pareja nueva de transmisión de verrugas genitales. Esto sugiere que el VPH es más transmisible que otras enfermedades de transmisión sexual víricas (ETS víricas), pero es comparable con la tasa de transmisión de las ETS bacterianas <sup>(39, 71)</sup>.

Muchas mujeres se infectan en su primera relación sexual. En las mujeres jóvenes, el epitelio metaplásico de la zona de transformación escamo-cilíndrica es inmaduro, por lo que podría justificar el mayor riesgo de infección cuando el inicio de la actividad sexual es precoz, que a su vez se suma, al mayor número de parejas y relaciones con hombres que tienen o han tenido múltiples parejas sexuales <sup>(39,46)</sup>.

Estudios, muestran un segundo pico de infección en mujeres mayores, estos pueden estar influenciados por uno o varios mecanismos. Por ejemplo, la reactivación de infecciones previas no detectadas adquiridas a una edad más temprana causadas por una pérdida gradual de la inmunidad ocasionada por cambios hormonales durante los años de la postmenopausia. Incluso también podría explicarse por la adquisición de infecciones nuevas a través de contactos sexuales con nuevas parejas a una edad más madura o al comportamiento sexual de sus parejas masculinas; así mismo, podría deberse a la mayor exposición a factores y cofactores de riesgo <sup>(39, 46, 71)</sup>.

El epitelio metaplásico del cérvix, en la unión escamoso- cilíndrica (zona de transición), es especialmente vulnerable al contagio, independiente del tipo de VPH. En esta zona, las células basales con capacidad de replicación son muy susceptibles a la infección vírica, ya que se encuentran en contacto con la superficie y la transmisión sería favorecida en caso de pequeñas fisuras o erosiones como vía de entrada aprovechando la dinámica celular para su replicación, y posterior maduración del epitelio metaplásico para expresar sus genes de forma secuencial. El virus también podría permanecer latente en las células basales del epitelio <sup>(14, 34, 18)</sup>.

Por otro lado la mucosa anal, también es susceptible de infección por VPH por las características del epitelio. Otras zonas como la vulva, la vagina, probablemente serían susceptibles de infección por erosiones en piel o mucosa <sup>(31, 39, 72)</sup>. La utilización de preservativos como barrera eficaz de transmisión del VIH, se considera como positiva. Sin embargo datos relativos a otras enfermedades de transmisión sexual, incluyendo el VPH,

no son consistentes. Después de varios estudios se admite que el uso correcto de preservativos (condones) y durante todo el acto sexual es un condicionante para disminuir el riesgo, y disminuir la progresión de las lesiones Intraepiteliales cervicales <sup>(14, 72)</sup>.

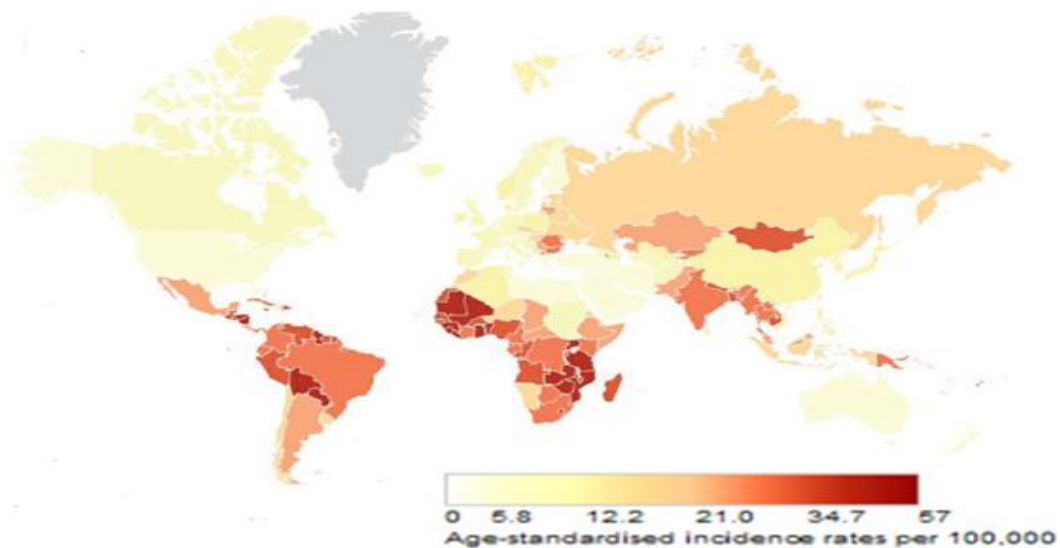
Estudios en hombres circundados por el médico especialista, muestran que estos tienen menor riesgo de infección, probablemente debido a la resistencia del epitelio queratinizado, por tanto la circuncisión masculina supondría un efecto indirecto protector en la mujer <sup>(31, 72)</sup>.

Con mayor frecuencia se transmite durante el contacto genital con penetración (relaciones sexuales vaginales o anales), pero no se descartan otros contactos menos frecuentes <sup>(14, 18)</sup> a través de fómites (jabones, toallas, ropa interior, artefactos sexuales), instrumentos médicos, autoinoculación de verrugas vulgares, contacto directo de la piel con las verrugas. También existen reportes sobre algunos casos de transmisión a niños recién nacidos de madres portadoras del virus, produciendo en los bebés papilomas laríngeos <sup>(18, 31, 72)</sup>.

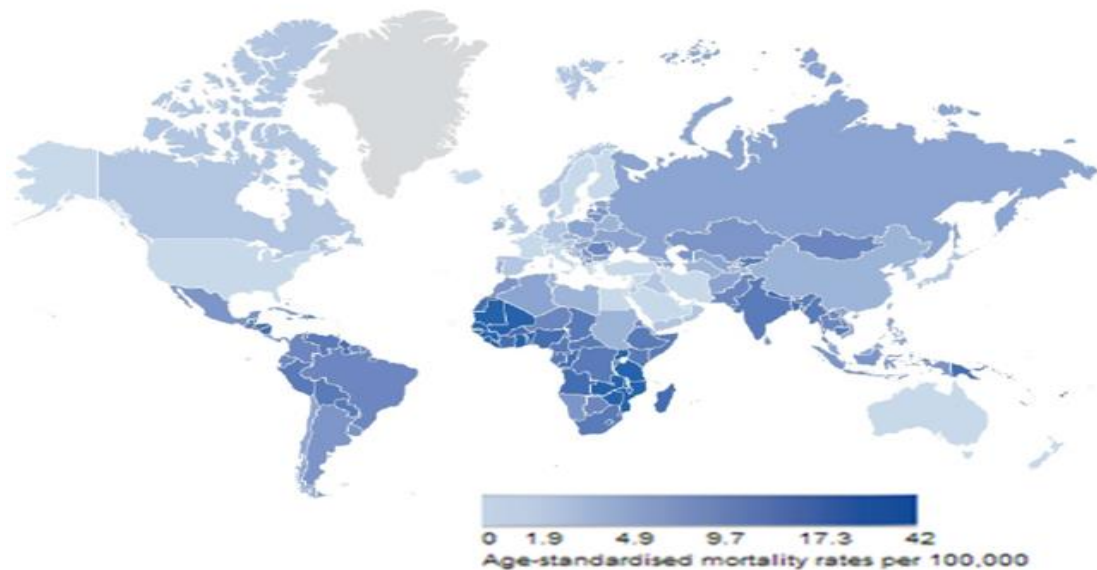
## **2.8 Epidemiología de CCU**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia del CCU a nivel mundial es de 530.000 casos por año, con una mortalidad cercana 275.000 (52%) muertes durante el año 2008, alrededor del 88 % de las cuales ocurre en los países de desarrollo, por lo que resulta ser un gran problema de salud Pública, mostrando que los programas de detección de cáncer no están bien establecidos o no son eficaces <sup>(77, 78, 81)</sup>.

Las regiones más afectadas por el cáncer cervical se encuentran entre las más pobres del mundo: América Central y del Sur, el Caribe, África subsahariana, Melanesia, Asia centromeridional y Sudeste asiático que tienen los índices más altos (más de 30 por cada 100.000 mujeres). Esto se compara con un máximo de 10 por cada 100.000 mujeres en América del norte y Europa. Los índices reportados son de 69 por cada 100.000 mujeres en Tanzania, 56 por cada 100.000 en Bolivia y 40 por 100.000 en Papúa Nueva Guinea. Asia tiene el número más alto de casos reportados <sup>(77, 78, 81)</sup>.



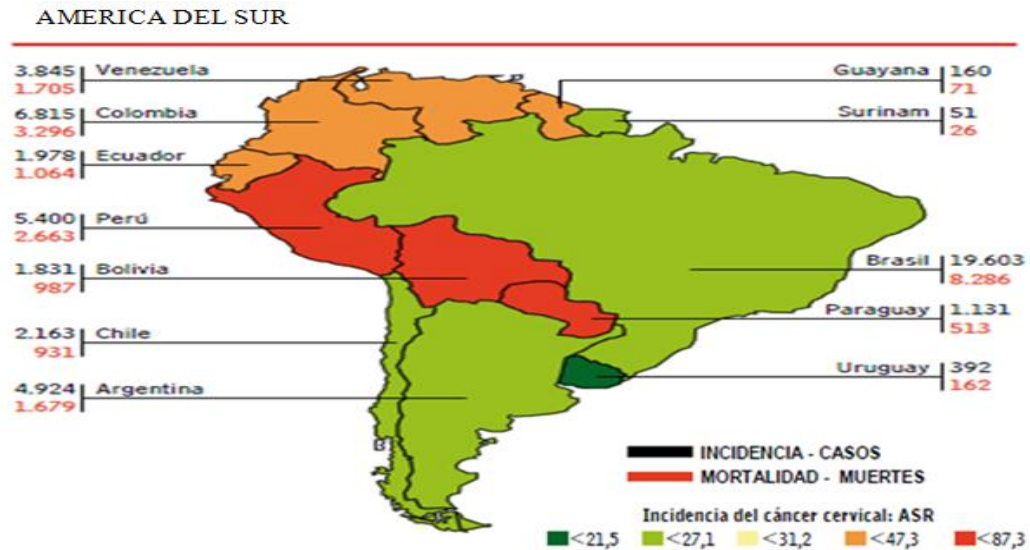
**Figura Nro. 15.** Incidencia mundial de cáncer cervical por 100.000 mujeres (todas las edades). 2008 <sup>77</sup>



**Figura Nro. 16.** Mortalidad mundial de cáncer cervical por 100.000 mujeres (todas las edades) 2008.<sup>77</sup>

Actualmente, Bolivia tiene una de las tasas más altas de incidencia de este cáncer con 56/100.000, y con una tasa de mortalidad de 27 por cada 100.000 mujeres, lo que significa un total de 661 muertes por año atribuidas al cáncer de cuello uterino. El CCU es la enfermedad más frecuente en las mujeres de 25 a 64 años de edad en el país. En términos de número de defunciones, el estudio GLOBOCAN estimó que 987 mujeres fallecieron en 2002, lo que representa 3 muertes por día. Según estimaciones de la OMS, la situación actual es mucho más alarmante: 1.665 defunciones por CCU, lo que significa de 4 a 5 muertes por día. Por todo esto el CCU en Bolivia es una de las primeras causas de muerte de la población femenina que afecta sobre todo a una gran parte de la población en condiciones de pobreza y extrema pobreza<sup>(78,79, 81,82)</sup>.





**Figura Nro. 17.** Incidencia y Mortalidad por Cáncer Cérvico Uterino.<sup>82</sup>

Un estudio realizado por el Instituto Nacional de Laboratorios (INLASA) sobre muestras citológicas de las ciudades de La Paz y El Alto (2004 y 2005) indicó que la población con mayor riesgo tiene, entre 25 y 40 años de edad. Esta investigación mostró que la edad media de mujeres con lesiones de bajo grado era de 25 años, con lesiones de alto grado 28 años y con carcinomas in situ 38 años; este estudio concluye que la incidencia del CCU es cada vez más frecuente en mujeres jóvenes y de menor edad<sup>83</sup>.

No existe un registro estadístico oficial sobre el CCU en Bolivia, lo que no permite contar con datos verídicos sobre la mortalidad de mujeres por esta causa. Sin embargo, el 2008, se reporta la incidencia de CCU fue mayor en los departamentos de Potosí con 93.5%, Oruro con 60.9%, en la ciudad de El Alto 43.8 %, en la ciudad de La Paz de 32.2 % y con respecto a la ciudad de Santa Cruz, existe una falencia en las estadísticas de parte de las instituciones de salud<sup>80</sup>.

Una razón importante de la mayor incidencia del CCU en los países en desarrollo es la falta de programas efectivos para detectar los estados precancerosos y tratarlos antes de que se conviertan en cáncer. Los esfuerzos de prevención a nivel mundial se han concentrado en examinar a las mujeres utilizando una prueba de laboratorio denominada Papanicolaou, y destruir o escindir el tejido precanceroso. El test de Papanicolaou, que lleva el nombre de su inventor, el Dr. George Papanicolaou, de la década de los 40, ha dado importantes resultados en la reducción del CCU en los países desarrollados, seguido de un tratamiento necesario. Si las pruebas de Papanicolaou están bien organizadas y las mujeres se someten a las mismas de forma periódica, la incidencia de este cáncer puede reducirse drásticamente <sup>79</sup>.

### **2.8.1 Cáncer de Cuello Uterino y su relación con El VPH**

En los últimos años se han desarrollado múltiples investigaciones clínicas, epidemiológicas, virológicas y de biología molecular que han demostrado que el principal agente etiopatogénico de las lesiones precursoras y del CCU es el VPH <sup>(1, 13, 78)</sup>.

El CCU es causado por la infección persistente de genotipos de VPH-AR. Los genotipos de alto riesgo son la causa de más del 95% de todos los casos de CCU y aproximadamente el 70% del CCU se debe al VPH 16 y 18. La incidencia máxima de la infección por el VPH se presenta en la adolescencia, poco después de la iniciación de la actividad sexual, y la mayoría de las infecciones se resuelven espontáneamente en un plazo de 6 meses - 2 años <sup>(1, 3, 86, 88)</sup>.

Un estudio realizado en Venezuela sobre “Prevalencia y factores de riesgo en la infección por VPH en mujeres asintomáticas”, determinó a través de la técnica Captura de Híbridos II (Hc2), mayor prevalencia (13,2%) de infección por el VPH-AR en mujeres  $\leq$  35 años de edad y de bajo nivel de educación <sup>28</sup>.

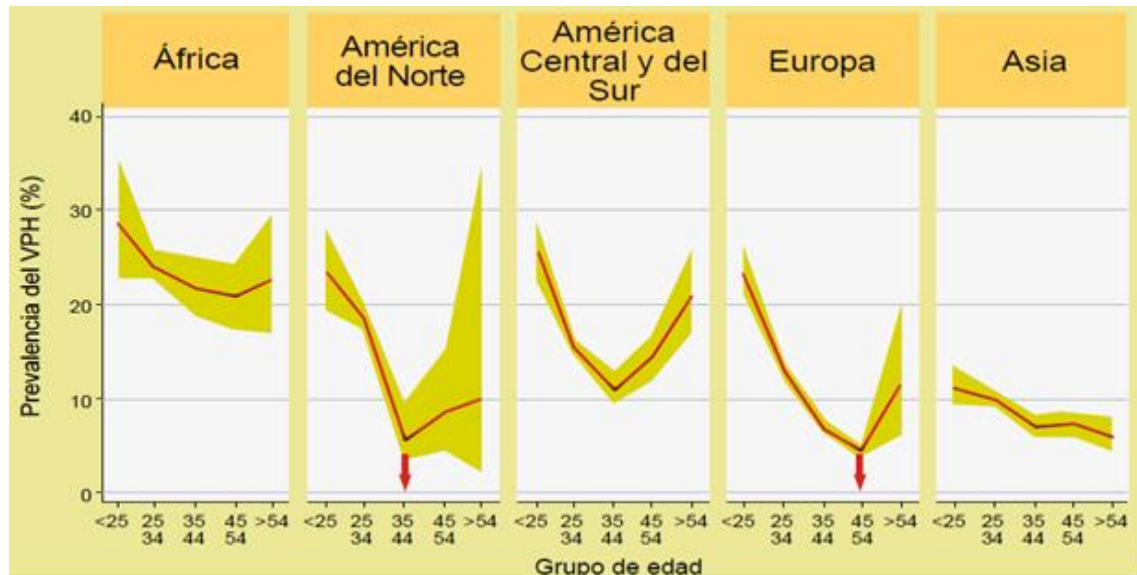
Otro estudio realizado en mujeres Paraguayas sobre “Frecuencia y carga viral del Virus del Papiloma Humano de alto riesgo según el diagnóstico citológico en mujeres Paraguayas por Captura de Híbridos II” determinó VPH-AR en 43% de las mujeres (241/566), observándose una alta frecuencia del 23% en mujeres con ausencia de lesión Intraepitelial

<sup>49</sup>

La evidencia epidemiológica que relaciona a VPH con el cáncer se encuentra sustentada en dos estudios principales <sup>(3, 30, 89)</sup>.

- La Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) efectuó un estudio en el que participaron 22 países, encontrándose la presencia de VPH en el 99.7% de los casos. VPH 16 fue el genotipo más común encontrado en todas las regiones geográficas, seguido por el genotipo 18. El VPH 39 y 59 fueron encontrados exclusivamente en América latina <sup>(14, 24, 30)</sup>.
- En el segundo estudio, donde participaron 13 países y se incluyeron 2000 casos y 2000 controles, se encontró una fuerte relación entre los genotipos de VPH 16 y VPH 18 con Cáncer Cérvico-vaginal. De acuerdo a los resultados de este estudio, los genotipos 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 y 59 también deben ser considerados cancerígenos <sup>30</sup>.

La distribución de los genotipos de VPH ha sido publicada en un análisis combinado de 12 estudios llevados a cabo en 25 países con 3.085. Los quince más comunes de VPH detectados en ambas series, en orden de frecuencia decreciente, fueron los VPH 16, 18, 31, 33, 45, 58, 52, 35, 59, 56, 51, 39, 73, 68 y 82. En todas las regiones se identifica a los mismos 8 genotipos VPH: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 como los más frecuentes, con la leve excepción de que en Europa el VPH 56 ocupa el octavo puesto en lugar del VPH 52. La prevalencia del VPH 16 varía del 52% en Asia al 58% en Europa y la prevalencia del VPH 18 varía del 13% en América Latina al 22% en Norteamérica <sup>(3, 14, 24, 30)</sup>.



**Figura Nro. 18. Prevalencia de VPH específica por edad y por región mundial en mujeres con citología normal <sup>91</sup>.**

La prevalencia de VPH entre grupos de edades no es definida. Muchos de los estudios mencionan que la edad con mayor incidencia es de mujeres jóvenes menores a 25 años, y dicha incidencia va disminuyendo, a medida que va aumentando la edad, hasta alcanzar 5% o menos después de los 55 años. Explicando este fenómeno por cambios existentes en la práctica sexual con la edad y la inmunidad adquirida en el tiempo a la infección por VPH. En otro estudio se observa un segundo pico en la prevalencia de VPH en mujeres a partir de los 55 años de edad, debido a cambios hormonales ocurridos después de la menopausia, el descenso de las defensas del sistema inmune, cambios fisiológicos del cérvix, aumentando la susceptibilidad a la infección o la activación de la infección latente del virus <sup>(14, 24, 91)</sup>.

## 2.9 Factores y Cofactores de Riesgo para el desarrollo de CCU

A pesar de su potencial oncogénico, la infección por VPH es un fenómeno transitorio que puede revertirse espontáneamente o permanecer en estado latente, por lo que se lo considera como una causa necesaria pero insuficiente para el desarrollo de malignidad. Se ha establecido que diversos factores y cofactores de riesgo, tanto exógeno como endógeno, pueden incrementar en asociación con el VPH el desarrollo de esta enfermedad, estos factores son clasificados en tres grupos: <sup>(3, 24,72, 90)</sup>

### 2.9.1 Factores del hospedero

Estos factores incluyen comportamiento sexual y paridad, el estado hormonal, factores genéticos y otros relacionados con la respuesta inmunitaria del hospedero: <sup>(18, 24, 30)</sup>

- a) **Elevado número de parejas sexuales**, ya sea la mujer o su compañero a lo largo de su vida y la adquisición del VPH. También el contacto sexual con un varón de alto riesgo (con historia sexual promiscua o frecuentes contactos con mujeres que ejercen la prostitución) <sup>(18, 24, 31)</sup>.
- b) **Actividad sexual a temprana edad**, Las adolescentes que comienzan sus relaciones sexuales tempranamente tienen mayor riesgo desarrollar neoplasia debido a que en la unión escamo-columnar hay proliferación activa, lo que conduce a la transformación celular del epitelio columnar en metaplásico y de este a escamoso. La zona escamo-columnar es altamente sensible a la acción carcinogénica de los genotipos de VPH y el hecho de infectarse con estos virus en etapas tempranas de la adolescencia, hace que esta zona esté en contacto por un tiempo prolongado con las proteínas oncogénicas de los VPH <sup>(18, 24, 90, 91)</sup>.
- c) **Multiparidad**, se ha asociado tanto con el CCU. Un estudio realizado por la IARC demostró que las mujeres con 7 o más partos tienen 4 veces más riesgo de desarrollar cáncer que mujeres nulíparas, y que el riesgo incrementa linealmente

con el número de embarazos que llegan a término. El riesgo parece incrementar debido a que, expone la zona de transformación hacia el exocérnix por muchos años facilitando la exposición directa al VPH y posiblemente a otros cofactores. Cambios hormonales inducidos por el embarazo (incrementados niveles de estrógeno y progesterona). Además, una variedad de factores tanto nutricionales, como hormonales, traumáticos y mecanismos inmunológicos, han sido propuestos como coadyuvantes biológicos asociados a la Multiparidad <sup>(18, 24, 90)</sup>.

- d) Edad,** La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas de 18 a 30 años de edad, después de los 30 años la prevalencia decrece. El CCU es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer <sup>(14, 18, 24, 91)</sup>.
- e) Predisposición genética,** Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad <sup>(18, 31, 90, 91)</sup>.
- f) El consumo de tabaco,** ha sido bien argumentado en muchos estudios, mostrando una moderada y significativa asociación con el desarrollo de CCU. Reportes actuales, muestran que el riesgo que representa este factor en la aparición del CCU está relacionado con la intensidad, la duración o la cantidad de cajetillas de cigarros por años. El hecho de haberse detectado nicotina en el mucus cervical de fumadoras corrobora la hipótesis de la posible acción sinérgica entre el cigarro y la infección por VPH para el desarrollo de lesiones premalignas de alto grado y el CCU <sup>(22, 24, 30)</sup>. La nicotina activa una reacción enzimática que inhibe el mecanismo de la apoptosis.

