

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD**



**PROCEDIMIENTOS MOLECULARES PARA LA
IDENTIFICACION Y TIPIFICACION DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO EN CANCER CERVICO UTERINO
Y LESIONES INTRAEPITELIALES PRECURSORAS**

**Tesis para optar al Grado de Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud, Mención
Microbiología**

POR: Lic. SILVIA EUGENIA MANCILLA RIVERA

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

**LA PAZ – BOLIVIA
2011**

DEDICATORIA

A mi hijo Ignacio por ser la razón de mi vida que me impulsa a seguir adelante todos los días.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a Dios y a la Virgen por iluminar mi vida y brindarme fortaleza siempre.
- Agradezco respetuosamente a la Dra. Katty Terrazas Aranda por la confianza, apoyo y colaboración incondicional, que hicieron posible la elaboración del presente trabajo. Muchas gracias Doctora.
- Al Dr. Jaime Sánchez por todo su apoyo incondicional, muchas gracias.
- A mis padres por estar siempre a mi lado, brindándome constantemente su amor y ayuda incondicional, que fue importante para la conclusión de este objetivo.
- Agradezco al Instituto SELADIS por abrirme sus puertas y haberme permitido la realización de este trabajo