**g) Consumo de Alcohol**, una investigación realizada recientemente revela que el epitelio de la boca es de estructura y semejante al epitelio vaginal y al cuello uterino, se vinculan con el VPH 16 y 18. Este mismo estudio sostuvo que el ingerir alcohol y consumir tabaco promueven la infección por VPH, se conoce que el etanol presente en las bebidas alcohólicas inhibe la producción de la proteína p53. Combinar tabaco, alcohol con el VPH y células epiteliales de la boca es una fórmula para producir cáncer oral <sup>(14,18)</sup>.

### 2.9.2 Factores medio-ambientales o exógenos:

El uso de anticonceptivos orales, consumo de tabaco, dieta, trauma cervical, y coinfecciones con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otros agentes de transmisión sexual <sup>(18, 24, 34, 90)</sup>. Pueden ser factores de riesgo para CCU:

**a) Uso prolongado de anticonceptivos orales**, estudios han reportado que el uso de anticonceptivos orales por más de 5 años se asocia significativamente con el desarrollo de CCU. Aunque aún no existen datos sobre el mecanismo por el cual las hormonas pueden incrementar el riesgo de desarrollar este cáncer en mujeres infectadas con VPH, se ha determinado que las hormonas podrían promover la integración del virus al genoma celular, induciendo la expresión de E6 y E7. Otro estudio demostró que el estradiol estimula la transcripción de E6 y E7 en líneas celulares que tienen integrado VPH 16 en su genoma <sup>(14, 18, 91, 92)</sup>.

**b) Coinfección con otros virus**, como el del herpes simple (HSV) tipo 2, probablemente debido a la cervicitis crónica, citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipos 6 y 7 (HHV-6), detectados todos en el cérvix. La inmunodepresión debido a la coinfección por VIH, es un factor determinante de progresión neoplásica. El mecanismo por el cual otras enfermedades infecciosas participan en el ciclo natural de la infección por VPH podría ser principalmente por la inducción

de un proceso inflamatorio crónico que genere un daño genotóxico por la presencia de cantidades importantes de especies oxidativas reactivas. Por ejemplo, un estudio realizado con líneas celulares de carcinoma cervical que fueron infectadas con *chlamydia Trachomatis* secretaron abundante cantidad de citocinas proinflamatorias, en comparación con aquellas células no infectadas, sugiriendo que la coinfección chlamydia-VPH y su asociación con la carcinogénesis cervical están íntimamente relacionadas a un proceso inflamatorio y al incremento en la expresión de IL-10, esta interleuquina inhibe la producción de IL-12 por las células dendríticas, una citocina fundamental en la producción de una respuesta inmune celular<sup>(14, 18, 30, 31, 90, 91)</sup>.

c) **Dieta y el estado nutricional**, varios estudios mostraron una relación inversa entre el riesgo de desarrollar CCU con las concentraciones en suero de B caroteno, vitamina C y tocoferol. Sin embargo, los resultados de varios estudios experimentales han sido negativos, por lo que la relación de éstos y otros elementos nutricionales tienen relación con el proceso de carcinogénesis queda todavía en duda<sup>(14, 18, 22, 30)</sup>.

### 2.9.3 Factores virales relacionados con VPH

La infección con ciertos genotipos específicos de VPH, coinfección con otros tipos y variantes, carga viral y la integración del genoma viral. Podrían también tener rol en el desarrollo de CCU.

a) **Genotipo viral**, es el factor de riesgo más importante de persistencia viral y de progresión hacia una lesión preinvasiva. Los VPH 16 y 18 son los que presentan el mayor riesgo de progresión<sup>(72, 90)</sup>.



El VPH 16, presenta un riesgo absoluto de diagnóstico de precáncer cerca del 40% después de 3 a 5 años de una infección persistente. El riesgo de precáncer en una mujer con más de un genotipo de VPH es mayor que otra con un solo genotipo. VPH 16 causa la mitad de los CCU en todo el mundo, VPH 16 persiste un tiempo más prolongado que cualquier otro genotipo y su persistencia está altamente asociada con cáncer, este genotipo es el principal causante de otros cánceres anogenitales y oro-faríngeos. El genotipo VPH 18 está asociado a una mayor proporción de adenocarcinomas, y el VPH 45 se ha encontrado en una elevada proporción de cáncer y lesiones premalignas <sup>(14, 34, 38, 72, 90)</sup>.

- b) *Persistencia viral***, común entre los tipos virales de alto riesgo y factor determinante en el desarrollo a cáncer. La persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios dado que las proteínas virales interfieren con los puntos de control del ciclo celular e inducen inmortalización de los queratinocito <sup>(14, 34, 72, 90)</sup>
- c) *Carga viral***, correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. El VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros genotipos virales. La medida de la carga viral no siempre es clínicamente útil. Una carga viral elevada no implica un incremento prospectivo de riesgo, excepto para el VPH 16. Se sugirió que una carga viral elevada indica una mayor posibilidad de integración del DNA viral en el genoma del huésped. Sin embargo, es discutible la utilidad de medir la carga viral. Los niveles se detectan mediante PCR en tiempo real que determina el número de copias de VPH por equivalente celular, o también por captura de híbridos II o de segunda generación (hC2) que valora unidades relativas de luz (URL) de forma semicuantitativa, dando una idea aproximada del número total de copias virales de la muestra. Puede haber una carga viral muy elevada y ser atribuida a una reciente infección de lesiones menores, análogo a las verrugas benignas. En el caso de infección por los tipos VPH 16 y 18 y citología normal, una carga viral elevada, determinada por PCR en tiempo real, si se asocia con mayor riesgo de progresión a

carcinoma invasivo y cáncer. La carga viral determinada por HC2 muestra en general un incremento progresivo paralelo a la progresión de la lesión, sin embargo debe tenerse en cuenta que una carga viral baja no es excluyente de lesión grave, un 30% de LIEAG y un 46% de carcinomas invasores presentan valores de detección inferiores a 100 URL, y un 8% de LIEAG y un 15% de los carcinomas invasores presentan incluso valores inferiores a 10 URL <sup>(72, 90, 91)</sup>.

*d) Integración del genoma viral* en el genoma del huésped se asocia con cáncer invasivo y podría ser un biomarcador importante para distinguir una lesión preinvasiva de una infección por VPH. Sin embargo, no todas las mujeres con cánceres invasivos presentan una integración viral notable. Observándose que se requiere una actividad transcripcional para mantener el desarrollo del cáncer <sup>(22, 34, 89, 90)</sup>.

## 2.10 Diagnóstico

### 2.10.1 Antecedentes de Diagnóstico

Aunque en los últimos tiempos se ha dado un desarrollo científico en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad neoplásica cervicouterina aún, no logra esto modificar el riesgo de muerte a nivel poblacional <sup>(41, 89)</sup>. El VPH no prolifera en cultivos celulares convencionales, y los virus solo proliferan en células de diferenciación y estas no pueden mantenerse en cultivo; también los ensayos serológicos tienen utilidad limitada debido a que la sensibilidad no es adecuada y el número de falsos negativos no está acorde con niveles de confiabilidad. La infección produce una respuesta inmunológica humoral frente a los antígenos de la cápside y los anticuerpos son detectables durante años, lo que impide distinguir entre infecciones recientes o pasadas. Estudios recientes en población de alto riesgo han demostrado que la adición del test de VPH a la citología cervical en el Screening aumenta la sensibilidad en la detección de LIE-AG y CCU. Las infecciones por

VPH pueden ser diagnosticadas a través de estudios citológicos, histopatológicos y pruebas moleculares <sup>(41, 89, 93, 100)</sup>.

### **2.10.2 Pruebas Screening de prevención para el desarrollo de CCU**

Para prevenir el desarrollo de CCU en la población femenina es muy importante que la mujer asista a revisiones ginecológicas habituales y con la realización regular de la citología, permita el diagnóstico de las lesiones premalignas, de tal forma, que su tratamiento evite la evolución de lesiones invasivas. En caso de un resultado citológico anormal, el ginecólogo ve la necesidad de realizar más pruebas y estudios con la finalidad de llegar a un diagnóstico definitivo <sup>(14, 94)</sup>.

#### **2.10.2.1 Método Citológico convencional o test de Papanicolaou**

El método citológico o Papanicolaou, se basa en la detección de alteraciones en las células de la región cérvico-vaginal, fue introducido en 1940 por el Dr. George Papanicolau. Los programas de diagnóstico precoz de CCU mediante citología cervical han sido efectivos en la reducción de la incidencia de CCU en los países desarrollados. En EEUU y Europa se ha disminuido el CCU en un 70%, a pesar de que este método es solo moderadamente fiable y no consigue una alta sensibilidad y especificidad. Pese a su éxito, la citología tiene limitaciones importantes, siendo los falsos negativos el principal, debido a una marcada variabilidad en función del medio en que se realiza, del control de calidad en todo el proceso desde que se toma la muestra hasta que se procesa y posteriormente se interpreta, baja reproducibilidad del método, con un amplio rango de sensibilidad, especificidad y la necesidad de una organizada infraestructura sanitaria para llevar a cabo todo el cribado. Estas limitaciones conllevan a una serie de hechos: una proporción considerable de resultados falsos-negativos (sensibilidad), elevada frecuencia de resultados falsos-positivos (especificidad), variabilidad entre diferentes observadores, falta de precisión en el diagnóstico global <sup>(11, 14, 89, 93)</sup>.

Para la obtención de la muestra se hace uso de un aparato llamado espéculo, que se coloca dentro de la vagina, evitando traumas cérvico-vaginales, para poder visualizar el cuello del útero. Con la espátula de Ayre se toma la muestra y se coloca el material en la placa de vidrio. La toma de muestra endocervical se realiza con un cepillo pequeño (cytobrush) endocervical y girando suavemente sobre el conducto endocervical se toma una muestra representativa, la cual se extiende en el extremo inferior del portaobjetos a lo largo de la lámina y en un solo sentido, quedando una lámina fina y transparente al microscopio, el material extendido en el portaobjetos, se fija con alcohol al 96% o con spray fijador citológico, posterior se verifica los datos del paciente, número de placa y se envía al laboratorio para su análisis <sup>(68, 79,93)</sup>.



**Figura Nro. 19. Test de Papanicolaou** <sup>93</sup>

Se recomienda la realización de la citología a mujeres que hayan iniciado actividad sexual, que hayan sido sometidas a histerectomía y con edades comprendidas entre 25 y 69 años <sup>(41, 89, 94)</sup>.

### 2.10.2.1.1 Conductas según reporte de citología

Resultados del diagnóstico citológico, incluye el esquema de seguimiento: <sup>(14, 68, 79, 89)</sup>

- a) La citología cervical se realizará cada tres años en mujeres con dos citologías previas anuales consecutivas, con resultado negativo a infección por VPH, displasia o cáncer <sup>(68, 89)</sup>.
- b) Si un resultado de citología reporta cambios benignos, se analiza para dar un tratamiento adecuado y continuar con el control citológico trimestral o semestral y cuando sean dadas de alta reiniciarán su vigilancia anual. Las mujeres con resultado positivo a procesos inflamatorios inespecíficos persistentes deben continuar con exámenes anuales hasta que tengan dos resultados anuales consecutivos negativos <sup>(14, 89)</sup>.
- c) Si la citología es reportada como anormal, la paciente debe ser remitida a la unidad de Colposcopia y posterior a la unidad de Patología Cervical <sup>(79, 89)</sup>.

### 2.10.2.1.2 Reporte de resultados

Actualmente se emplea el *Sistema Bethesda* que introdujo el término lesión intraepitelial de alto grado (displasia moderada, severa y cáncer in situ) y lesión intraepitelial de bajo grado (displasia leve, VPH). También se incluye en esta categoría el término ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado), otra variedad de lesiones ASC-H, que se emplea si no se puede excluir una lesión de alto grado. El término AGUS son, células glandulares de significación indeterminada y por último se ha incluido la categoría de “adenocarcinoma in situ endocervical” (AIS) <sup>69</sup>.

### 2.10.2.2 Colposcopia

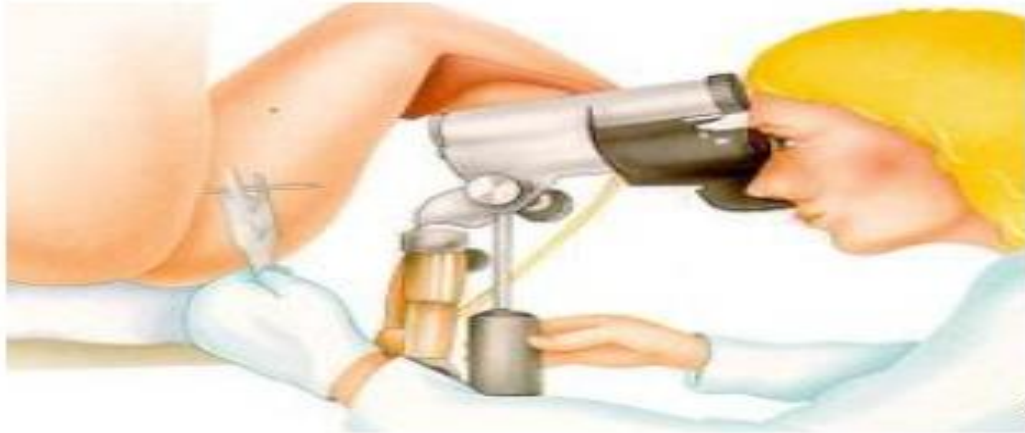
El objetivo de la colposcopia es aumentar la sensibilidad de la citología. Este estudio permite la confirmación de sospecha de lesión a nivel del cuello del útero; descartar invasión; establecer el grado de la lesión; diagnosticar neoplasias; seleccionar la conducta terapéutica y el tipo de tratamiento, si precisa; determinar las características de la lesión: extensión, afectación glandular <sup>(14,79, 89, 94)</sup>.

La colposcopia, que consiste en la utilización de un microscopio especial (colposcopio) para observar y examinar el cuello uterino vía vaginal. Este instrumento magnifica o amplía la imagen de la parte exterior del cuello uterino, en caso de observar anomalías mediante el colposcopio para completar el estudio, lo que se hace es extraer una pequeña muestra de tejido (Biopsia) <sup>(14, 68, 89)</sup>.

La visión directa del cuello uterino a través del espéculo, apenas ofrece información, es necesario el uso del colposcopio para estudiar e identificar cambios mínimos inapreciables a simple vista, que son la manifestación de alteraciones patológicas, pudiendo diferenciar el tejido normal del anormal, así la morfología de las lesiones o procesos patológicos y localizar el área más sospechosa para obtener una biopsia. Los hallazgos anormales durante una colposcopia pueden ser: patrones anormales en los vasos sanguíneos, parches blanquecinos (visibles por la aplicación de ácido acético en la zona de la lesión) en el cuello uterino y áreas inflamadas, erosionadas o atróficas (tejido desgastado). Cualquier de estas anomalías puede sugerir cambios precancerosos y cancerosos <sup>(16, 41, 68, 94)</sup>.

La colposcopia no tiene indicación en el cribado poblacional, se ha reservado para el estudio de las mujeres con citología anormal o si las características clínicas lo aconsejan. En general, la colposcopia está indicada en: Diagnóstico de la citología anormal; mujeres VPH-AR positivas mayores de 30 años; Cuello clínicamente sospechoso, incluso si la

citología es normal; evaluación de lesiones de vagina, vulva, y ano; seguimiento sin tratamiento de mujeres seleccionadas con un diagnóstico de LIE-BG;



**Figura Nro. 20. Colposcop**

ia<sup>93</sup>

El estudio colposcópico cuenta con los siguientes pasos: Anamnesis; Evaluación clínica de los genitales externos; Aplicación del espéculo dentro de la vagina, debe ser introducido sin lubricantes y evitando traumas cérvico-vaginal; obtención de muestras para examen bacteriológico; Obtención de muestra exo y endocervical; Observación directa del cérvix, limpieza de secreciones o moco con solución fisiológica y visión eventual con el uso de filtro verde; observación colposcópica después de aplicar solución de ácido acético al 5% con torunda y observación de los cambios graduales que se producen en los epitelios, (test de IVA: inspección visual con ácido acético); aplicación de Lugol y observación de los cambios (test de Schiller) <sup>(68, 89)</sup>.

#### 2.10.2.2.1 Reporte de resultados

La clasificación Internacional comprende lo siguiente: 1) hallazgo colposcópico normal: Epitelio estratificado escamoso originario; Epitelio cilíndrico; Zona de transformación. 2) Hallazgo colposcópico anormal: a) zona de transformación atípica: Mosaico; Punteado; Epitelio blanco; Queratosis; Vasos atípicos. b) carcinoma invasor sospechoso. 3) Hallazgo

colposcópico insatisfactorio (línea escamo-cilíndrica no visible. 4) Varios: Modificaciones inflamatorias; Modificaciones atróficas; Condilomas; Papiloma <sup>68</sup>.

### **2.10.2.3 Test de IVA**

Consiste en observar el cuello uterino (CU) a simple vista después de limpiar el CU con ácido acético, la finalidad es identificar las zonas blanquecinas (lesión acetoblanca) temporales que se forman tras su aplicación lo cual indicaría áreas de epitelio anormal, metaplásico, displásico, anaplásico y posible presencia de VPH <sup>(80, 90)</sup>.

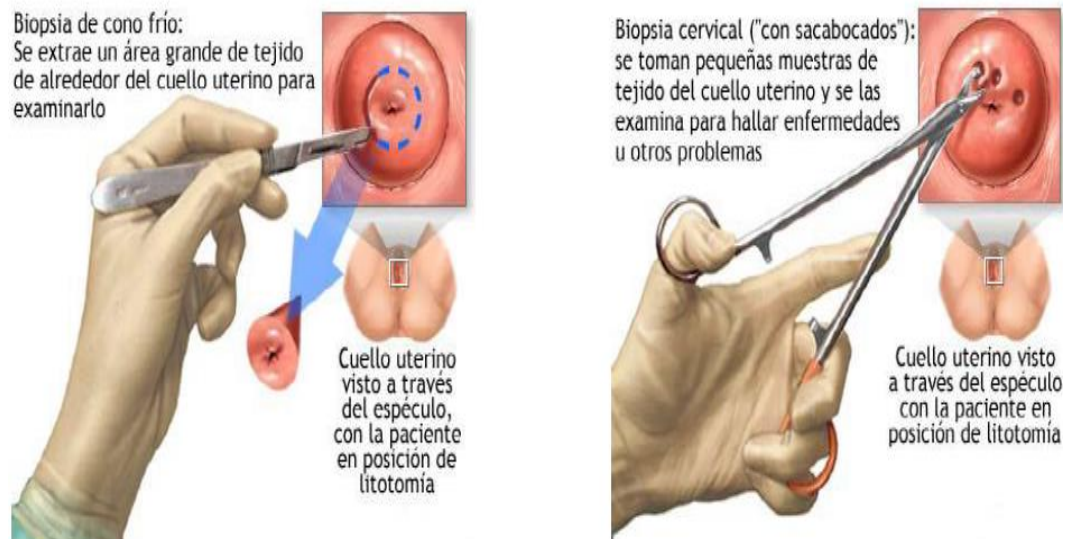
### **2.10.2.4 Test de Schiller**

En 1928 Hinselmann describe como primer método la prueba de Yodo enunciada por Schiller que permitía, destacar el epitelio anormal. La fórmula usada era de yodo puro, yodato de potasio y agua destilada. Una vez aplicado el yodo se espera que el epitelio normal se tiña de color café por la presencia de glucógeno y el epitelio anormal no presentaba tinción <sup>(14, 68, 79, 89)</sup>.

### **2.10.2.5 Histopatología**

Este método permite realizar el diagnóstico definitivo de la lesión. Se lo realiza localizando la zona afectada a través de un colposcopio y posteriormente se toma una muestra de dicha zona para ser analizada al microscopio. Estas muestras son transferidas a patología <sup>(11, 14, 41,89)</sup>.





**Figura Nro. 21. Biopsia** <sup>93</sup>

El estudio histopatológico es el método más exacto y seguro para establecer el diagnóstico de la neoplasia intraepitelial cervical. Dado que la neoplasia intraepitelial es una lesión superficial, el objetivo de la biopsia es remover un fragmento de tejido superficial con inclusión del epitelio y cierta cantidad del estroma subyacente <sup>(68, 89)</sup>.

#### 2.10.2.5.1 Reporte de resultado

El resultado histopatológico puede indicar: Tejido de Cérvix normal; cervicitis aguda o crónica; infección viral (herpes tipo II, VPH); Displasia leve, (NIC I), (LIE-BG); Displasia moderada, (NIC II), (LIE-AG); Displasia severa, (NIC III), (LIE-AG); Cáncer in situ (NIC III), (LIE-AG); Cáncer microinvasor; Cáncer invasor; Adenocarcinoma endocervical o endometrial; Sarcoma y otros tumores; Maligno no especificado o insuficiente para diagnóstico <sup>(68,93)</sup>.

### 2.10.3 Pruebas Moleculares

Las técnicas moleculares son altamente sensibles y específicas, sin embargo, en los programas de tamizaje o Screening, estas técnicas no se aplican debido al elevado costo a la carencia de un tratamiento eficaz para eliminar la infección o incluso prevenirla. La única opción es la vigilancia intensificada para la portadora de VPH de alto riesgo. Hoy en día se está considerando la incorporación de una técnica molecular complementaria a la citología cervical, por su capacidad de detectar VPH en el caso de que la citología sea normal y de informar la presencia de VPH-AR. Existen varios procedimientos moleculares para la identificación del VPH <sup>(9, 41, 89, 93, 96, 101)</sup> que incluyen el ***Southern Blotting, Dot Blot, Hibridación in situ o Hibridación in situ utilizando filtros***. Estos procedimientos utilizan un principio similar: la hibridación de DNA diana, una vez extraído, fragmentado y separado de las células del exfoliado, con cadenas complementarias de ARN o DNA marcadas con moléculas radioactivas, o colorimétricas (sondas), de manera que se puedan identificar las secuencias de DNA correspondientes a determinados tipos de VPH. Algunas de estas técnicas, como el Southern-Blotting, pueden alcanzar una gran sensibilidad y especificidad. No obstante presentan suficientes inconvenientes, o bien necesitan grandes cantidades de DNA viral o bien son de uso demasiado complejo como para utilizarlas en programas de detección precoz, o que tienen pobre sensibilidad y especificidad en el caso de la hibridación in situ utilizando filtros <sup>(14, 89)</sup>.

Los procedimientos, técnicas a ser utilizados en la práctica clínica deben ser de manejo sencillo y de fácil interpretación, es preferible que sean automáticas o semiautomáticas, y presenten una fiabilidad, sensibilidad y especificidad aceptable para la detección de un amplio espectro de tipos de VPH, además de resultar coste-efectivas. A la fecha el test de **Captura de Híbridos 2** (*Hybrid Capture, Digene Diagnostic*) aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration of EEUU*), y la **Reacción en cadena de la polimerasa** (PCR) presentan valores altos de sensibilidad y especificidad, y pueden ser utilizadas a gran

escala de manera automatizada o semiautomatizada. Actualmente estos son utilizados para el diagnóstico y la tipificación de VPH <sup>(14, 54, 58, 89, 101)</sup>.

### **2.10.3.1 Ensayo de Captura de Híbridos 2 (hc2) ó test de DNA del VPH-hc2**

En la actualidad, la técnica de Captura de Híbridos 2 es el gold estándar de la industria para la detección del DNA del VPH. Es la única prueba aprobada por la FDA <sup>(95,96)</sup> para realizar exámenes diagnósticos en muestras de cuello uterino. La prueba detecta la presencia de híbrido de DNA-ARN que son formados por la adición de un cocktail (mezcla) de sondas de ARN para 13 tipos de VPH de alto riesgo y potencialmente oncogénicos (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). La prueba es de tipo semicuantitativa y su resultado es un reflejo de la carga viral, información útil para el seguimiento de las pacientes <sup>(89, 96, 101, 102,)</sup>.

Además, hoy en día la utilización del test de DNA del VPH-hc2 en combinación con la citología cérvico vaginal (CCV) ha demostrado tener una mejor sensibilidad que cualquiera de estas pruebas por separado (98.8% al 100%). La especificidad varía entre el 78% y el 98%, el valor predictivo negativo de ambas pruebas (hc2 + CCV) es del 100%. En los últimos estudios se muestra como este valor permanece elevado a través del tiempo. La evidencia apoya que la prueba hc2 junto con la CCV es costo-efectiva al permitir aumentar el intervalo de tamización de la población femenina sin riesgo. Las dos pruebas negativas predicen con seguridad que el riesgo de desarrollar CCU a 5 años es casi cero <sup>(9, 14, 58, 79, 97, 113)</sup>.

#### **2.10.3.1.1 Principio del procedimiento**

El ensayo se basa en la hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de la señal y detección por quimioluminiscencia. El DNA celular extraído se hibrida con una sonda de ARN específica de VPH. Los híbridos de DNA-ARN resultantes son identificados por

conjugados con fosfatasa alcalina y se detectan mediante un sustrato quimioluminiscente (14, 21, 58, 89, 101).

Varias moléculas de fosfatasa alcalina se conjugan con cada anticuerpo. Un gran número de anticuerpos conjugados se unen a cada híbrido capturado, amplificando así significativamente la señal. A medida que la fosfatasa alcalina unida degrada el sustrato, se emite luz, que se mide en unidades de luz relativas (ULR) en un Luminómetro. La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia del DNA diana en la muestra (21, 93, 101, 102).



**Figura**  
**Nro.**  
**22.**  
**Captura**  
**de**  
**híbridos**  
**21**

Una determinación de ULR igual o superior al valor de corte indica la presencia de secuencias de DNA del VPH de alto riesgo en la muestra, un ULR equivale a 1pg/ml. Una determinación de ULR inferior al valor de corte indica la ausencia de las secuencias de DNA del VPH de alto riesgo o en cantidades inferiores al límite de detección del ensayo. Este método fue validado en diferentes estudios que comprueban su alta especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, por lo que es utilizado en laboratorios eficientes para el diagnóstico de VPH y la identificación de variantes oncogénicas (58, 97, 102).

### 2.10.3.1.2 Aplicaciones clínicas del ensayo hc 2

#### a) Tamización primaria

En numerosos trabajos publicados sobre tamización primaria se ha demostrado que la prueba HCII de VPH de alto riesgo es reproducible y sencilla de realizar con unos costos relativamente bajos. La prueba se puede usar dentro de los programas de tamización ya sea asociado a la CCV o como test inicial seguido de la CCV para los casos positivos. Por otra parte la Agencia para investigación en cáncer (IARC) ha concluido que hay suficiente evidencia que el test de DNA del VPH-hc2 puede reducir la incidencia y mortalidad por CCU. La recomendación indica comenzar con la prueba más sensible que es la hc2 y si el resultado es positivo usar a continuación el CCV <sup>(9, 97)</sup>.

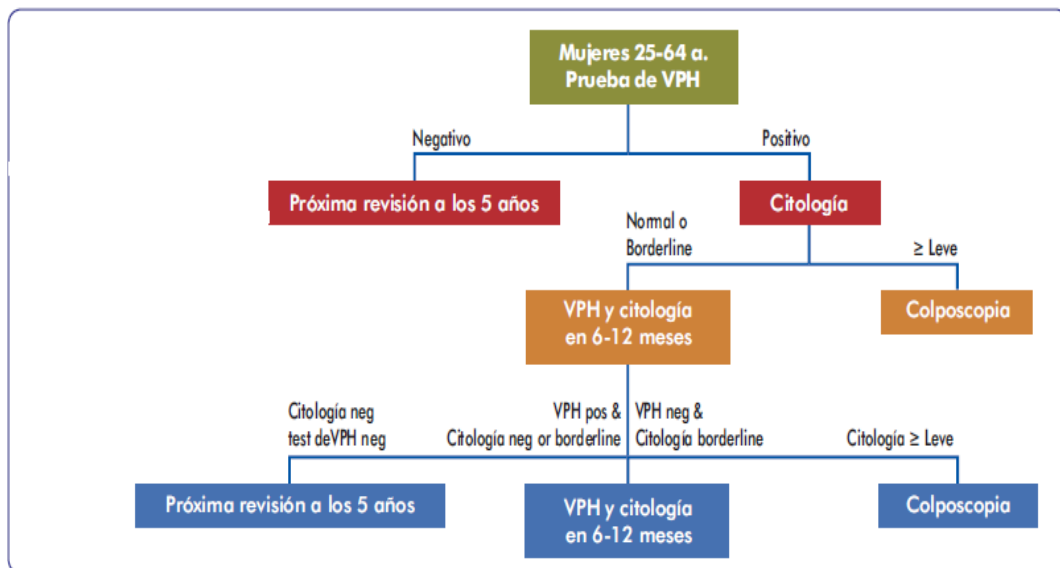
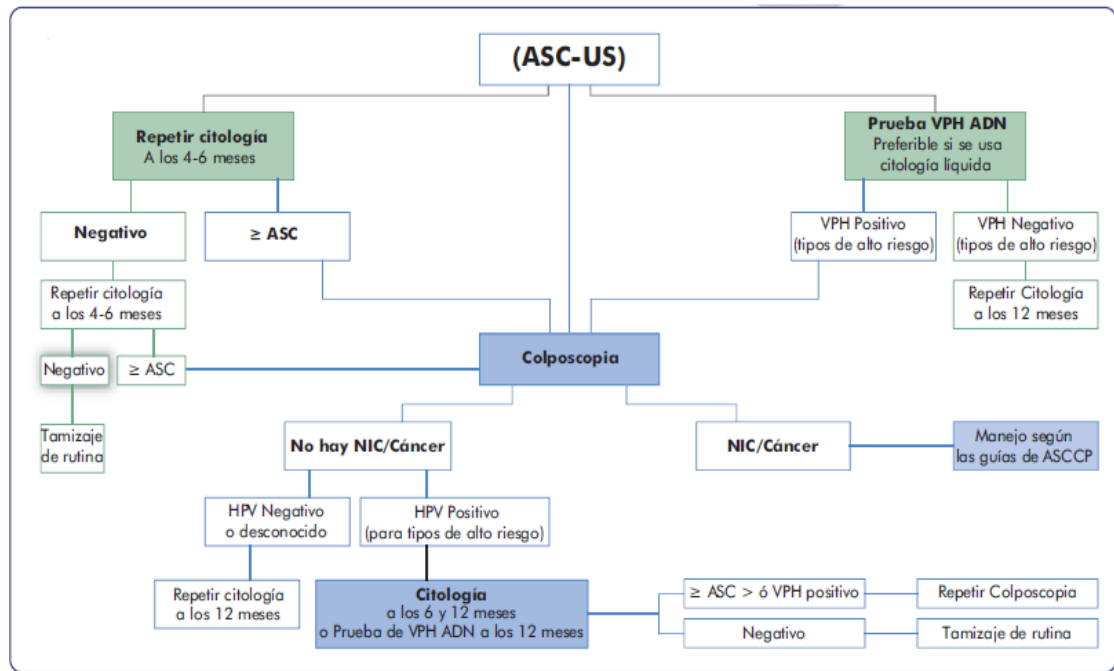


Figura Nro. 23. Algoritmo propuesto para cribado <sup>96</sup>

**b) Estudios de citologías dudosas (ASC-US)**

La utilidad de *hc2* en el estudio de las citologías reportadas como ASC-US (células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado), fue llevado a cabo por un grupo multicéntrico que comparó tres estrategias de manejo clínico: a) remisión a estudio de colposcopia inmediata, b) seguimiento con citologías repetidas y c) realización de la *hc2* identificando los casos relacionados con VPH de alto riesgo y la remisión a colposcopia de estos casos. Los resultados de estos estudios que incluyeron cerca de 5000 mujeres han demostrado que la *hc2* es 14% más sensible que la CCV repetida para detectar LIE-AG, permitiendo hacer un diagnóstico inmediato a diferencia de la citología que demora hasta dos años en hacer el diagnóstico. Cerca del 50% de los ASC-US son positivos para VPH-AR, lo que permite estratificar los casos que deben ser estudiados con colposcopia. La estrategia de realizar la prueba *hc2* en cuanto a costo es más efectiva que otras estrategias <sup>(58,102)</sup>.

Otra meta-análisis más reciente confirma los resultados de sensibilidad y especificidad de la *hc2* en el estudio de las citologías ASC-US. En el año 2001, el consenso de expertos organizado por la ASCCP (Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical), publicó las guías de manejo de mujeres con anormalidades citológicas en donde se incluía las pruebas de tipificación viral para el estudio y manejo de ASC-US, y desde entonces las diferentes guías de manejo clínico las han incluido en sus algoritmos <sup>(99, 113)</sup>.



**Figura Nro. 24. Guía de historia clínica de Mujeres con Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASC-US) <sup>96</sup>**

### c) Seguimiento del tratamiento de LIE-AG

La detección del DNA de VPH ha demostrado gran utilidad en el seguimiento de las pacientes tratadas por LIE-AG, como un marcador de curación después del tratamiento. Esto se basa en el conocimiento de que si no se detecta el DNA de VPH en este grupo de pacientes, la probabilidad de recurrencia es muy baja. En un meta-análisis se analizaron los estudios publicados entre 1996 y 2003 respecto a cuál era la mejor estrategia para el seguimiento de las pacientes tratadas por LIE-AG. En el estudio se compararon el test de VPH-hc2 para VPH-AR y la CCV para predecir lesión residual o recaída. En este meta-análisis, se encontró un valor predictivo negativo (VPN) para el test VPH-AR- hc2 del 98% y para la CCV del 93%. Cuando el test VPH-AR-hc2 se realizó en conjunto con la CCV la sensibilidad fue del 96% y el VPN del 99%, constituyéndose la asociación de VPH-

AR-hc2 y la CCV como la mejor metodología de seguimiento. El alto valor predictivo negativo es el que tiene mayor aplicación clínica para descartar riesgo de recaída o persistencia. Con estos hallazgos los autores proponen un esquema de seguimiento en el cual se practica citología y el test VPH-AR-hc2 a los 6 meses, si los resultados son negativos para enfermedad residual el nuevo control se hace a los 12 meses y si este continua siendo negativo la paciente pasará a esquemas rutinarios de tamización, en caso de ser positiva el test VPH-AR-hc2 y o la citología, se deben realizar estudios complementarios: colposcopia y biopsia <sup>(99, 113)</sup>.

### 2.10.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Este método de amplificación de ácidos nucleicos (PCR), tiene una excelente sensibilidad (10-40 copias virales) y especificidad (100%) y se constituye en la técnica de elección para diagnosticar enfermedades genéticas, parasitarias, bacterianas y virales. La PCR (del inglés de *Polymerase Chain Reacción* o Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se basa en sintetizar “n” veces un fragmento de DNA utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°), de ahí su nombre comercial más conocido: *Taq* polimerasa. Cuando se realiza una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el DNA, *in vitro* esto incluye: La DNA polimerasa; El DNA molde, que contiene la región de DNA que se va amplificar; Dos oligonucleótidos (llamados también *primers*, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.), que son cada uno complementarios a una de las dos hebras del DNA. Son segmentos de DNA de cadena simple, cortas entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22; dinucleótidos (dNTPs), como sustratos para polimerizar nuevo DNA; y las condiciones para que la enzima realice su función: pH; Iones divalentes, podría usarse ( $Mg^{2+}$ ) en forma de  $MgCl_2$ ,  $KCl$ , dependiendo de cada polimerasa, que actúan como cofactor de la polimerasa <sup>(104, 106, 107, 110)</sup>.

Para el caso de VPH, el DNA extraído y purificado de muestras clínicas se amplifica por PCR empleando iniciadores (“*primers*”) que permiten amplificar un fragmento del gen L1



del genoma viral. Por este método es posible detectar, prácticamente los 40 VPH que infectan el tracto anogenital en una sola reacción, los iniciadores más utilizados actualmente son: PCR (MY09/11), permite identificar a los 40 tipos que infectan el tracto genital; PCR (GP5/GP6), permiten identificar a 37 tipos que infecta el tracto anogenital y PCR (L1C1/L1C2), permiten identificar a 37 tipos que infectan el tracto anogenital. Para realizar la técnica PCR es preciso disponer de laboratorio y personal especializado, dada la posibilidad de contaminación cruzada y de interpretación diagnóstica errónea si no se tiene el material y entrenamiento adecuados <sup>(9, 14, 41, 30, 54, 106, 107, 110)</sup>.

El proceso incluye la fase de **desnaturalización**, durante la cual las dobles cadenas del DNA se abren o desnaturalizan, quedando en forma de cadenas sencillas; lo que ocurre a 93-95° C; a continuación se inicia la fase de **alineamiento o hibridación**, que permite el “apareamiento” de cada una de las dos cadenas cortas de los oligonucleótidos con las hebras separadas del DNA molde. Luego se inicia la fase de **Elongación o Polimerización** (72°C) temperatura a la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, de extensión de oligonucleótidos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del DNA molde en dirección 5` a 3`. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento y extensión) el tramo de DNA elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo y así sucesivamente <sup>(104, 106, 107, 110)</sup>. Después de estos ciclos, finalmente se produce la **Elongación final** que se lleva a cabo a una temperatura de 70 a 74° C durante 5 a 15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con esta fase se asegura que cualquier DNA de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

## 2.11 Tratamiento

No existe un tratamiento específico que erradique el DNA viral. La elección del tratamiento depende del tamaño y extensión de las lesiones. En si se utilizan varios tratamientos dependiendo de la recidiva, persistencia y del grado (alto y bajo) de las lesiones. Los tratamientos específicos como crioterapia, laser (para lesiones cervicales), ácidotricloroacético, laser de CO<sub>2</sub>, crioterapia (para lesiones vaginales), Podofilinotoxina al 0,55%, imiquimoid al 5%, crioterapia, técnicas quirúrgicas, laser de CO<sub>2</sub>y otros (lesiones vulvares y genitales externos). En el caso del tratamiento para CCU se sigue un protocolo, es decir, un conjunto de normas (plan de tratamiento) basadas en la experiencia científica. Estos protocolos que se emplean de forma generalizada en todos los hospitales, recogen las indicaciones o limitaciones de tratamiento en función de una serie de factores: edad de la paciente, fase en la que se encuentra la enfermedad, si existen otras enfermedades conjuntas y otros. Por lo que el tratamiento no será el mismo en todas las pacientes. Los tratamientos empleados en el cáncer de cérvix generalmente son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia o una combinación de métodos <sup>(8, 91, 93, 94, 99, 103, 105)</sup>.

## 2.12 Prevención/ Profilaxis de la Infección por VPH

Existen varios métodos de prevención de la infección y desarrollo de las lesiones causadas por VPH. Entre estos se incluyen la abstención de toda actividad sexual; tener menos parejas sexuales y evitar las relaciones sexuales con personas que han tenido muchas parejas sexuales. Los condones proporcionan protección (pero no del todo). Para personas que no han iniciado una vida sexual las vacunas profilácticas pueden proteger de algunos tipos de VPH, sin embargo no necesariamente aseguran la protección contra todos los tipos de VPH<sup>2</sup>. Además en nuestro medio no se sabe si estas vacunas causaran cierto grado de protección, ya que aun no se conoce los tipos de VPH que prevalecen, debido a falta de estudios <sup>(39, 77, 103, 108)</sup>

Es recomendable que todas las mujeres desde el inicio de su vida sexual, se realice un control ginecológico cada año, con la realización del examen citológico (Papanicolaou). El estudio indicará la presencia o ausencia de células anormales en el cérvix <sup>33</sup>, En caso de que existiera anomalía celular, permitirá proseguir con otros exámenes como Colposcopia, Biopsia, para poder definir el grado de la lesión y así poder dar un tratamiento específico <sup>(39, 69, 77, 103)</sup>.

Entre las vacunas profilácticas contra el virus del papiloma humano, se hace referencia a la vacuna cuadrivalente o tetravalente denominada Gardasil, autorizada en 2006, contiene partículas similares a virus de los genotipos 6,11, 16 y 18. La vacuna se produce utilizando levadura como sustrato y contiene sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo como adyuvante, protege contra el desarrollo de las infecciones de 4 tipos de VPH 6, 11, 16 y 18, y muestra una eficacia del 96% frente a infección persistente del 100% a los 5 años frente a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 2-3 y a los 18 meses frente a Neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) y verrugas genitales. (Toda vez que la mayoría de condilomas son producidos por los VPH 6 y 11 responsables de la mayoría de las enfermedades relacionadas con el VPH, como el cáncer de cérvix, vagina, ano, vulva, verrugas genitales y papilomatosis respiratoria recurrente). El objetivo de esta vacuna preventiva es crear anticuerpos que favorezcan a la respuesta inmune humoral en personas no infectadas, activando respuestas rápidas y eficaces para controlar el VPH si alguna vez la persona entra en contacto con este virus. De acuerdo a datos que se tienen, el uso de la vacuna en España, antes del inicio de las relaciones sexuales (9 y 14 años) conseguirá una reducción muy importante de la enfermedad, siempre y cuando existan coberturas vacúnales por encima del 80% <sup>(8, 15, 54, 68, 104, 108)</sup>.

La segunda vacuna contra la infección por VPH es bivalente, de nombre comercial Cervarix, fue autorizada en 2007. Contiene partículas similares a virus de los tipos 16 y 18 del VPH, por lo tanto es activa frente a los tipos de VPH 16 y 18, la eficacia es del 100% a los 5 años frente a infección persistente y NIC <sup>(8, 13, 15, 54, 68, 104, 108)</sup>.

Algunos estudios con Cervarix que avalúan la protección cruzada frente a otros tipos de VPH, destacando el 31 y 45, que son el tercer y cuarto tipo oncogénico más prevalente en el mundo, también el VPH 52 y 58. Sin embargo a aquellas mujeres infectadas por algún tipo de VPH, con la administración de la vacuna podría evitar la infección por los tipos restantes <sup>(27, 39, 68, 77, 108)</sup>.

También se están desarrollando otras vacunas, no solo con efectos profilácticos, sino terapéuticas, con el objetivo de prevenir la aparición de lesiones cancerígenas desarrolladas en personas infectadas por VPH<sup>2</sup>. Estas vacunas aun requieren de estudio avanzado <sup>(8, 39, 54, 68, 77, 108)</sup> y finalmente como varios estudios indican que los varones pueden resultar vectores del VPH, es recomendable el uso de condón; sin embargo el método no es suficiente. También se plantea la circuncisión como procedimiento para la reducción de adquisición y transmisión del virus <sup>(15, 38, 39, 77)</sup>.

### 3. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

EL CCU es un grave problema de salud pública mundial. El CCU es el segundo tipo de neoplasia más frecuente en las mujeres de todo el mundo después del cáncer de mama. Si bien, aproximadamente el 90 % de los casos de CCU son causados por VPH, no todas las infecciones por VPH desencadenan CCU.

La mayoría de las infecciones incluyendo aquellos causados por VPH oncogénicos 16 y 18, se resuelven espontáneamente en 1 a 2 años sin terapia, tratamiento alguno y sin secuela clínica para la paciente. Sin embargo el CCU es altamente prevalente.

Está demostrado que los VPHs de alto riesgo son responsables de múltiples lesiones anogenitales tanto en varones y mujeres, algunos de estos genotipos virales tienen capacidad de persistencia, lo que conduce al desarrollo de lesiones precancerosas y cáncer. Sin embargo también, existen varios factores de riesgo que favorecen el desarrollo de CCU; entre estos el consumo de tabaco, alcohol, el uso de anticonceptivos orales, la multiparidad, el número de parejas sexuales, edad de inicio de actividad sexual. La existencia de estos cofactores potencia/conduce a la persistencia del VPH y a la progresión de las lesiones hasta establecer el cáncer.

En nuestro medio la prevalencia y mortalidad de mujeres por CCU, es preocupante por su frecuencia y el impacto negativo social y económico en la población, cada día fallecen 3-5 mujeres por CCU de cada 100.000 mujeres.

Los estudios hechos son insuficientes para establecer la situación real de VPH en nuestra población, principalmente de los virus de alto riesgo oncogénico y de los factores que promueven la persistencia del virus. El conocimiento del rol de VPH en lesiones intraepiteliales y cáncer como la circulación de VPH de alto riesgo oncogénico en población femenina permitirá establecer la importancia de este virus en nuestra población,

y si este se relaciona con la alta prevalencia de CCU en nuestro medio. Además de establecer los cofactores de riesgo de nuestra población: consumo de tabaco, alcohol, anticonceptivos orales, multiparidad, aborto, cesaríá etc., que ayuden a la persistencia de este virus para el desarrollo de cáncer.

En este estudio se plantea la determinación de VPH de alto riesgo en población femenina, para lo cual se utilizará el ensayo de Captura de Híbridos de VPH de alto riesgo (hc2-AR) el único ensayo aprobado por el FDA y UE para el diagnóstico. Esta prueba tiene una sensibilidad de 94-96% y tiene un valor predictivo negativo mucho mayor que el de la citología cuando esta se la utiliza como único ensayo. Varios estudios han demostrado que la determinación de VPH, permite extender los intervalos de seguimiento citológico sin riesgo hasta por cinco años de la paciente VPH - AR (-) o VPH de bajo riesgo. Este examen reduce el gasto de la revisión ginecológica preventiva, que conlleva para los sistemas sanitarios cuando se practica el PAP anualmente <sup>(95, 97, 99, 113)</sup>.

Como el ensayo identifica de modo integral los 13 VPH oncogénicos más frecuentes, las muestras positivas serán luego analizadas utilizando también técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para tipificar presunción de VPH 16 y 18. Esto permitirá conocer la frecuencia de VPH de alto riesgo oncogénico en nuestra población (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y determinar la importancia de VPH 16 y VPH 18. Esto podría contribuir a analizar la utilización de las vacunas Gardasil y/o Cervarix, y su conveniencia de aplicación en nuestra población (¿Serán adecuadas para prevenir las infecciones causadas por el VPH en nuestra población?, toda vez que estas protegen solo contra algunos tipos de VPH 6, 11, 16 y 18).

Así mismo, además con ayuda de un cuestionario realizado a la población en estudio, se podrá analizar, la posible relación del VPH y cofactores de riesgo para el desarrollo de CCU.

## **4. HIPOTESIS**

### **4.1 Hipótesis General**

En base a los factores de riesgo de infección por VPH el CCU y las características socio-culturales de la población en estudio, se plantea que la frecuencia de VPH-AR de la ciudad de La Paz es menor a la ciudad de Santa Cruz en las gestiones 2010 y 2011.

### **4.2 Hipótesis Específicas**

- La frecuencia de infección del VPH-AR es mayor en mujeres menores de 40 años en ambas poblaciones estudiadas.
- El consumo de tabaco, alcohol y anticonceptivos orales está asociado con la presencia de VPH-AR/CCU, es importante en la población VPH-AR/CCU positiva.
- El número de partos, cesáreas y abortos influyen en el aumento de la frecuencia de casos positivos para el VPH-AR.
- La frecuencia de VPH 16 es mayor en relación a la frecuencia de VPH 18 en ambas poblaciones de estudio.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

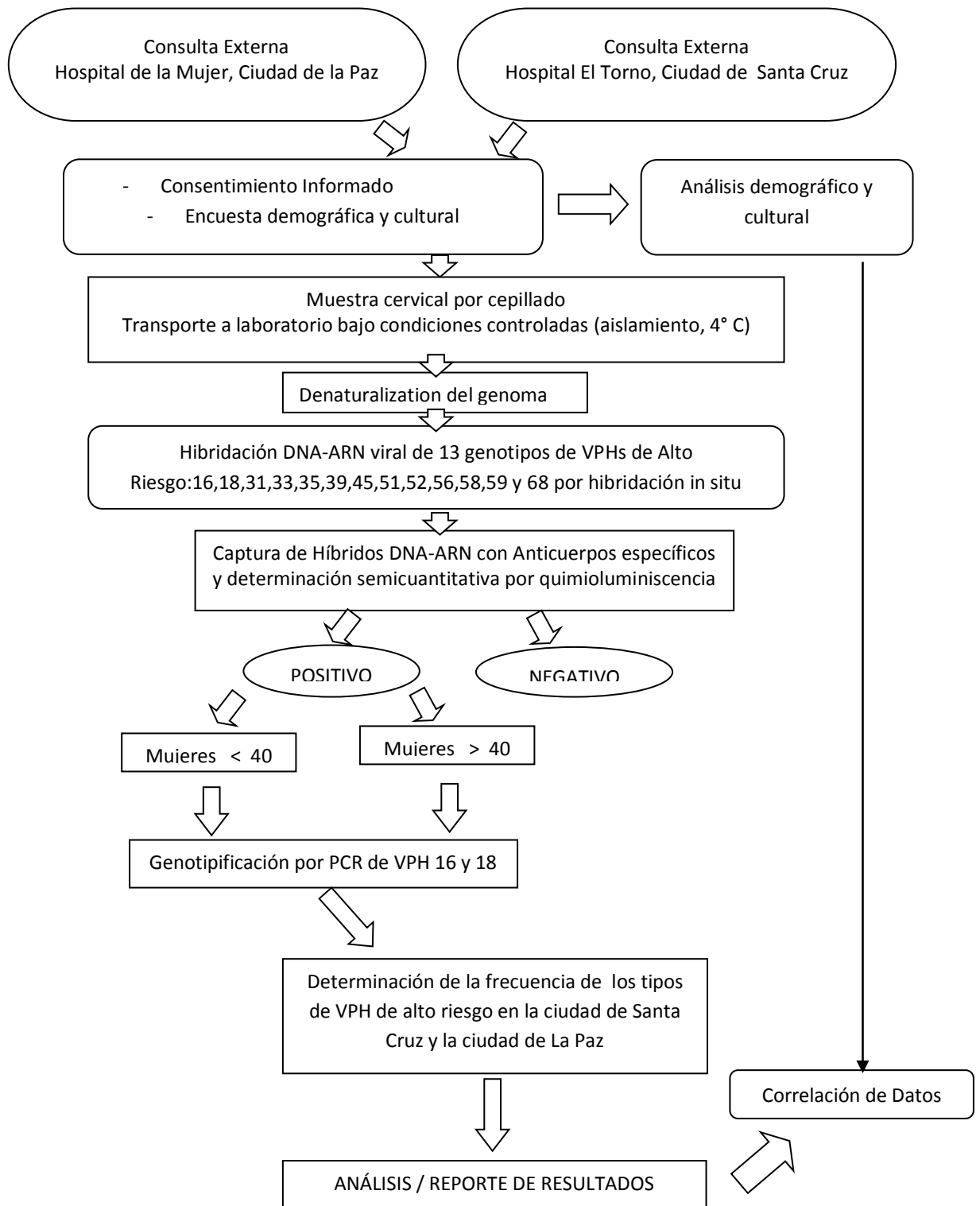
- Determinar y relacionar el virus de Papiloma Humano – Alto Riesgo (VPH-AR) oncogénico con factores de riesgo en la población femenina de la ciudad de La Paz y Santa Cruz en Bolivia que asistieron a consulta ginecológica del Hospital de La Mujer y El Torno respectivamente, en el segundo semestre de la gestión 2010 y primer semestre de la gestión 2011

### 5.2 Objetivos Específicos.

- Determinar casos positivos para VPH-AR en las poblaciones de estudio de la ciudad de La Paz y de la ciudad de Santa Cruz en relación a la Edad.
- Evaluar el probable rol del consumo de tabaco, alcohol y anticonceptivos orales de la población en estudio con relación a los casos positivos para VPH-AR.
- Determinar el número de partos, abortos, cesáreas de la población en estudio con relación a los casos positivos para VPH-AR.
- Determinar la presencia de los genotipos oncogénicos VPH-AR 16 y 18, en la población positiva para VPH-AR.



## 6. DISEÑO METODOLOGICO



## **7. MATERIAL Y METODOS**

### **7.1 Tipo de estudio**

El presente estudio es de tipo explorativo descriptivo basado en la comunidad de cohorte transversal.

### **7.2 Tamaño de muestra**

Universo de mujeres que cumplen criterios de inclusión, que acuden a consulta externa, en el Hospital de La Mujer en La Paz y El Torno en Santa Cruz durante el segundo semestre de la gestión 2010 y primer semestre de la gestión 2011. El presente trabajo es de tipo explorativo inicial sobre la determinación de la presencia de VPH –AR en la población; por no existir estudios previos de referencia, es que se tomaron muestras a la población, logrando obtener 83 muestras en la población de La Paz y 77 muestras en la población de Santa Cruz.

### **7.3 Descripción del ambiente de Investigación**

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Virología, Inmunidad e Infección, del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud – SELADIS, de la Universidad Mayor de San Andrés. El Instituto SELADIS, es una institución Universitaria con capacidad para desarrollar investigación, enseñanza e interacción Social en diferentes áreas Biomédicas. El presente estudio es desarrollado en el marco del Proyecto Internacional para el estudio de “CCU en mujeres Bolivianas y el VPH” financiado por AECID, la Universidad de Elche, España y la Embajada de España en Bolivia, mediante el cual se logro el financiamiento para el estudio con la aplicación de tecnología molecular aprobada por la FDA y la UE para la detección de VPH de alto riesgo.

## **7.4 Población en estudio**

### **7.4.1 Criterios de Inclusión**

- Población femenina sexualmente activa
- Población femenina bajo consentimiento informado y firmado.
- Mujeres hasta los 60 años de edad.

### **7.4.2 Criterios de Exclusión**

- Mujeres que no hayan iniciado actividad sexual
- Mujeres en periodo de gestación
- Mujeres mayores a 60 años de edad
- No aceptación para la participación en el presente estudio

### **7.4.3 Selección de pacientes e informe consensuado**

Los cepillados fueron obtenidos por médicos ginecólogos especialistas de pacientes que aceptaron participar y contribuir al estudio de consultoría externa, con base en los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron a las pacientes, candidatas a incorporarse en el estudio. Cada participante fue informada de la importancia del estudio, del porque debe realizarse este examen y de los procedimientos a realizar en el momento de la toma de muestra la cuál será realizada por su médico ginecólogo. Se explico que el estudio era de carácter gratuito y que los resultados serian reportados a su médico para complementar su diagnóstico clínico. Se le solicitó a cada una de las participantes su consentimiento por escrito previo a la toma de muestra. En el estudio, se incluyeron así un total de 160 pacientes, de las cuales 83 corresponden a la ciudad de La Paz y 77 a la ciudad de Santa Cruz. Cada una de las participantes llenó información socio-demográfica.

La encuesta se realizo con cada una de las pacientes, en instalaciones de los hospitales de La Paz y Santa Cruz, para la aplicación de la encuesta Socio Cultural, se definió previamente la estructura, que consistía en los datos personales: Nombres, edad, estado civil, hábitos de vida cotidiana: consumo de Anticonceptivos Orales, bebidas alcohólicas, Tabaco; seguido de características Gineco obstétricas. Esta información se aplico con las reservas necesarias y el consentimiento de cada una de las pacientes, en forma individual cuya constancia del consentimiento concluye con la firma al final de la encuesta por el paciente, visto bueno del encuestador y supervisión del médico de turno de la consulta.

### 7.5 Obtención de la muestra biológica

La toma de muestra se realizó con cepillo citológico y medio de transporte certificado y validado para su uso con el ensayo de captura de híbridos. Una muestra recogida con dicho dispositivo proporciona seguridad de que la cantidad de muestra será suficiente para la prueba VPH, comparada con una muestra de citología y que es preservada hasta su ingreso y análisis de laboratorio.

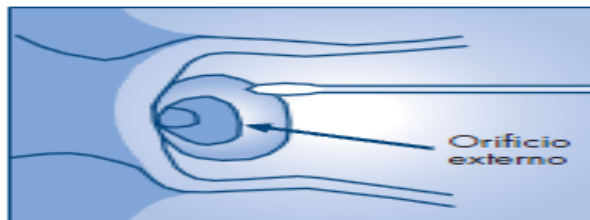


**Figura Nro. 25 Medio de transporte y cepillo citológico <sup>95</sup>**

Las muestras fueron obtenidas directamente del cuello uterino de las pacientes por el ginecólogo especialista al momento del estudio ginecológico. La muestra para VPH se recolecto antes de obtener la muestra para la prueba de citología cervical y antes de aplicar

ácido acético o yodo. Para la colección de muestras se siguió los siguientes procedimientos:

- a) Se retiró el exceso de mucosidad del orificio externo del cuello uterino y de los alrededores del exocérnix con una torunda de algodón.



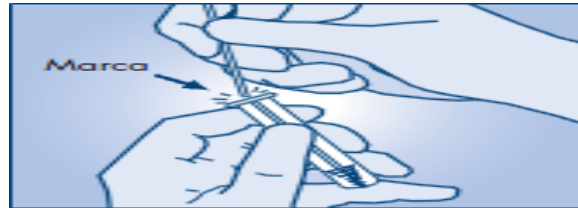
**Figura Nro. 26. Inicio del proceso de toma de muestra** <sup>95</sup>

- b) El cepillo fue introducido entre 1 y 1,5 cm en el orificio externo del cuello uterino hasta que las cerdas exteriores del cepillo toquen el Exocérnix. El cepillo se giró tres veces por completo en sentido contrario a las agujas del reloj.



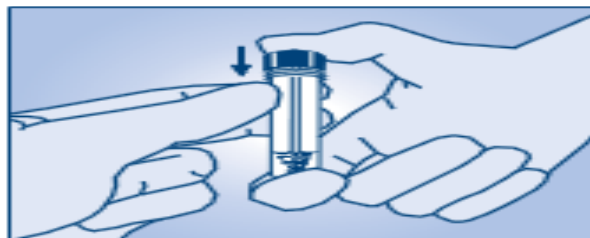
**Figura Nro. 27. Lugar de Toma de muestra. Canal Endocervical** <sup>95</sup>

- c) Colectada la muestra el cepillo fue introducido en el tubo con medio de transporte para preservar las células epiteliales hasta su procesamiento en el laboratorio.



**Figura Nro. 28. Finalización del proceso de Toma de Muestra**<sup>95</sup>

**d)** Inmediatamente las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Virología y fueron refrigeradas. El medio de transporte está validado para preservar las muestras a temperatura ambiente (15- 30°C) hasta 2 semanas. Una vez en el laboratorio, se pueden conservar hasta 1 semana adicional a 4°C – 8°C y hasta 3 meses a -20°C.



**Figura Nro. 29. Preservación de la Muestra**<sup>95</sup>

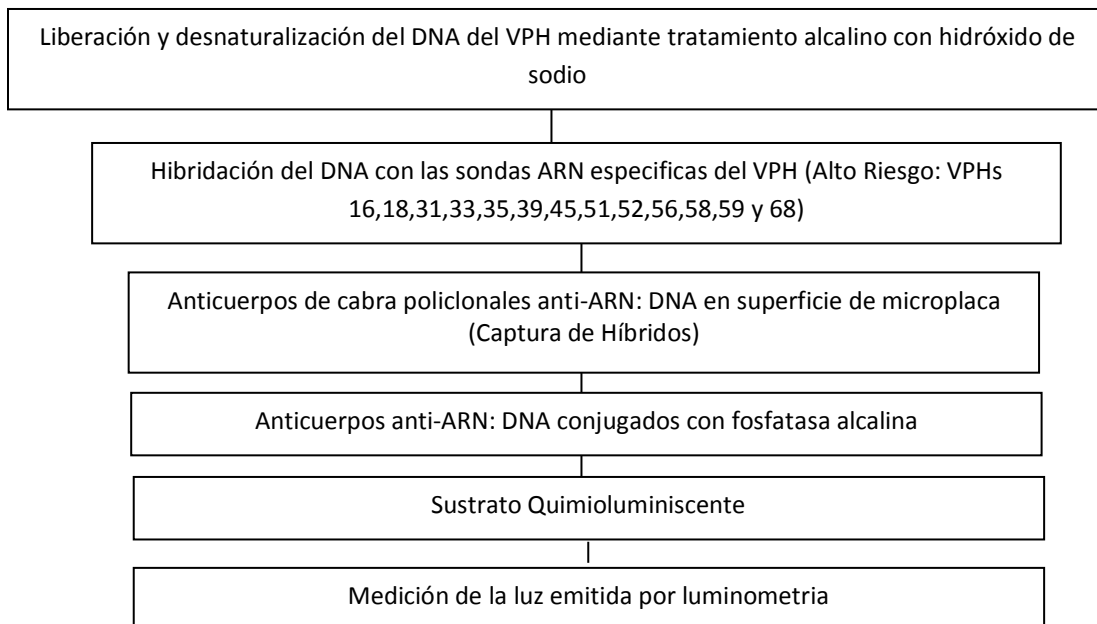
## **7.6 Detección Molecular de DNA de VPH de alto riesgo**

Para la detección de VPHs de alto riesgo se implementó y validó el ensayo de Captura de Híbridos (hc2 High-Risk VPH DNA test, Digene, USA). Este ensayo molecular de detección del DNA viral, es el estándar internacional para la detección del DNA del VPH por quimioluminometría. Es el único ensayo aprobado por la FDA (Food and Drug Administration USA) para realizar exámenes en muestras de cuello uterino.

Esquemáticamente, el ensayo incluye las fases de la desnaturalización, hibridación, detección y amplificación de la señal por quimioluminiscencia en microplaca (Fig. Nro. 30).

### Muestra Cervical

(Cepillado Cervical)



**Figura Nro. 30.** Esquema de la metodología del ensayo molecular Captura de Híbridos

El ensayo detecta 13 genotipos de VPH relacionados con alto riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) en células epiteliales cervicales. El ensayo fue desarrollado de acuerdo a las instrucciones del fabricante; en el que se incluyen los siguientes pasos:

**a) Desnaturalización del DNA viral**

Para el desarrollo de cada ensayo se incluyeron tres controles negativos, tres controles positivos de VPH de alto riesgo (HRC), un control de calidad de VPH de bajo riesgo (QC1-LR) y un control de calidad de VPH de alto riesgo (QC2-HR). Después de la preparación e identificación de todo el material utilizado (Reactivos, muestras y controles) así como la verificación de funcionamiento de equipos; se adicionó a cada muestra y controles, 150 uL de reactivo de desnaturalización (una solución diluida de hidróxido de sodio, Na OH). Los tubos se agitaron por 10 segundos, (agitador de tubos para múltiples muestras Vortexer I) y posteriormente se incubaron en Baño María a  $65^{\circ}\text{C} \pm 2$  durante 45 minutos  $\pm 5$ . Paralelamente se preparó la sonda anti VPH de alto riesgo, por dilución en buffer carbonato.

**b) Hibridación molecular**

Para trabajar con microvolúmenes, se homogenizaron los controles de calidad, y muestras desnaturalizadas, y se transfirieron 100 uL de cada uno a los pocillos respectivos de una microplaca de 96 pozos de capacidad de 300 uL. La microplaca fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente ( $20 - 25^{\circ}\text{C}$ ) y se añadió 25 uL de la sonda de VPH de alto riesgo a cada pocillo. La placa fue homogenizada por agitación a 1100 rpm  $\pm 100$  durante 5 minutos ( $\pm 2$  min). Luego, para lograr la hibridación la placa fue incubada a  $65^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. En esta etapa, las muestras que contenían el DNA diana se hibridaron con sonda de ARN específica anti- VPH de alto riesgo.

**c) Captura de híbridos ARN:DNA**

Para capturar los híbridos ARN: DNA, con ayuda de una multipipeta de ocho canales, se traspasó el contenido de cada pocillo de la microplaca a los pocillos correspondientes de la microplaca de captura. La microplaca de captura que contiene anticuerpos absorbidos con



especificidad anti-ARN: DNA y las muestras respectivas fueron puestas en agitación a 1100rpm (+/- 100 rpm), a una temperatura entre 20 a 25°C, durante 60 minutos (+/- 5 minutos). En esta etapa los híbridos de ARN: DNA fueron capturados en la superficie de los pocillos.

Los híbridos no específicos fueron eliminados por lavado con buffer fosfatos, por seis veces, haciendo uso de un lavador automático de placas (lavador automático de placas I del sistema de captura de híbridos).

#### **d) Detección de híbridos ARN:DNA**

Para esta etapa a cada pocillo de la microplaca se añadió 75 uL de una solución de anticuerpos anti-híbridos ARN: DNA conjugados con fosfatasa alcalina. La placa se incubó a 20° C por 45 minutos, al cabo del cual, el exceso de anticuerpos o anticuerpos unidos inespecíficamente fue eliminado por lavado con buffer fosfatos como fue descrito previamente. Para la detección de sitios conjugados se adiciono 25 uL de sustrato quimioluminiscente y se incubo por 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura.

#### **e) Lectura e interpretación de los resultados**

La lectura de la microplaca de captura se realizo en el Luminómetro de microplacas Digene 2000 (DML 2000) y el Software Digene Hybrid Capture System versión 2 (DHCS V.2). La emisión de luz producida por la degradación del sustrato a causa de la unión a fosfatasa alcalina es expresada en unidades de luz relativas (ULR). La intensidad de la luz emitida indicó la presencia o ausencia del DNA-VPH en la muestra biológica.

Se consideró un resultado positivo (presencia de secuencias de DNA del VPH de alto riesgo en la muestra) si la determinación de URL fue igual o superior al valor de corte y se

consideró un resultado negativo (ausencia de las secuencias de DNA del VPH de alto riesgo o bien, la presencia de niveles de DNA del VPH inferiores al límite de detección del ensayo), si la determinación de URL fue inferior al valor de corte

Para la validación de los resultados, se llevó a cabo la calibración del ensayo, garantizando que, los reactivos, materiales de calibración y control de calidad permitan la determinación precisa del valor de corte del ensayo. Para esto el ensayo en cada determinación incluyó:

1. **Calibrador o Control Negativo.-** Se analizó por triplicado en cada ensayo. Para que el ensayo sea válido, la media del calibrador negativo debe ser  $\geq 10$  y  $\leq 250$  URL, así mismo los resultados del calibrador negativo deben mostrar un coeficiente de variación ( $\%CV$ )  $\leq 25\%$ . De lo contrario el ensayo no es válido y es necesario repetir el ensayo con todas las muestras.
2. **Calibrador o control Positivo.-** El calibrador para VPH de alto riesgo, también fue analizado por triplicado en cada ensayo. Los resultados de todos los calibradores deben mostrar un  $\%CV \leq 15\%$ . Si el  $\% CV$  es  $> 15\%$ , se calculó la media con dos valores de calibrador más similares. Si la diferencia entre la media y cada uno de los dos valores es  $\leq 15\%$ , el ensayo fue considerado como válido. De lo contrario es necesario repetir el ensayo con todas las muestras incluidas en el ensayo.
3. **Control de calidad.-** Para el control de calidad, se incluyeron sondas VPH-6 (de bajo riesgo, LR) y de VPH-16 (de alto riesgo, HR) clonados. Para validarse la calidad del proceso, la relación del valor URL/CO de cada control de calidad debe encontrarse en el rango aceptable (ver cuadro N° 1). Si los valores de los controles estuvieran fuera de rango, el ensayo no se considera válido y debe repetirse.

Control de calidad	Tipo de VPH	Resultado esperado (Valor de RLU/CO) Sonda de VPH de alto riesgo			
		Mínimo	Máximo	Promedio	% CV
QC1-LR	Bajo Riesgo (VPH 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Alto Riesgo (VPH 16)	2	8	5,0	25

Cuadro Nro. 1. Control y Rangos de Calidad

Una vez validados todos los controles del ensayo, según los criterios antes indicados, el valor de corte para la determinación de las muestras positivas fue calculado sacando el promedio de los resultados del control positivo (cuadro N° 2).

<b>Ejemplo de cálculo del valor de corte:</b>	
	<b>Valores de RLU de HRC</b>
	312
	335
	307
<b>Media del valor de RLU = COV</b>	<b>318</b>

Cuadro Nro. 2. Calculo del valor de Corte

## 7.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando el programa Microsoft Excel versión 2007. Para determinación del VPH de alto riesgo oncogénico en mujeres de occidente y oriente de Bolivia.

### **7.8 Genotipificación de los Virus del Papiloma Humano VPH 16 y VPH 18 mediante el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

Muestras cervicales positivas para VPH-AR con el ensayo hc2 fueron procesados para identificación y tipificación de VPH 16 y 18 por procedimiento molecular de reacción en cadena de la polimerización. Para esto, se extrajo el material genético de las muestras cervicales y se amplificó e identificó según el siguiente proceso:

#### **a) Extracción y purificación del genoma en muestras cervicales**

La extracción de DNA se realizó en muestras que dieron positivas para VPH de alto riesgo (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59 y 68) mediante el procedimiento estandarizado y validado en el Laboratorio de Virología del Instituto de SELADIS <sup>118</sup>, Para esto, se adicionó un volumen de 300 uL de buffer de lisis (Tris 10 mM, SDS 0,5%, EDTA 20, mM) 100 uL de suspensión celular y se incubó toda la noche a 37°C, por toda la noche posteriormente, se adicionó 250 uL de fenol y 250uL de cloroformo (vol. /vol.), se homogenizó y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min.

Luego de la extracción de ácidos nucleicos de cada una de las muestras positivas para DNA-VPH de alto riesgo, se procedió con la separación de la fase acuosa (donde se encontraba el DNA), para esto se adicionó 1000 uL de etanol absoluto (insolubilización del DNA), se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 min.( precipitando el DNA insolubilizado), se decantó el sobrenadante y el DNA purificado fue incubado a 4°C, el tiempo necesario, para la evaporación del etanol. El pellet se resuspendió con 50 uL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se conservó a -20°C hasta la determinación siguiente.

**b) Cuantificación y determinación de pureza de Ácidos Nucleicos**

La cuantificación fue realizada por espectrofotometría, debido a que es un método rápido y no destructivo y se utiliza para determinar concentraciones menores a 2,5 ug./ml. La medición fue realizada a una longitud de onda de 260 nm, en el que el DNA tiene máxima absorbancia.

Para la determinación de pureza de los ácidos nucleicos obtenidos, se tomó en cuenta la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm. Debido a que las proteínas tienen una absorbancia máxima a 280 nm, principalmente por los residuos de triptófano. La relación aceptable como óptimo de pureza es de 1,65 a 1,85. Un valor < 1,65 indica alta contaminación proteica y un valor > 1,85 indica contaminación con fenol, ya que se trabajó con este reactivo durante el procedimiento de extracción.

Para la evaluación de parámetros de cantidad y pureza en cada una de las muestras se preparó una dilución 1:100, conservando el restante de los extractos de DNA a - 20°C para su posterior tipificación, (2 uL de muestra con 198 uL de agua libre de nucleasas como diluyente). Posteriormente, se efectuó la medición de absorbancias a 260 y 280 nm en cubetas de cuarzo. La cantidad de DNA en cada uno de los extractos fue determinado por multiplicación por el factor de dilución (x 100). Para la lectura se alicotó 50 uL en las cubetas de cuarzo.

Posteriormente los extractos de DNA fueron procesados para la identificación de los genotipos del Virus del Papiloma Humano VPH 16 y VPH 18 de alto riesgo oncogénico.

### c) Detección de VPH tipo 16 y 18 por Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la detección de los genotipos VPH 16 y VPH 18 se utilizó el set comercial **VPH16/18** de SACACE *Biotechnologies* (44 Scalabrini str, 22100, Italia) el cual fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para esto se preparó la cantidad apropiada de tubos, incluyendo dos tubos adicionales; uno para el control Negativo de amplificación y otro para el control Positivo de amplificación a cada tubo se adicionó 10 uL de deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y 20 uL de aceite mineral. Luego a cada tubo, correspondiente, se adicionó 10 uL de DNA extraído de cada una de las muestras cervicales. De igual forma se adicionó 10 uL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas al tubo de control negativo de amplificación y 10 uL de DNA VPH16/18 al tubo de control positivo de amplificación. Luego, se transfirieron al termociclador programado según especificaciones del fabricante (Cuadro N° 3).

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95 <sup>0</sup> C		
2	95 <sup>0</sup> C	5 min	1
3	95 <sup>0</sup> C	1 min	42
	65 <sup>0</sup> C	1 min	
	72 <sup>0</sup> C	1 min	
4	72 <sup>0</sup> C	1 min	1
5	4 <sup>0</sup> C	Conservación	

**Cuadro Nro. 3. Amplificación de DNA de VPH16/18**

**d) Revelado de amplicones**

El revelado se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % preparado con tampón TBE 1X (Tris 446 Mm, Acido Bórico 446 mM y EDTA 10mM) como diluyente. El gel fue cargado con 20 uL de las muestras amplificadas (Muestras, controles positivo y negativo y el control de peso molecular). Para el revelado de DNA se utilizó el reactivo fluorescente EZ-Visión, en una dilución 1 en 6. La corrida electroforética se llevo a cabo a un voltaje de 150 Voltios, 350 mAmperios por 10 minutos, con tampón de corrida TBE 1X. Una vez realizada la corrida electroforética las bandas fueron visualizadas en un transiluminador con la incidencia de luz ultravioleta a 300nm de longitud de onda.

Los productos esperados corresponden a una banda de DNA de 425 pb para VPH 18 y una banda de 325 pb para VPH 16.

**e) Interpretación de los resultados:**

Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera:

Control	Banda Especifica de 325 pb	Banda Especifica de 425 pb	Interpretación
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas (C-)	NO	NO	Resultado validado
ADN-VPH 16(C+)	SI	NO	Resultado validado
ADN-VPH 18(C+)	NO	SI	Resultado validado

**Cuadro Nro. 4. Interpretación de Resultados**

La especificidad analítica descrita por el fabricante del ensayo de tipificación VPH 16/18 es de 100%, provista por el uso de iniciadores (*primers*) de última generación validados con muestras negativas de un grupo control. Tampoco se observó reacciones cruzadas con otros patógenos. La sensibilidad analítica del ensayo es de 100% capaz de detectar hasta 500 copias/mL. Los iniciadores utilizados permiten la amplificación de fragmentos de la región correspondiente al gen de expresión temprana E6.

**f) Análisis Estadístico.**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo utilizando el programa Microsoft Excel, versión 2007.



## 8 RESULTADOS

### 8.1 Población en Estudio

El estudio contó con 160 participantes de las cuales 88 corresponden a la ciudad de La Paz y 77 a la ciudad de Santa Cruz. Las características de la población incluida en el estudio se describen en Cuadro Nro. 5. Las 160 participantes accedieron voluntariamente a participar del estudio, firmando consentimiento informado para la encuesta y la toma de muestra para diagnóstico VPH (Anexo 1). Las muestras fueron colectadas en medio de transporte certificado para su uso con el ensayo de captura de híbridos. Las muestras cervicales se tomaron por los médicos ginecólogos en consulta externa para examen ginecológico en el Hospital el Torno en Santa Cruz y del Hospital de La Mujer en La Paz. En la aplicación de las encuestas a las pacientes no se tuvo rechazo alguno a la aplicación de las mismas.

**Cuadro Nro. 5**

**Características Socio Demográficas y Ginecológicas de la Población en Estudio**

<b>VARIABLES</b>	<b>DETALLE</b>	
Número de Participantes	83	77
Procedencia	La Paz	Santa Cruz
Edad (rango)	22 – 60	25 – 57
Consumo de tabaco	5	4
Usos Anticonceptivos orales	1	1
Consumo de bebidas alcohólicas	7	16
Número de Partos (rango)	0 a 8	0 a 10
Número de Abortos (rango)	0 a 5	0 a 3
Numero de Cesarías (rango)	0 a 3	0 a 4

## **8.2 Frecuencia de VPH de Alto Riesgo Oncogénico en la Población de Estudio**

Las 160 muestras cervicales fueron analizadas por infección por el virus del Papiloma Humano de Alto riesgo que corresponden a 13 genotipos (*16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68*) detectados con mayor frecuencia en lesiones de Alto grado (LIEAG) y cáncer cérvico uterino a nivel mundial, mediante la técnica de Captura de Híbridos 2(hc2) aprobado por la FDA (Food and Drug Administration USA) para realizar exámenes en muestras de cuello uterino. La técnica obtiene resultados a través de lecturas por quimioluminómetro expresados en URL (Unidad de luz relativas) dando a conocer presencia o ausencia del DNA del VPH-AR según la intensidad de la luz emitida. El cuadro Nro.6 muestra resultados de la población positiva en el ensayo (valores > al valor de corte del ensayo o COV).

Cuadro Nro. 6

**Muestras positivas por ensayo de la captura de híbridos para VPH de alto riesgo, según lecturas por quimioluminiscencia en unidades de luz relativas (URL)**

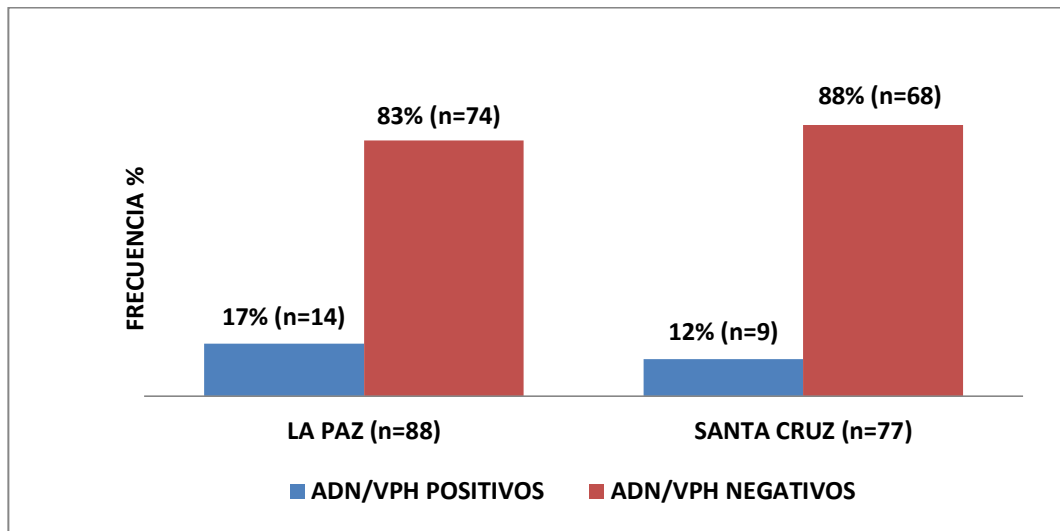
Variable COV	La Paz		
	N° Participante	Edad	URL
<b>Grupo a): COV - 5000</b>	31	35	692
	41	28	1784
	43	30	750
	64	39	3934
	74	29	1048
	61	43	858
	12	39	554
	26	46	4274
<b>Grupo b): 5001 a 50000</b>	54	26	27048
	62	60	27728
	69	44	33892
<b>Grupo c): &gt;50001</b>	42	31	373721
	45	26	356608
	63	29	168204
Variable COV	Santa Cruz		
	N° Participante	Edad	URL
<b>Grupo a) COV - 5000</b>	6	47	2699
	35	42	2681
	59	30	2709
	75	54	379
<b>Grupo b) 5001 a 50000</b>	30	32	24335
	49	47	9093
	55	32	9623
	72	27	22409
<b>Grupo c) &gt;50001</b>	31	34	114027

Los resultados en el cuadro Nro. 6, fueron organizados en función a las URL obtenidos en el ensayo, observándose diferencias en la cantidad de URL (a,b,c) desde valores cercanos al COV (La Paz=439 URL y Santa Cruz=258 URL) a extremos francamente altos (La Paz y Santa Cruz > 100.000 URL). Estas diferencias de señal, podrían tal vez relacionarse con la carga viral de infección al momento de la toma de muestra; así mismo sugiere que la

edad de los participantes no está relacionada con la carga viral de la infección por VPH-AR.

### 8.3 Diagnóstico de VPH-AR en la población en estudio

Los resultados obtenidos del diagnóstico genérico de Infección por el Virus del Papiloma Humano, muestran que en la ciudad de La Paz, el 17% (n=14/83) son positivas a la detección molecular de DNA/VPH-AR y en Santa Cruz el 12% (n=9/77) son positivas a la detección molecular de DNA/VPH-AR (Grafico Nro. 1). De acuerdo al lugar de residencia, la frecuencia más alta de infección por VPH de alto riesgo se registra en la ciudad de La Paz.



**Grafica Nro. 1. Frecuencia de casos positivos de infección por virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo (VPH-AR) de la ciudad de La Paz y Santa Cruz.** El 17% (n=14) de las muestras de La Paz son positivas a la detección molecular de DNA/VPH-AR, mientras en Santa Cruz fueron positivas el 12% (n=9/77).

Aunque, por las características culturales y de adquisición de la infección por VPH se habría esperado mayor frecuencia de infección de VPH-AR en las mujeres de la ciudad de

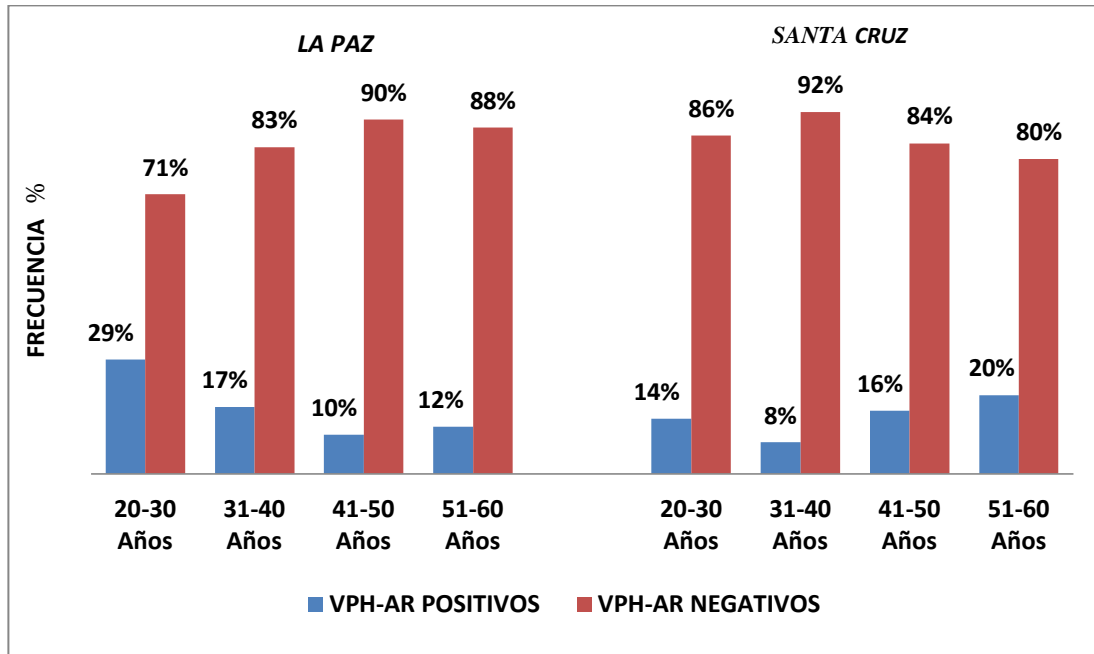
Santa Cruz, en comparación con La Paz, este no fue el caso encontrando una mayor frecuencia de infección por VPH-AR en la población estudiada de la ciudad de La Paz.

#### **8.4 Correlación del diagnóstico de VPH-AR positivo con factores de riesgo socio demográficos de la población en estudio.**

##### **8.4.1 Grupos etáreos**

De las 83 muestras analizadas de la ciudad de La Paz; 29%(n=6) corresponde al grupo etáreo de 20 a 30 años, que dieron positivas a la infección por el VPH-AR; 17%(n=4) del grupo etáreo de 31 a 40 son positivas a la infección viral; 10%(n=3) del grupo etáreo de 41 a 50 son positivas a la infección viral y 12%(n=1) del grupo etáreo de 51 a 60 años dio positiva a la infección por VPH-AR.

Por otro lado, de la ciudad de Santa Cruz se analizaron 77 muestras de las cuales el 14%(n=2) dieron positivas a la infección por el VPH-AR correspondiente al grupo etáreo de 20 a 30 años; 8%(n=3) del grupo etáreo de 31 a 40 son positivas a la infección viral; 16%(n=3) del grupo etáreo de 41 a 50 son positivas a la infección viral y 20%(n=1) del grupo etáreo de 51 a 60 dio positiva a la infección por el VPH-AR. **(Gráfico Nro. 2).**



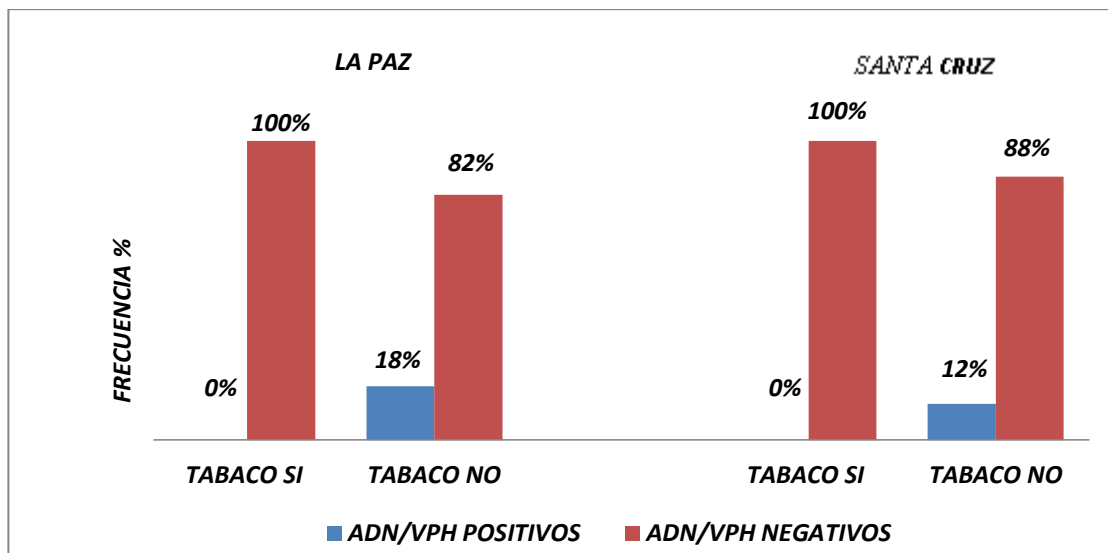
**Gráfico Nro. 2. Presencia de VPH-AR en Relación a la edad de la población en estudio.** La mayor frecuencia de casos positivos a la infección por VPH/AR fue detectada en los grupos etáreos de 20 a 30 y 31 a 40 para la ciudad de La Paz a diferencia de Santa Cruz se detectó mayor frecuencia en los grupos etáreos de 41 a 50 y 51 a 60 años.

De acuerdo con estos resultados, la hipótesis específica indica que la existencia de mayor frecuencia de infección de VPH-AR en mujeres menores de 40 años, puede aplicarse a la población estudiada de La Paz, pero no así de Santa Cruz. Al revés, en La Paz, la población mayor a 41 años presenta menor frecuencia de infección por VPH (22%), mientras que en Santa Cruz, en esta población (> a 41 años), la frecuencia es de 36%, más positividad que la observada en población menor a 40 años (22%).

#### 8.4.2 Consumo de Tabaco

En las poblaciones de estudio de la ciudad de La Paz y Santa Cruz, no se registró ningún caso para el consumo de tabaco en mujeres con diagnóstico positivo para el VPH-AR (DP/VPH-AR) (Gráfico 3). Estos datos informan que no existe relación en cuanto al

consumo de tabaco e infección por VPH lo que resulta contrario a lo registrado por otros estudios, donde se reporta que el consumo de tabaco es uno de los factores de riesgo más asociados a la presencia del VPH-AR.



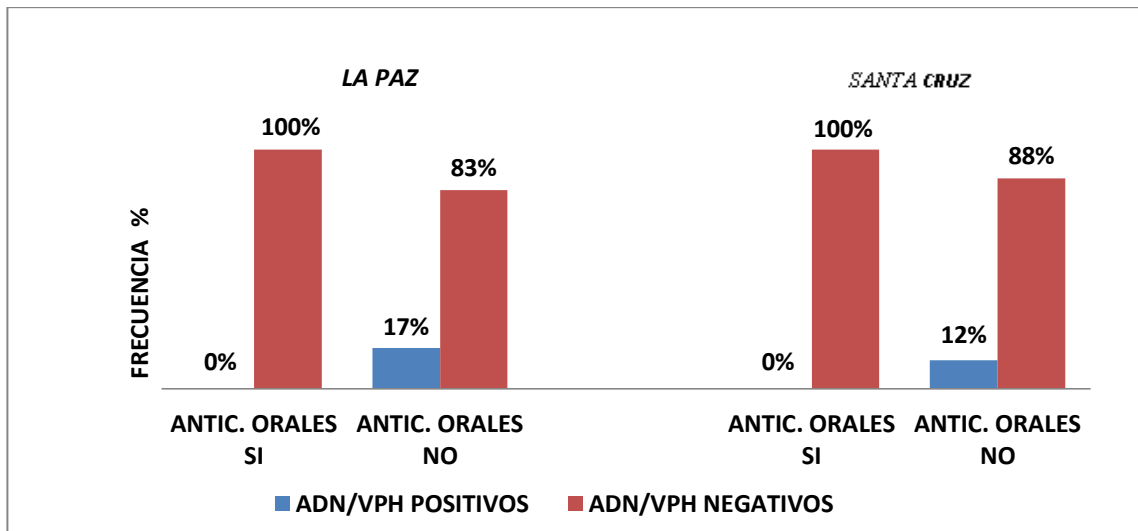
**Gráfico Nro. 3. Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección de DNA/VPH-AR según el consumo de tabaco en las pacientes de estudio.** En ambos estudios no se registra ningún caso de consumo de tabaco en mujeres con infección por el VPH-AR a diferencia de las que no presentan el VPH-AR.

De acuerdo con la hipótesis específica sobre una mayor persistencia de infección por el VPH-AR en mujeres que consumen tabaco, no se confirma de acuerdo con los datos obtenidos, debido a la inexistencia de consumo de tabaco en todas las pacientes positivas de infección por el VPH-AR, de ambas poblaciones estudiadas.

#### 8.4.3 Consumo de Anticonceptivos Orales (AO)

En las poblaciones de estudio de la ciudad de La Paz y Santa Cruz, no se registró ningún caso para el consumo de AO en mujeres con DP/VPH-AR (Gráfico 4). Estos datos al igual que con la población que tienen hábito de fumar en nuestra población no existe

relación de consumo de AO con diagnóstico positivo para el DNA/VPH-AR. Este hecho es también contrario a lo registrado por otros estudios, donde este factor es uno de los riesgos asociados a la presencia del VPH-AR.



**Grafico Nro. 4. Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección del DNA/VPH-AR según el consumo de anticonceptivos orales de las pacientes en estudio.**

En ambos estudios no se registra ningún caso de consumo de tabaco en mujeres con infección por el VPH-AR a diferencia de las que no presentan el VPH-AR.

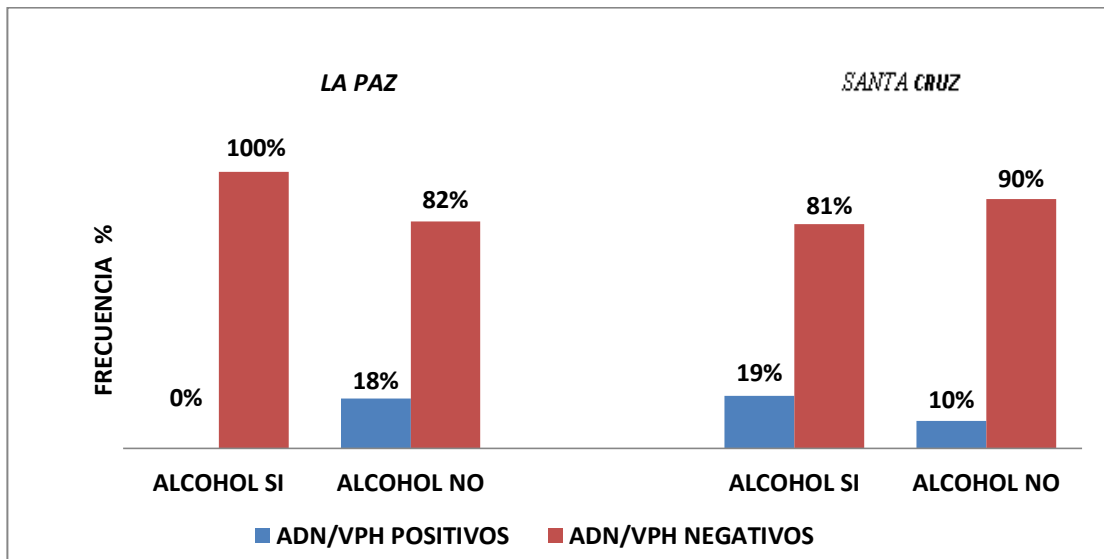
En este aspecto, de acuerdo con la otra hipótesis específica sobre una mayor persistencia de infección por el VPH-AR en mujeres que consumen anticonceptivos orales, en nuestra población en estudio tanto de la ciudad de La Paz y de Santa Cruz no existe relación de consumo de AO con reactividad de VPH-AR.

#### 8.4.4 Consumo de Bebidas Alcohólicas

En la ciudad de La Paz, de la población en estudio no se encontró casos de consumo de bebidas alcohólicas en mujeres con DP/VPH-AR, con relación a mujeres que no consumen bebidas alcohólicas y DP/VPH-AR, siendo el 18% (n= 14) de 100% (n=76). En cuanto a



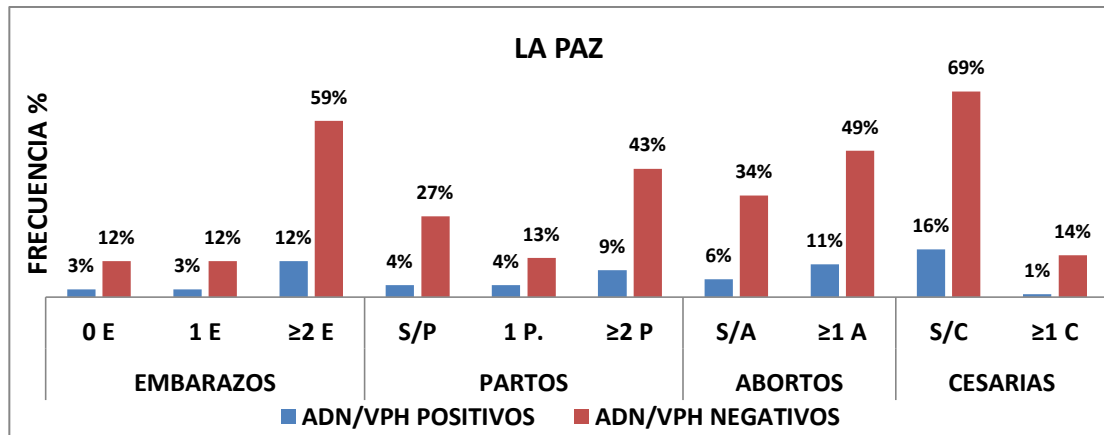
la ciudad de Santa Cruz, el porcentaje del consumo de bebidas alcohólicas de mujeres con DP/DPH-AR, es 19% (n=3) de 100% (n=16), con relación a mujeres que no consumen B A y con DP/VPH-AR: Santa Cruz 10% (n=6) de 100% (n=61). De acuerdo a esto el consumo de bebidas alcohólicas para la ciudad de Santa Cruz, si influyen en la presencia persistente del VPH-AR.



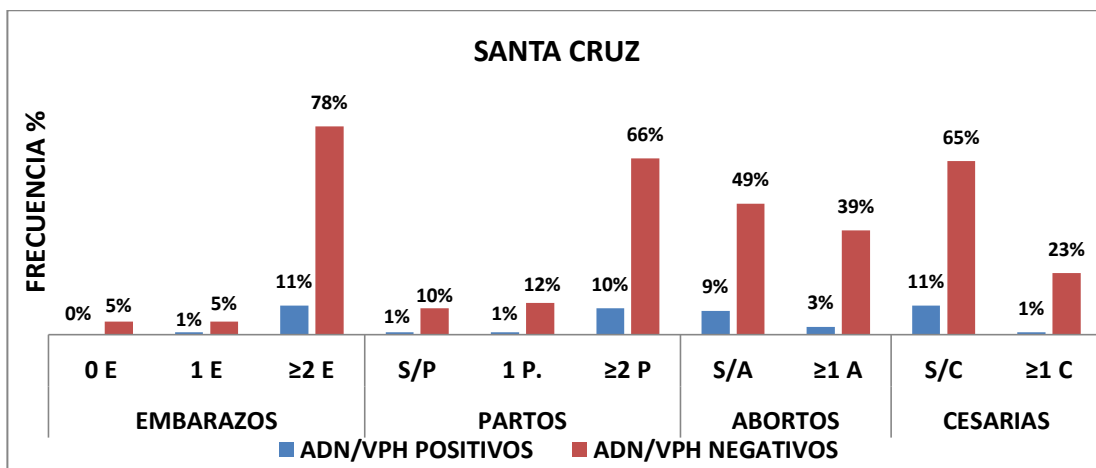
**Grafico Nro. 5. Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección de DNA/VPH-AR según el consumo de bebidas alcohólicas de las pacientes en estudio.**

De acuerdo con la hipótesis específica sobre una mayor persistencia de infección por el VPH-AR en mujeres que consumen BA, si se confirma para el caso de las mujeres de Santa Cruz. Sin embargo no se confirma para las mujeres de La Paz, no existiendo consumo de BA en estas mujeres.

#### 8.4.5 Características Gineco-obstétricas: Embarazos(E), partos(P), abortos (A) y cesáreas (C)



**Grafico Nro. 6.** Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección de DNA/VPH-AR según características Gineco-obstétricas de la población en estudio de la ciudad de La Paz.



**Grafico Nro. 7.** Frecuencia de casos positivos y negativos a la detección de DNA/VPH-AR según características Gineco-obstétricas de la población en estudio de la ciudad de Santa Cruz.

Aparentemente los resultados obtenidos de la población en estudio de la ciudad de La Paz y Santa Cruz (Gráficos N° 7 y 8) se registro que el riesgo de infección por el VPH-AR es directamente proporcional al número de embarazos y partos, sin embargo en el caso de abortos no incide la infección de este virus para la población de santa cruz. Asimismo para el caso de cesáreas permite deducir que favorece a la reducción de infección viral.

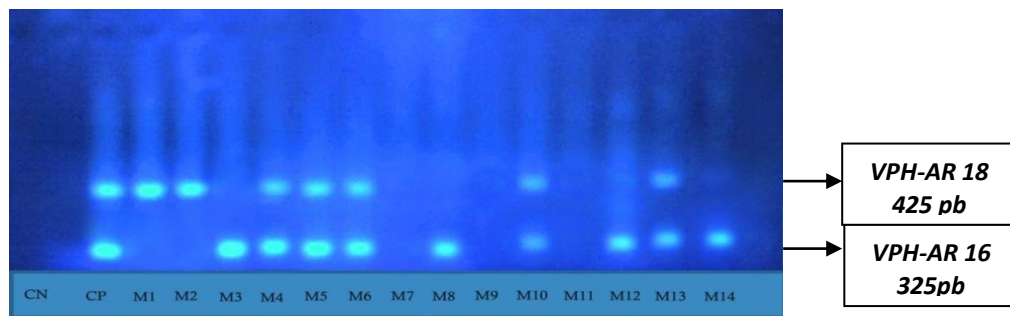
### 8.5 Frecuencia de genotipos VPH 16 y VPH-18 de alto riesgo oncogénico en la población estudiada

De las 160 muestras cervicales analizadas, fueron positivas a la infección por VPH de alto riesgo un total de 23 muestras. De estas muestras, 14 corresponden a la ciudad de La Paz y 9 a la ciudad de Santa Cruz. Toda vez que estas muestras fueran positivas para el conjunto de 13 genotipos de VPH-AR (ensayo de captura de híbridos), es necesario identificar la frecuencia de tipos oncogénicos de alto riesgo sobre todo VPH16 y VPH18, genotipos asociados con la generación de tumores malignos en diferentes contextos geográficos del mundo. De acuerdo con esto, las muestras que dieron positivas por el ensayo de captura de híbridos, fueron analizadas por PCR utilizando primers específicos para genotipos 16 y 18 utilizando el kit comercial de Biotechnologies. Los amplicones obtenidos se revelaron por electroforesis en gel de agarosa. (Figura Nro. 31).

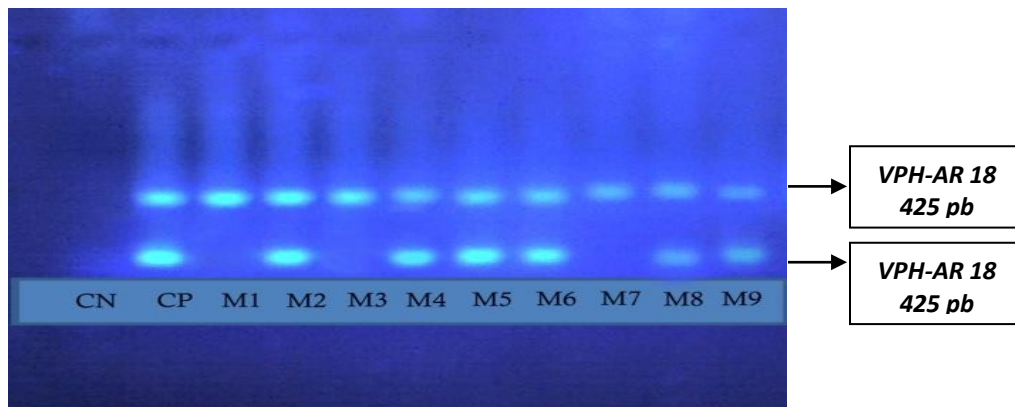


**Figura Nro. 31. Detección molecular de VPH oncogénicos de alto riesgo VPH 16 y 18. CN= Control Negativo; CP= Control Positivo; M1= Muestra 1; M2= Muestra 2; pb= Pares de bases**

En esta primera determinación se corrió el control negativo que no muestra ninguna banda amplificada, control positivo que evidencia la presencia de las dos bandas buscadas (banda de 425 pb para VPH-18 y banda de 325 para VPH-16 y los resultados de dos muestras positivas a la detección tanto de VPH-16 y VPH-18. Los resultados obtenidos fueron los esperados según la interpretación establecida para la validación de la prueba (Cuadro Nro. 4).



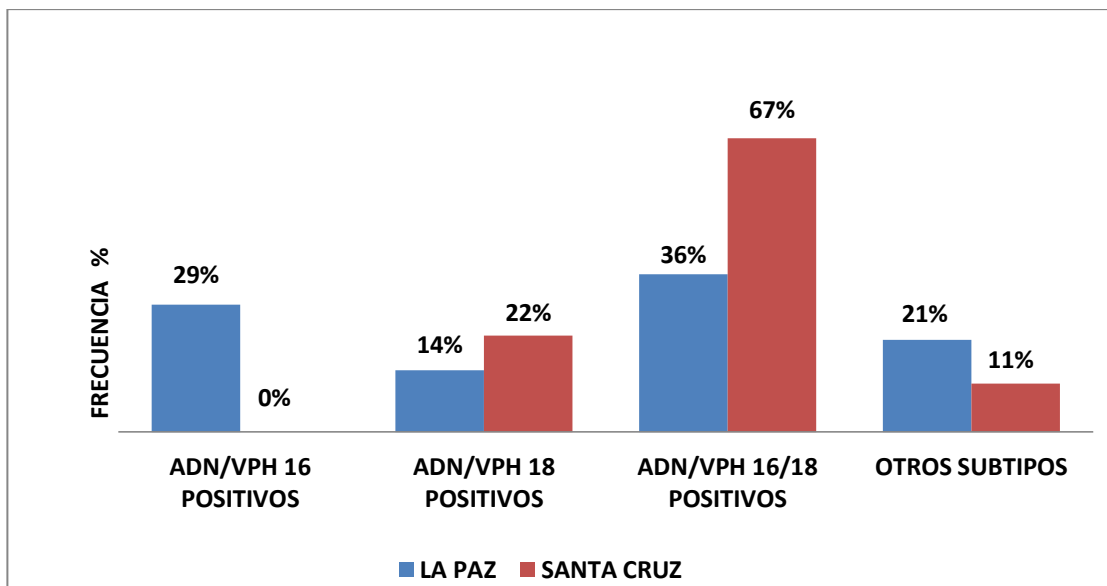
**Figura Nro. 32. Resultados de la detección molecular de VPH-16 y VPH-18 en las muestras en estudio de la ciudad de La Paz. CN= Control Negativo; CP= Control Positivo; M1= Muestra 1; M2= Muestra 2; pb= Pares de bases**



**Figura 33. Resultados de la detección molecular de VPH-16 y VPH-18 de las muestras en estudio de la ciudad de Santa Cruz. CN= Control Negativo; CP= Control Positivo; M1= Muestra 1; M2= Muestra 2; pb= Pares de bases**

En las figuras 32 y 33; se observa los resultados de la tipificación de los genotipos VPH-AR 16 y VPH-AR 18 de todas las muestras seleccionadas, mediante la presencia de las respectivas bandas de amplificación.

La ciudad de La Paz registró 14 casos positivos a la infección por los VPHs-AR: 29% (n=4) infección con el VPH-AR 16, 14% (n=2) infección con el VPH-AR 18; 36% (n=5) coinfección con VPH-AR 16 y VPH-AR 18 y el 21% (n=3) no evidencia a los genotipos VPH-AR 16 y VPH-AR 18. En cuanto a la ciudad de Santa Cruz se registró 9 casos positivos a la infección por los VPHs-AR : 0% (n=0) infección con el VPH-AR 16; 22% (n=2) infección con el VPH-AR 18; 67% (n=6) coinfección con VPH-AR 16 y VPH-AR 18 y el 11% (n= 1) no evidencia a los genotipos VPH-AR 16 y VPH-AR 18, este último en ambas poblaciones da a conocer una probable infección con algún o algunos otros genotipos de VPH-AR : **31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.**



**Grafico Nro. 8. Frecuencia porcentual de casos positivos a la detección de infección por VPH-16; VPH 18 y Co-infecciones VPH-16/VPH-18 de las pacientes en estudio**

De acuerdo con la última Hipótesis específica, sobre la frecuencia de VPH16 será mayor en relación a la frecuencia de VPH 18 en ambas poblaciones, se confirma solo en las mujeres de la ciudad de La Paz y no se confirma para Santa Cruz ya que la mayor frecuencia encontrada es del VPH 18. Sin embargo en ambas poblaciones se detectó mayor frecuencia de Co-infección por ambos genotipos oncogénicos.

## 9 DISCUSIÓN

Como ya se ha expuesto, uno de los grandes descubrimientos en la investigación etiológica del Cáncer ha sido la demostración de que el cáncer de cérvix está asociado con la infección persistente de determinados genotipos del VPH, denominando a estos VPH de Alto riesgo oncogénico. El hecho de que se trate de una enfermedad venérea muy frecuente, ya que en las edades de mayor actividad sexual su prevalencia alcanza hasta el 40% de la población femenina, y que se haya establecido que se trata de una causa necesaria para el desarrollo de cáncer de cuello uterino hacen de esta infección un importante problema de salud en la mujer.

El CCU, es el segundo más frecuente entre las mujeres de todo el mundo, con una estimación de más de 490.000 nuevos casos al año y más de 270.000 muertes al año. En general las tasas más bajas se detectan en Europa, Norteamérica y Japón, donde además se encuentra unas tasas de supervivencia de entre 63-73%. Por el contrario, en los países en vías de desarrollo se dan incidencias más de 35 por 100.000 habitantes, con una disminución importante en la supervivencia. Finalmente, dado que se trata de la mayor causa de años de vida perdidos por causa del cáncer en estos países.

En nuestro país, Bolivia, se registran una de las tasas más altas de incidencia de este cáncer con 58 por 100.000 y con una mortalidad de 27 por 100.000 mujeres, lo que significa un total de 661 muertes por año a causa de este cáncer. Según la OMS la situación actual es mucho más alarmante ya que por año registran 1.665 muertes, lo que significa de 4-5 muertes por día <sup>(80, 81, 83)</sup>. Probablemente, este incremento pueda ser, debido no solo a la llegada de población inmigrante procedente de países con alta prevalencia de CCU, sino también ocasionado por la modificación en la conducta sexual de las generaciones más jóvenes, tanto en cuanto a la edad de comienzo de las relaciones sexuales, como el incremento del número de parejas sexuales <sup>(80, 81)</sup>. De acuerdo con esto se decidió llevar a cabo el presente estudio, en el marco del proyecto “Cáncer de Cuello Uterino en mujeres Bolivianas: Estudio de Prevalencia de tipos oncogénicos de VPH. Cooperación (FIBEX y

AECID – UMSA- FCFB)” con el objetivo de identificar en poblaciones de la Paz y Santa cruz la frecuencia de este virus en circulación en nuestra población, considerado como la causa necesaria para el desarrollo del CCU, y a la vez correlacionando este con factores de riesgo importantes para la persistencia viral, que fueron identificados en varios estudios internacionales.

En cuanto a los programas de diagnóstico precoz de CCU, el método convencional para la detección de alteraciones en la citología cérvico-vaginal, ha sido el test Papanicolaou, ha sido efectivo en la reducción de la incidencia de CCU en un 70% en países desarrollados (Europa, Estados Unidos) cuando va acompañada de la colposcopia e histopatología. La citología detecta la mayoría de las lesiones neoplásicas del cuello uterino, pero no la causa: El Virus del Papiloma Humano. A pesar de que este método convencional es solo moderadamente fiable y no consigue una alta sensibilidad y especificidad. Se conoce que un único Papanicolaou no detecta hasta el 40-50% de las lesiones de alto grado o invasivas, presentando una serie de limitaciones importantes entre las cuales se encuentra el impedimento de una automatización completa de la técnica, para variaciones constantes para mejorar su sensibilidad, alta presencia de falsos negativos, falsos positivos o sobre valoración de hallazgos citológicos en las evaluaciones de los cambios morfológicos. Esto conlleva al uso de técnicas moleculares, que permiten detectar la presencia del VPH en células infectadas aún antes del inicio de síntomas por el individuo infectado, con la ventaja de detectar desde pocas copias del virus (10-30 copias) y es útil en el diagnóstico de casos reportados como indeterminados por métodos cito/histopatológicos. Además estas técnicas moleculares podrían emplearse para la detección de VPH como herramienta en el cribado primario del CCU y la atención a pacientes con diagnóstico de ASC-US y lesiones de bajo grado. La detección del VPH está reconocida como instrumento útil para la disminución de la incidencia y mortalidad del cáncer de cuello uterino.

De acuerdo a este contexto el presente trabajo a la vez proporciona información muy importante debido a la utilización de Técnicas moleculares que presentan los niveles de



sensibilidad y especificidad deseadas más utilizadas en la detección de VPH-AR siendo el test de Captura de Híbridos y la técnica basada en PCR. Si bien ambas poseen ventajas y desventajas: 1) La captura de híbridos 2 (*Test hc2 DNA VPH de alto riesgo*) es una técnica que puede aplicarse con facilidad en los laboratorios ya que no requiere instalaciones especiales. En la actualidad esta técnica es el estándar de la industria para la detección del DNA del VPH. Es la única prueba aprobada por la FDA (Food and Drug Administration, USA) para realizar exámenes en muestras de cuello uterino. Esta prueba utilizada en conjunto con la citología (sensibilidad de hasta el 100% como indican la mayoría de los estudios) es la mejor manera de valorar el riesgo de pre-cáncer y Cáncer de Cuello Uterino para mujeres a partir de 30 años ya que la frecuencia de las infecciones por VPH es mayor y generalmente pasajeras. Esta técnica ofrece la mayor confiabilidad: ayuda a disminuir el número de enfermedades no detectadas por la citología (falsos-Negativos), validada por más de 300 estudios científicos, respaldada por estudios con la participación de cientos de miles de mujeres en el mundo. Sin embargo este test tiene menor sensibilidad pero un menor riesgo de contaminación, y por ello son más fáciles de introducir en los laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, es importante remarcar que en su aplicación clínica, la sensibilidad para la detección de DNA de VPH puede ser de menor relevancia que la especificidad de un ensayo para la identificación de mujeres con lesiones cervicales precancerosas.

Las técnicas basadas en PCR (*Reacción en Cadena de la Polimerasa*) permiten conocer el tipo específico de VPH y las infecciones múltiples, a diferencia del test hc2, lo que posibilita el seguimiento particular de la persistencia de la infección. Sin embargo, tiene desventajas, como la necesidad de contar con espacios adecuados y personal con experiencia para minimizar los riesgos inherentes a las técnicas de amplificación. Estos factores limitan su incorporación en muchos laboratorios.

La motivación de este trabajo fue, a la inexistencia de estudios realizados en nuestro país Bolivia, sobre la causa de la alta frecuencia de CCU a diferencia con otros países,

analizando de esta manera la causa principal para el desarrollo de CCU, específicamente el VPH-AR, existiendo también referencias de cofactores asociados a este, para su persistencia, además se conoce que los genotipos de VPH-AR 16 y 18 son identificados en su mayoría en mujeres con CCU a nivel mundial, por lo que se decide también estudiar la tipificación de estos dos VPH-AR a partir de muestras positivas para VPH-AR de la población estudiada. Por lo tanto el presente trabajo de investigación, pretendió determinar y conocer la frecuencia de los 13 genotipos de VPH-AR responsables del desarrollo de lesiones intraepiteliales de escamosas de alto grado (LIEAG), siendo estos: **VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68** mediante el test hc2 DNA VPH de alto riesgo, luego se correlacionó estos casos positivos para VPH-AR, con diferentes datos socio-demográfico (Edad, consumo de tabaco, anticonceptivos orales, bebidas alcohólicas y características Gineco-obstétricas (Número de partos, abortos y cesáreas) más importantes para la causa de persistencia del VPH-AR para la progresión del desarrollo de CCU, conocidos de acuerdo al reporte de muchos estudios realizados a nivel mundial. Posteriormente se analizó la frecuencia de los genotipos de VPH-AR 16 y VPH-AR 18 mediante la técnica de PCR, debido a la detección más frecuente en mujeres con CCU a diferencia de los otros 11 genotipos de VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), que la probabilidad de inducción de CCU es menor.

La primera etapa del estudio incluyó la determinación de la frecuencia de 13 genotipos de VPH de Alto riesgo oncogénico detectados con mayor frecuencia en las LIEAG a nivel mundial y responsables de la inducción del CCU, en las dos poblaciones de estudio (ciudad de La Paz y Santa Cruz), mediante la utilización del Test captura híbrida de DNA VPH de alto riesgo. Se procedió a la detección de VPH-AR de un total de 160 muestras cervicales: 83 muestras correspondientes a la ciudad de La Paz y 77 muestras a la ciudad de Santa Cruz.

Los resultados obtenidos de nuestro estudio mostraron una frecuencia de infección por VPH-AR 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 para la ciudad de La Paz de 17%

(n=14/83), mientras que para la ciudad de Santa Cruz de 12% ( n= 9/77). Se evidencio un mayor porcentaje de casos positivos en la ciudad de La Paz con relación a Santa Cruz. Trabajos publicados en otros países sobre la prevalencia de VPH-AR informan frecuencias ligeramente superiores al 15% para países en vías en desarrollo. Comparando esos datos con los datos obtenidos en este estudio, la ciudad de La Paz presenta similar frecuencia, a diferencia de la ciudad de Santa Cruz la frecuencia es menor al 15%. Esta diferencia de frecuencias entre las dos poblaciones estudiadas de nuestro País, podría ser debido a sus condiciones de vida. además se piensa en algunos factores de riesgo para la existencia de mayor frecuencia de infección por el VPH-AR en las mujeres que asistieron a su consulta ginecológica del Hospital de La Mujer de la ciudad de La Paz, ya que la población que asiste a este centro de salud, generalmente nunca o rara vez se sometieron a pruebas de detección del este virus; son de recursos económicos muy bajos, ya que realizarse estos controles cada año resultan caros. Así mismo tienen muy poca información sobre la conducta que deben tomar respecto a sus controles ginecológicos, formas de prevención de infecciones de transmisión sexual; sobre todo la promiscuidad, existiendo una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la adquisición del VPH, actividad sexual a temprana edad. Estos factores de riesgo mencionados no se analizaron en este estudio. Sin embargo se realizó un estudio sobre procedimientos moleculares para la identificación y tipificación del Virus del Papiloma Humano en Cáncer Cérvico Uterino y lesiones intraepiteliales precursoras, este estudio se llevó a cabo en la población de pacientes que acudieron al servicio de colposcopia del Hospital de La Mujer de la ciudad de La Paz. Se evaluó en dicho estudio a la vez casos positivos de infección por VPH en las pacientes en relación a diferentes datos sexuales y reproductivos, evidenciando una tendencia de mayor número de casos positivos de infección por VPH en pacientes que tuvieron mayor número de parejas sexuales. De acuerdo con esto concuerda con diversos estudios epidemiológicos que indican que el riesgo de CCU está fuertemente influenciado por factores relacionados con ciertas conductas sexuales como el número de parejas sexuales, edad temprana de inicio de vida sexual activa y la conducta sexual de la pareja. Pero una vez establecida la relación que

existe entre infección por el VPH y cáncer de cuello uterino, dichos factores se convierten más específicamente en parámetros que miden el riesgo de exposición al virus.

Una vez determinada la frecuencia de VPH-AR, se correlacionó esta positividad con algunos factores de riesgo socio-demográficos como ser: La edad, Consumo de Tabaco, Consumo de Anticonceptivos Orales, Consumo de Bebidas Alcohólicas y factores de riesgo Obstétricos como: Número de embarazos, Número de partos, Número de abortos y Número de cesáreas.

Al evaluar la frecuencia de casos positivos para la infección de VPH-AR en relación a grupos etáreos se evidenció un mayor número de casos positivos en mujeres de la ciudad de La Paz (29%). Sin embargo Santa Cruz registró mayor riesgo de infección persistente de VPH-AR en mujeres de 41-50 y 51-60 años de edad con un porcentaje 16 y 20% respectivamente. De acuerdo con estos datos las mujeres de Santa Cruz a partir de los 40 años de edad tienen mayor posibilidad de presentar persistencia de los genotipos de VPH-AR, por lo tanto mayor frecuencia de CCU, en relación a La Paz la persistencia de infección por estos genotipos es menor por lo que refiere una menor frecuencia de casos confirmados de CCU. Esta diferencia podría ser que las mujeres más jóvenes de la ciudad de La Paz tienden a acudir a sus consultas ginecológicas con más frecuencia, hábitos de vida sana, sistema inmunocompetente, ayudando a reducir así la frecuencia de persistencia viral y posterior desarrollo de CCU en mujeres mayores de 40 años de edad, a diferencia de las mujeres jóvenes de Santa Cruz. De acuerdo con otros estudios registrados indican que mujeres, incluso a partir de los 35 años de edad para adelante, ya presentan casos confirmados de CCU. Esto debido a que el cáncer cervical progresa lentamente, de estados precancerosos a un nivel avanzado. La incidencia de cáncer en la mayoría de los países es baja entre las mujeres menores de 25 años, pero se eleva alrededor de los 35 a los 40 años, y llega a su punto máximo entre las edades de cincuenta y tantos y sesenta y tantos años.

También fue evaluado los casos positivos de infección por VPH-AR en las pacientes con relación al consumo de tabaco, anticonceptivos orales (AO) y alcohol. Ninguna de estas variables fue significativo, ya que estas mujeres informan de no consumo de tabaco y no usan anticonceptivos orales. De acuerdo con otros estudios el consumo de tabaco se acepta cofactor de CCU al igual que la inmunodeficiencia, multiparidad, edad joven en el primer parto, el tabaquismo ha sido evaluado en varios casos reportados y se ha encontrado una relación, aunque moderada, pero estadísticamente significativa con el desarrollo de CCU. Algunos autores han sugerido que la exposición al tabaco podría afectar la capacidad del hospedero para montar una respuesta inmune de la mucosa contra la infección viral, en virtud de que se ha demostrado que algunos compuestos del tabaco podrían reducir el número de células Langerhans y de otras células, moléculas involucradas en la función inmunológica. En la actualidad el consumo de AO ha suscitado especial atención dado el elevado número de mujeres que los toman o los han tomado en algún momento de sus vidas, sobre todo en países desarrollados, en relación a países en vías de desarrollo, dichos estudios reportan que las mujeres que habían tomado Aos durante cinco años o más, el riesgo de cáncer entre las usuarias era casi el doble en comparación con mujeres que nunca habían tomado AO. En cuanto a los datos registrados de la ingesta de bebidas alcohólicas se conoce solo de las mujeres de la ciudad de Santa Cruz con 19% (n=3) de 100% (n=16) positivas a la infección por VPH-AR, en relación a mujeres que no consumen bebidas alcohólicas y positivas a la infección por VPH AR 10% (n=6) de 100% (n=61). Ya que las mujeres positivas de infección por VPH-AR de la ciudad de La Paz informan no consumo de bebidas alcohólicas. De acuerdo a esta evaluación en este estudio, el consumo de bebidas alcohólicas si representa también otro cofactor de riesgo para el CCU. No existen muchos estudios de evaluación de la ingesta de alcohol en mujeres con diagnóstico positivo para VPH-AR, sin embargo un estudio informa que el ingerir alcohol y consumir tabaco promueven la persistencia de infección por VPH, se conoce que el etanol presente en las bebidas alcohólicas inhibe la producción de la proteína p53.

Al evaluar la frecuencia de casos positivos de VPH-AR en relación al número de gestaciones de las pacientes, en ambas poblaciones estudiadas se evidenció la existencia de una relación proporcional donde los casos positivos se incrementan cuanto mayor es el número de embarazos. Esto puede deberse a cambios fisiológicos e inmunológicos que ocurren en el epitelio cervical durante el embarazo, cambios hormonales que predisponen a un incremento del riesgo de infección por VPH y su progresión (incremento progresivo en las concentraciones sanguíneas de estrógenos y progesterona), también se conoce que mujeres infectadas con VPH muestran mayor persistencia y progresión de la infección durante y después del embarazo

La evaluación de la frecuencia de casos positivos de VPH-AR en relación al número de partos al que estuvieron expuestas las pacientes se puede evidenciar en ambas poblaciones estudiadas, donde los casos positivos se incrementan en las mujeres con más de 2 partos. Esto puede resultar debido a que las heridas producidas durante el parto vaginal pueden estimular la carcinogénesis y favorecer el acceso de agentes infecciosos como el VPH a las capas basales de los epitelios. La hipótesis a través de las cuales se ha tratado de explicar la relación de multiparidad y CCU están relacionadas principalmente con traumas obstétricos repetidos, cambios hormonales e inmunosupresión durante el embarazo que pueden ser responsables de alteraciones en la zona de transformación, produciendo ectopia cervical y manteniendo la zona de transformación sobre el exocérvix por muchos años en las mujeres con gran número de embarazos, facilitando con esto la directa exposición al VPH.

La evaluación de la presencia de VPH-AR en relación con la existencia de antecedentes de abortos en las pacientes que corresponden solo a la ciudad de La Paz se puede evidenciar un mayor número de casos positivos en pacientes que estuvieron expuestas a algún aborto. Esto también puede deberse de igual manera a que estas mujeres también están expuestas a traumas obstétricos, alteraciones hormonales e inmunosupresión que favorecen la infección por el VPH. A diferencia de las mujeres estudiadas de la ciudad de Santa Cruz con diagnóstico positivo de infección por el VPH-AR, se evidencio para este grupo un mayor

número de casos positivos en mujeres que no tuvieron ningún aborto, evidenciando que en esta población la variable de número de abortos y su correlación con el número de casos positivos para VPH-AR es inversamente proporcional, indicando que otros son los factores que influyen para el aumento de número de casos positivos para el VPH-AR.

Al correlacionar la variable existencia de cesáreas en las pacientes con diagnóstico positivo a la infección por VPH-AR se evidencio una marcada diferencia de un menor número de casos positivos para e VPH-AR de ambas poblaciones estudiadas. Por lo tanto la reducción del riesgo asociada al antecedente de cesárea sugiere que el traumatismo que se produce durante el parto vaginal ejerce un efecto sobre el riesgo de infección de diferentes agentes infecciosos, sobre todo la activación del VPH.

Una segunda etapa del estudio incluyó el desarrollo de PCR. Primeramente se seleccionaron 23 muestras que dieron positivas a la infección del VPH-AR oncogénico: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 identificados por el test hc2, de estas 23 muestras: 14 corresponden a la ciudad de La Paz de 83 casos estudiados y 9 a la ciudad de Santa Cruz de 77 casos estudiados. Estas 23 muestras cervicales se sometieron al procedimiento de extracción y purificación de DNA, utilizando un protocolo de extracción optimizado y estandarizado por el laboratorio de Virología del Instituto SELADIS, dicho protocolo permite la obtención a partir de las muestras celulares, la mayor cantidad posible de DNA y con un grado de pureza óptimo para ser sometido al proceso de amplificación. Dicho protocolo se basó en la técnica de extracción con fenol-cloroformo y purificación con etanol, técnica descrita por Sambrook. Existiendo modificaciones básicamente en los reactivos, concentraciones, tiempos y temperaturas utilizados en la primera etapa de desnaturalización del proceso de extracción.

Al corroborar la optimización del protocolo de extracción de DNA, para la determinación de pureza y cantidad de DNA obtenidos mediante espectrofotometría. Se determinó una pureza dentro del rango establecido como aceptable (1, 65 a 1, 85 de relación de

absorbancia a 260/280nm); el resultado fue dentro de este rango 1,55 a 1,75 considerando aceptable. Evidentemente también se obtuvo una gran cantidad de DNA medido por espectrofotometría.

Una tercera etapa de estudio incluyó la tipificación de dos genotipos de VPH-AR oncogénico muy frecuentes en las pacientes con diagnóstico positivo de LIEAG y CCU a nivel mundial, siendo estos VPH-AR 16 y VPH-AR 18, se usó el set comercial “VPH16/18 de *Biotechnologies*” que utiliza iniciadores que amplifican un fragmento de 425 pb para la detección de VPH-18 y de 325 pb para VPH- 16 correspondientes a la región del gen E6. De acuerdo a los resultados obtenidos se mostraron una mayor frecuencia de presencia de coinfección por los VPH-AR 16 y 18, en ambas poblaciones, de estas la frecuencia más alta se encontró en la población de Santa Cruz con 67% (n= 6/23) casos positivos y luego la ciudad de La paz con 36% (n=5/23). En cuanto a la frecuencia de infección por el VPH-AR 16 se registró 29% (n=4/23) para la ciudad de La Paz y 0% (n=0/23) para Santa Cruz. También se registró la frecuencia de infección por el VPH-AR 18 con el 14% (n=2/23) para La Paz y 22% (n=2/23) para la ciudad de Santa Cruz, a la vez se conoce la frecuencia de la presencia de infección por otros genotipos de VPH-AR con 21% (n=3/23) para la ciudad de La Paz y 11% (n=1/23) para Santa Cruz. De acuerdo con estos datos las mujeres de la ciudad de Santa Cruz presentan el mayor riesgo de adquirir la infección por los dos genotipos potencialmente oncogénicos, VPH-AR 16 y 18, factor importante para el desarrollo de lesiones precancerosas y el CCU. Por otro lado, se explicaría la razón del aumento de frecuencia de VPH-AR en mujeres mayores de 41 años para delante de la ciudad de Santa Cruz, evidenciando con esto mayor persistencia viral y probable CCU, ya que estudios hacen referencia que la infección múltiple estaría asociada con persistencia viral y un mayor riesgo de progresión de la enfermedad, no está claro si esto es debido a la susceptibilidad del hospedero, la interacción entre los virus o la probabilidad de progresión independiente en cada tipo viral.



De acuerdo con todo esto es importante recalcar las ventajas que puede lograrse con la utilización de técnicas moleculares e incluirlas dentro de los programas de detección precoz del CCU. Toda vez que para la detección del VPH y de sus distintos genotipos se emplean sondas moleculares, basadas en la secuencia de los ácidos nucleicos de diferentes agentes causales de muchas patologías; las técnicas moleculares son una de las herramientas más sensibles y específicas disponibles actualmente y por ello se ha empleado extensivamente en la detección, genotipificación y evaluación de la carga viral del VPH en el diagnóstico precoz de CCU, lesiones precancerosas, monitoreo de tratamiento, lo que hacen a las políticas de intervención en la prevención del Cáncer efectivo y eficiente.

Por otro lado actualmente, el conocimiento de los dos tipos de VPH-AR oncogénicos 16 y 18 ha permitido establecer medidas de prevención primaria para esta neoplasia. También se hacen esfuerzos para desarrollar algún tipo de vacuna que proteja al huésped de la infección por VPH, evite la reinfección o induzca la regresión de lesiones ya establecidas. Nuevas estrategias para el control de CCU serán aconsejables cuando los métodos terapéuticos y vacunas preventivas sean bien establecidas y demuestren su efectividad contra los tipos carcinogénicos del VPH. De este modo resulta importante evaluar la distribución de distintos tipos, con el fin de lograr métodos de control eficientes dirigidos a poblaciones específicas.

## 10 CONCLUSIONES.

### 10.1 Conclusión General

- En el presente trabajo se logró determinar mayor riesgo de infección por genotipos de VPH-AR oncogénico en mujeres de la ciudad de La Paz 17% (n=14/83) en relación a Mujeres de la Ciudad de Santa Cruz 12% (n=9/77) que asistieron a sus consultas ginecológicas del Hospital de La Mujer y El Torno respectivamente y logrando relacionar esta presencia con los cofactores de riesgo para cáncer cérvico uterino.

### 10.2 Conclusiones Específicas

- Se relacionó la edad con las pacientes positivas para VPH-AR, donde las mujeres más jóvenes de la ciudad de La Paz presentan mayor riesgo de infección en relación con las mujeres de Santa Cruz, las cuales presentan mayor riesgo de infección a mayor edad (51- 60 años).
- Se relacionó el consumo de tabaco, alcohol y anticonceptivos orales con las pacientes positivas para VPH-AR. Ninguna de estas variables fue significativo para las mujeres de la Ciudad de La Paz, ya que estas mujeres informan de no consumo, pero, en mujeres de Santa Cruz, el consumo de alcohol, aparentemente representa un factor de riesgo, encontrando mayor número de pacientes positivas de infección por este virus.
- Se relacionó también el número de embarazos, partos, abortos y cesáreas con las pacientes positivas para VPH-AR oncogénico. Donde estas variables presentan una relación directamente proporcional, donde, los casos positivos de infección por el VPH-AR se incrementan cuanto mayor es el número de embarazos, partos y abortos en mujeres de La Paz, pero, en mujeres de Santa Cruz el aborto no representa factor de

riesgo. A la vez, la cesárea, si favorece a la reducción de infección por el VPH-AR en ambas poblaciones estudiadas.

- Se determinó mayor frecuencia del genotipo VPH-AR 16 en mujeres de la ciudad de La Paz (29%), pero en mujeres de Santa Cruz se registro mayor frecuencia para el genotipo VPH 18 (22%). Sin embargo el riesgo de infección por los dos genotipos oncogénicos VPH 16 y 18 en ambas poblaciones de estudio es alto en relación a la infección por un solo genotipo, dando referencia el porqué de la alta incidencia de CCU en nuestro país ya que estos genotipos son responsables del desarrollo de CCU del 100% en países en vías de desarrollo.

## 11 PERSPECTIVAS.

- Es importante llevar a cabo más estudios en nuestra población, para evaluar la infección por el VPH y los factores de riesgo relacionados con la persistencia de infección por este virus, infecciones con múltiples tipos del VPH así como de sus variantes, también estudios nutricionales o la presencia y persistencia de otras infecciones de transmisión sexual, con la finalidad de diseñar una estrategia integral de prevención del CCU en nuestro país.
- Pensar en la utilización de métodos moleculares para la detección directa del genoma del VPH con el tamizaje citológico aumentando y garantizando una sensibilidad de hasta un 100% en el diagnóstico o como test inicial seguido de la citología para los casos positivos y dando lugar a la detección temprana del virus y facilitando un tratamiento positivo para la prevención del CCU en nuestro país.

## 12 BIBLIOGRAFIA.

1. García D A, Schmitt M, Arregui A C, Castillo M, et Al. Genotipificación del virus del papiloma humano (VPH) en muestras de cepillados cervicales de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá y evaluación de la concordancia de dos métodos basados en PCR. *Rev. Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2010; 61(4): 310-318.
2. Grillo A C, Martínez V M, Morales L B. Virus del Papiloma Humano: Aspectos Moleculares y Cáncer de Cérvix. *Rev. Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2008; 59(4): 310-315.
3. López J, Ancízar A F. Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 2006; 35(1): 5-32.
4. Kasamatsu E, Páez M. Cáncer de cuello uterino y virus del papiloma humano en Paraguay. Perspectivas para la Prevención primaria. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 2006; 4(2): 58-63
5. Sánchez A A, Grimaldo J F, Salazar A C E. Factores de riesgo para el desarrollo de la displasia leve cervical. *Rev. Fac. Med UNAM*. 2009; 52(2):69-72
6. Gates M. Prevención del Cáncer Cervicouterino. Ficha Descriptiva. Alliance for Cervical Cancer Prevention. 2004.
7. Saslow D, Runowick CD, Solomon D. American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 342-362.
8. Concha R M. Diagnóstico y Terapia del Virus Papiloma Humano. *Rev. Chil Infect.*2007; 24(3): 209-214.
9. Luis M. Puig-Tintoré. Utilización del Test de VPH en el Cribado Primario del Cáncer de Cérvix. XVIII Congreso de la AEPCC- Granada. 2006.
10. Muñoz M, Mendoza J A, Téllez L, Noguera M E, et Al. Detección de VPH-16 y 18 en muestras de cérvix de mujeres que acuden a centros asistenciales de la ciudad de Mérida, Venezuela. *Rev. Biomed.* 2003; 14: 61-68.
11. Quintero V M, Cruz G J F, Bastidas M, Marqués L. Detección y Tipificación de Virus del Papiloma Humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Rev. Obstet Ginecol Venez.* 2008; 68(1):25-31.
12. Villanueva P, Díaz P, Guido M, Rangel A, Sotelo R. et Al. Prevalencia de virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo en el epitelio anal de hombres VIH positivos. *Rev. Bioquímica Mex.*2002; 27 (4): 94-102.

13. Human Papilomavirus (HPV) vaccine, Background paper, September 2008. Geneva, WHO. 2008. Disponible: <http://www.who.int/immunization/documents/positionpapers/en/index.html>; accessed 24 March 2009.
14. Gómez S T, Alameda Q F, Carreras C R. Sobreexpresión del RNA mensajero de las Oncoproteínas E6 – E7 del virus del Papiloma humano y detección de P16<sup>INK4a</sup> en la lesión escamosa intraepitelial de bajo grado de cérvix uterino. Tesis Doctoral de la facultad de Medicina. Departamento de pediatría, obstetricia I Ginecología I Medicina Preventiva. Universidad Autónoma de Barcelona. 2009.
15. Rodríguez R M, García R F, Ruiz A J. Virus del Papiloma Humano Situación Actual, Vacunas y Perspectivas de su Utilización. Consejería de Salud. Andalucía 2008. Disponible en: [www.juntadeandalucia.es/salud](http://www.juntadeandalucia.es/salud)
16. Fajardo R O R. Seguimiento a tres años de Mujeres Asintomáticas Portadoras del Virus del Papiloma Humano. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética de la facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2006.
17. Vacunas contra el Virus del Papiloma Humano: Una Nueva Herramienta para la Prevención del Cáncer Cervicouterino. Unidad de Inmunización. OMS. 2005.
18. Undberg J P. Papillomavirus infections in animals. En: Syrjanen K Gissmann, Koss LG. Papillomaviruses and human disease. Berlin wd. Springer – Verlag 1987;41-44
19. Pachón del Amo I, Arteaga R A, Pérez G B, Salmerón G F., et Al. Virus del Papiloma Humano, situación actual, vacunas y perspectivas de su utilización. Ponencia de programa y registro de vacunaciones 2007 Febrero 20.
20. Virus del Papiloma Humano. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Virus\\_del\\_papiloma\\_humano](http://es.wikipedia.org/wiki/Virus_del_papiloma_humano).
21. Captura de Híbridos – la Técnica más fiable en la detección de VPH. 2010. Disponible en: [www.theHPVtest.com](http://www.theHPVtest.com).
22. Consuegra M C, Molina D, Egea B E, Garavito G. El virus del papiloma humano (VPH), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. Revisión Salud Uninorte, Barranquilla (col.) 2004; 19:3 -13.
23. Estructura y Clasificación del Virus Papiloma Humano. 2011; pag. 1-2.

- 
24. Cortes Y H. Papilomavirus y cáncer de cérvix. Rev. Col. de Obs. y Gin. 2003; 54(2): 107- 112.
  25. Carrasco G M, Lorente M A. Neoplasia Intraepitelial Cervical grado II y III: Estudio morfométrico de sus diferencias y relación con el virus del Papiloma Humano. Tesis Doctoral de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Internacional de Catalunya. 2010.
  26. González P A. Factores Inmunológicos y Genéticos de la Infección por el Virus del Papiloma Humano en la Neoplasia Cervical Intraepitelial. Tesis Doctoral de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.2010.
  27. Guerra T A, Gonzales G E. El virus del Papiloma humano. Repercusión en la patología dermatológica de las nuevas vacunas. Más Dermatol. 2008; 5: 4 – 13. Disponible en: <http://www.masdermatologia.com>
  28. Núñez J T, Delgado M, Gonzales J, Mindiola R, Velázquez J. Prevalencia y Factores de riesgo en la Infección por el Virus del Papiloma Humano en Mujeres asintomáticas en un área rural urbana Venezolana. Rev. Invest. clin. 2009; 50(2):203-212.
  29. García T J. Actualización sobre la historia del Virus del Papiloma Humano en Venezuela y su relación con el Cáncer Cervical. ISSN 1317-987X. Maracaibo Venezuela. 2006; 27.
  30. Juárez A G A. Diagnóstico molecular del Virus del Papiloma Humano (VPH): El uso de PCR en tiempo real y su relevancia diagnóstica. Tesis de Maestría en Ciencias en especialidad de Biomedicina Molecular del Instituto Politécnico Nacional de D.F. México. 2007.
  31. Calixto G M. Vacunas Contra el Papiloma Virus Humano. Tesis de Especialización en Laboratorio de Inmunología Clínica de la Facultad de Ciencias Básicas de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. 2005.
  32. Smal C. Oligomerización de la Oncoproteínas E7 del Papilomavirus humano y su interacción con el regulador de transcripción y replicación viral E2. Tesis Doctoral en el área de ciencias la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. 2010.
  33. Rivera Z R, Delgado D J, Painel P V, Barrero P R, Larraín H A. Mecanismo de Infección y Transformación Neoplásica producido por Virus Papiloma Humano en el Epitelio Cervical. Rev. Chil. Obstet Ginecol. 2006; 71(2): 135-140.

34. Lizano S M, Carrillo G A, Contreras P A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología* 2009; 4: 205 – 216. Disponible en: [lizano@servidor.unam.mx](mailto:lizano@servidor.unam.mx).
35. Ball E. Virus del Papiloma Humano. *Biología Molecular, genética y mecanismo oncogénico. Parte I. Dermatología Venezolana* 1998; 36(4):1-6
36. Infección por el Virus del Papiloma Humano. *Virus del papiloma humano (Papilomavirus). Suplemento 1. Diciembre 2001.* 12.
37. Suárez M A, Gómez E, Aragón Vidart, de la Garza P. Detección y Tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2006; 19 (2): 161-166.
38. Guglielmo C Z, Rodríguez B A, Ávila H M, Veitía M D, et Al. Virus del Papiloma Humano y Factores de Riesgo. *Rev. Venez Oncol.* 2010; 22 (1): 32-38.
39. Virus del Papiloma humano: Información sobre el VPH para los médicos. Centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) 2007. Disponible en: [www.cdc.gov/std/hpv/screening](http://www.cdc.gov/std/hpv/screening).
40. García T J, Molina J y Blasco O E. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. *Rev. Invest Clin.* 2010; 51 (2): 193-208.
41. Infección por el Virus del Papiloma Humano. Asociación de Microbiología y Salud. Bilbao. 2005: Pag. 1-20. Disponible en: [www.amys-microbiología.com/pdf/REUNION\\_AMYS\\_\(VPH\)\\_05.pdf](http://www.amys-microbiología.com/pdf/REUNION_AMYS_(VPH)_05.pdf)
42. Lybarger J A, Spengler R F, De Rosa C T. Priority Health conditions: an integrated strategy to evaluate the relationship between illness and exposure to hazardous substances. Atlanta: Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades. 2002. Disponible en: [www.atsdr.cdc.gov](http://www.atsdr.cdc.gov).
43. Ganén P I, Aguilar P M. Cáncer y Virus. Revisiones bibliográficas de la Facultad de Ciencias Médicas de Provincia Guantánamo. 1998. Pag. 23 – 28.
44. Hernández M M, De los Angeles R H M. Oncogenes y Cáncer. *Rev. Cubana Oncol.* 1999; 15 (2): 131-9.
45. Almonte M, Muñoz N. Carga de Cánceres Asociados con el Virus Papiloma Humano en América Latina. *Rev. Per Ginecol Obstet.* 2007; 53 (2): 93 – 97.



- 
46. Erazo D J V. Manual de Patología Cervical. Unidad de Patología Cervical de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca. 2007: 2-78.
  47. León C G, Faxas M E. Cáncer de cuello uterino: aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia. Rev. Cubana Med. 2004; 43 (1): 1-8. Disponible en:file:///D:/documentos%20de%20PP/Revistas%20Terminadas/revistas%20para%20revisar/med08104.htm.
  48. Hilario E. Morfología del Cérvix Uterino. Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. 2007.
  49. Mendoza L P, Páez M, Insaurrealde A, Rodríguez M I, Castro A, Kasamatsu E. Frecuencia y carga viral relativa del virus del Papiloma Humano de alto riesgo según el diagnóstico citológico en mujeres paraguayas por captura híbrida II. Rev. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2010; 6 (1): 6-13
  50. López F J A. Cérvix Normal: Colposcopia, Citología, Histología. XVIII Congreso de la AEPC-Granada. Curso de Colposcopia. 2006.
  51. Tejido Epitelial. Fac. Cs. Ex. Qcas. Y Nat de la Universidad Nacional de Misiones. Compendio 2004: 1 - 8.
  52. Mabota de Costa F A, Carreras C R. Comparación de las variables epidemiológicas y biológicas de pacientes con Cáncer de Cérvix procedentes de las ciudades de Maputo (Mozambique) y Barcelona (España). Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. 2005.
  53. García P J. Que hay en el Horizonte sobre el Virus del Papiloma Humano, Vacunas y el Control del Cáncer Cervical. Rev. Perú Med Exp Salud Pública. 2007; 24 (3): 272-279.
  54. Larizgoitia I. Diagnóstico precoz del cáncer cervical: Conocimiento actual sobre viejas y nuevas tecnologías. Barcelona: Agencia de Evaluación de Tecnología y Recerva Medica. Departamento de Sanidad y Seguridad Social. Generalidades de Catalunya. BRO2/ 2001; 1 – 15.
  55. García M C, Ortiz J, Antúnez P, Briz T S, et Al. Aplicación de Técnicas complementarias, a la citología, para la detección del Virus del Papiloma Humano (VPH) en lesiones epiteliales del aparato genital femenino. V Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2002: 1- 25.
  56. Castellagué X, Garland S, Cortés X, et Al. El Próximo paso en el Cribado del Cáncer de Cuello Uterino. Bypass Ediciones C/ Bruselas, 7C. Madrid España. 2009; 17: 3-16.

- 
57. García T J, Molina J, Blasco O E. Una actualización sobre la ayuda de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. Rev. Vitae ISSN 1317-987X. 2007.
58. Bosch X, Castellaugué X, Garland S, Cortés X, et Al. El Impacto Real de las Vacunas en los Países Desarrollados Radicará en la Reducción del Coste de los Programas de Cribado. Bypass Ediciones C/ Bruselas, 7C. Madrid España. 2005; (7): 1-15. Disponible en: [www.hpvtoday.com](http://www.hpvtoday.com).
59. Pallares J, Buetas P, González S. Utilidad de la citología cervical en el diagnóstico temprano del cáncer de cérvix. El sistema Bethesda 2001. Serv.de Anat. Pat. y Genet. Mol. España. 2006; (1.625): 45 – 48. Disponible en: [www.doyma.es/jano](http://www.doyma.es/jano).
60. Carrol L. Nomenclatura de las Lesiones Cervicales ( de Papanicolau a Bethesda 2001). Rev. Esp Patol. 2003; 36 (1): 5 – 10.
61. La cruz P C. Nomenclatura de las Lesiones Cervicales. 2005: 1-5. Disponible en: [www.conganat.org/7congreso/PDF/538.pdf](http://www.conganat.org/7congreso/PDF/538.pdf)
62. Vivar N. Sistema Bethesda: Citología Cérvico – Vaginal. Boletín 1. 2006. Disponible en: [leber.saenz@netlab.com.ec](mailto:leber.saenz@netlab.com.ec).
63. Molano M. La Guerra entre el Sistema Inmune y la Infección por el VPH. Rev. Colomb Cancerol. 2009; 13 (2): 67-68.
64. Rincón O L, Pareja L R, Jaramillo S, Aristizábal B H. Virus del Papiloma Humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. Rev. Col. de Obst. y Ginecol. 2007; 58(3):202 – 212.
65. Guimaraes G M A, Donadi E A. Immune Cellular Response to VPH: Current Concepts. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2004; 8 (1): 1-9. Disponible en: [www.bjid.com-br](http://www.bjid.com-br).
66. Rincón O L, Pareja L R, Jaramillo S, Aristizábal B H. Virus del Papiloma Humano, Respuesta Inmune y Cáncer Cervical: Una Relación Compleja. Rev. Colom de Obstet y Ginecol. 2007; 58 (3): 202-212.
67. Ball E. Virus Papiloma Humano. Biología Molecular, Genética y Mecanismo Oncogénico. Parte II. Rev. Derm. Venez. 1999; 37: 5-10.
68. Alba M A, Torné B A, Vitaplana V E, Coll C C. La Infección por Papilomavirus, Separata de Documento de Consenso, SEGO, SEC, AEPCC. 2002: 9-55.

- 
69. Arriagada R, Suarez P E, Nazzal N O, Larraguibel P R, et Al. Oncogénesis viral: virus papiloma humano (VPH) y cáncer cervicouterino. Rev. Obstet Ginecol. 2007; 2(1): 71-78.
70. Lancaster W D. Historia Natural de la Infección del Cérvix Uterino por el Virus Papiloma Humano. Rev. Per Ginecol Obstet. 2007; 53 (2): 84-92.
71. Alba M A, Torné B A, Vitaplana V E, Coll C C. La Infección por Papilomavirus, Separata de Documento de Consenso, SEGO, SEC, AEPCC. 2002: 9-55.
72. Aguilar F K, de los Ángeles R H M, Hernández M M, et Al. Papiloma viral humano y cáncer de cuello uterino. 2008. Disponible en: [kaf@infomed.sld.cu](mailto:kaf@infomed.sld.cu).
73. Hernández G C, Smith S J, Lorincz A, Arreola C E, Lazcano E, Hernández A M, Salmerón J. Prevalencia de infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo y factores asociados en embarazadas derechohabientes del IMSS en el estado de Morelos. Salud Pública de México. 2005; 47(6):423 – 429.
74. Valdivia L I M, Aguayo G F, Pruyas A M, Snijders P J, et Al. Genotipos de Virus Papiloma Humano (VPH) en pacientes con Cáncer cérvico-uterino en un Hospital Público y una clínica privada de Santiago, Chile. Rev. Chil Infect. 2010; 27 (1): 11-16.
75. Solís T M, Aguayo F, Vargas M, Olcay F, Puschel K, et Al. Factores de riesgo de alteraciones citológicas del cuello uterino en mujeres chilenas: Un estudio de casos y controles. Rev. Med Chile. 2010; 138: 175-180.
76. Brebi M P, Ili G C G, López M J, García M P, Melo A A, Montenegro H S. et Al. Detección y tipificación de virus papiloma humano en adenocarcinoma de cuello uterino mediante *reverse line Blot*, Región de La Araucanía, Chile. Rev. Med Chile 2009; 137: 377-382.
77. Vacuna Contra el Virus del Papiloma Humano (VPH). Introducción de Nuevas Vacunas. Argentina. Lineamientos HPV. 2011: 5-50.
78. La Prevención del Cáncer cervical a Nivel Mundial. Population Reference Bureau. 2004: 2-20. Disponible en: [WWW.PRB-ACCP.PreventCervCancer.SP](http://WWW.PRB-ACCP.PreventCervCancer.SP).
79. Conocimientos, actitudes y prácticas respecto al Cáncer de Cuello Uterino en el municipio de Sucre, Marie Stopes: Bolivia. 2004: 1-12. Disponible en: [http://eng.mariestopes.org.bo/files/recursos/Investigacion\\_CCU.pdf](http://eng.mariestopes.org.bo/files/recursos/Investigacion_CCU.pdf).
80. Ortiz D. Nueve mujeres mueren cada 2 días por cáncer uterino y de mama. 2011. Disponible en: [www.eldeber.com.bo/imprimir.php?id=110713222359](http://www.eldeber.com.bo/imprimir.php?id=110713222359)

- 
81. Pardo I, Zárate A, Padilla H. et Al. Plan Nacional de Prevención Control y Seguimiento de Cáncer de Cuello Uterino 2009-2015. Ministerio de Salud y Deportes. 2009: 13-45. ISBN 978-99954-733-8-9.
82. Bosch X, Castellagué X, Garland S, Cortés X, et Al. Simposio Internacional Aspectos Clínicos y Científicos del Virus del Papiloma Humano en Medellín. Colombia. 2007; 12: 2-15. Disponible en: [www.hpvtoday.com](http://www.hpvtoday.com).
83. Cáncer de Cuello Uterino. Publicación por UNFPA Bolivia. Disponible en: <http://bolivia.unfpa.org>.
84. Estrategia y Plan de Acción Regional para la Prevención y el Control del Cáncer Cervicouterino en América Latina y El Caribe. OMS. 2010: 3-17.
85. Iniciativas de PATH para la Prevención del Cáncer Cervical. 2009: 1- 11. Disponible en: [ww.path.org](http://ww.path.org).
86. August A R, Blumenthal P, Cabral D, Chijerenje M, et Al. Control Integral del Cáncer Cervicouterino. Organización Mundial de la Salud. 2007: 17-60. Disponible en: [www.who.int/chp](http://www.who.int/chp).
87. Minervini M V, Aristimuño A M, De Agostio L E. La Prevalencia del VPH. Congreso III Internacional Clinical Virology Symposium And Advances In Vaccines, Argentina. 2010.
88. Barba E J R. Cáncer cervicouterino: ¿Qué papel etiológico juega la infección con el virus del papiloma humano? Rev. Mex Patol Clin. 2009; 56 (2):83-104.
89. Cofiño R F, Hernández A R, Natal R C. Prevención del Cáncer de Cuello de Útero, recomendaciones para la detección precoz. 2009: 7-31. Disponible en: [www.asturias.es/cuidartusalud](http://www.asturias.es/cuidartusalud).
90. El Cáncer de Cérvix. Publicación de los NIH 09-2047S. Instituto Nacional de Cáncer. 2009: 1-50. Disponible en: <http://www.cancer.gov/publications>.
91. Bosch X, Castellagué X, Garland S, Cortés X, et Al. El Próximo paso en el Cribado del Cáncer de Cuello Uterino. Bypass Ediciones C/ Bruselas, 7C. Madrid España. 2009; 17: 3-16. [www.hpvtoday.com](http://www.hpvtoday.com).
92. Navarrete S M E, Muñoz V P F. Prevalencia de PAP Positivos para Cáncer Cervicouterino, en mujeres Menores de 25 años, Bajo Control en el Consultorio Externo de PAILLACO. Enero 2003 a Diciembre de 2006. Tesis de Licenciatura en

- Obstetricia y Puericultura de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. 2007.
93. Garnica L Y, Agudelo J D. Cancer de Cuello Uterino-Generalidades. Asociación Española contra el Cáncer. 2008:1-10. Disponible en: [www.todocancer.org.aecc](http://www.todocancer.org.aecc).
94. Sirera G, Videla S, Castella E, Cavellé L, Grané N, et Al. Contribución de la captura de Híbridos de Segunda generación del virus del papiloma humano en el cribado de afección cervical en mujeres con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Rev. Med Clin (Barc). 2005; 125 (4):127-131.
95. Esta Usted Preparado para la Nueva Era de Pruebas para Virus del Papiloma Humano. Prueba de detección del VPH (HC2).2004. Disponible en. [info@quimiolab.com](mailto:info@quimiolab.com).
96. Clavel C, Masure M, Bory J P, Putaud I, et Al. Confía Usted exclusive, mente en la Citología Cérvico Vaginal (CCV) para la detección de Cáncer de Cuello Uterino?.2007; 2. Disponible en. [info@quimiolab.com](mailto:info@quimiolab.com).
97. Manual de Procedimientos Prueba VPH por Captura Híbrida. Quito-Ecuador. Disponible en: [quimiolab.ecuador@quimiolab.com](mailto:quimiolab.ecuador@quimiolab.com).
98. Domingo A A. Las Enfermedades e Infecciones de Transmisión Sexual. Rev. Pediatr Integral. 2009; 13(3): 223-238.
99. Bosh F X, de Sanjosé S, Castellsagué X. Virus del Papiloma Humano: riesgo oncogénico y nuevas oportunidades para la prevención. SERC. Institut Catala de Oncología. L Hospitalet. 2004. 21: 53:14. Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol24/n1/colab.html>.
100. Papiloma Humano HPV. Disponible en: [www.laboratorio-sao-camilo-informes-cientificospapilomavirus-humano-hpv](http://www.laboratorio-sao-camilo-informes-cientificospapilomavirus-humano-hpv). 2005:2.
101. Castellanos M M R. Cáncer cervicouterino y el VPH Opciones de detección. Rev. Fac. Med. UNAM. 2003; 46 (2):62-66.
102. Serman F. Cáncer Cervicouterino: Epidemiología, Historia Natural y Rol del Virus Papiloma Humano Perspectivas en Prevencion y Tratamiento. Rev. Chil Obstet Ginecol.2002;67(4): 318-323.
103. Torres T A G, Baca B E. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Rev. Elementos. 1995; 3(23):16-21.

104. Rodríguez S I P, Barrera S H A. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su Invención. Rev. Ciencia UANL. 2004; 7(3):323-335.
105. Reacción en cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reacción, PCR). Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: <http://www.thehealthnews.org/news.org/news/06/08/02/pcr.html>
106. Consenso de Papiloma Virus Humano (HPV) y Herpes Simplex Virus (HSV). Genital. Soc. Arg. De Dermatología.2004. Disponible en: <http://www.sad.org.ar>.
107. Virus del Papiloma Humano, Situación Actual, Vacunas y Perspectivas de su Utilización. Andalucía. 2008: 2-27.
108. Espinosa A L. Guía Práctica Sobre la Técnica de PCR. Las Herramientas Moleculares. Cap. 17. 517-535.
109. Yábar V C A. Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y DNA. Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud. Lima Perú. 2003: 1-59. Disponible en: [www.ins.gob.pe](http://www.ins.gob.pe).
110. Morales B I. Electroforesis. 2008. Disponible en: <http://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis>.
111. Facultad de Medicina UNAM, Departamento de Bioquímica. Bioquímica y Biología Molecular. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, México, 2000.
112. De Sanjosé L S, García G A M. Virus del Papiloma Humano y Cáncer: Epidemiología y Prevención. Monografía de la Sociedad Española de Epidemiología de la Universidad de Valencia. 2006: 3-140.
113. Flores Y, Cuzick J. Prueba para La Vida Preventive Oncology International México, A. C.: Detección de Virus de Papiloma Humano “Alto Riesgo” y Lesiones Precancerosas y Cancerosas del Cérnix. Salud Pública Mex.2007.
114. Cervantes J, Lema C, Hurtado L, Andrade R, Quiroga G, et Al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection In Rural Villages of the Bolivian Amazon. Rev Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2003; 45 (3): 131-135.
115. López S A, Lizano S M. Cáncer Cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La Historia que no Termina. Rev. Cancerología 1 de Mex.. 2006: 31-55.

116. Fisiología de la Reproducción Femenina. XIV Jornada de Formación Interhospitalaria del Laboratorio Clínico: 2:31.
117. Rodríguez M F I. Nuevas Indicaciones de las vacunas contra el Virus del Papiloma Humano. Infectología Pediatría. 2009. Disponible en: [www.nuevas\\_indicaciones\\_de\\_la-vacuna\\_del\\_VPH](http://www.nuevas_indicaciones_de_la-vacuna_del_VPH).
118. Mancilla R S E. Procedimientos Moleculares para la Identificación y Tipificación del Virus del Papiloma Humano en Cáncer Cérvico Uterino y Lesiones Intraepiteliales Precursores. Tesis de Especialidad en Salud, Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia. 2011.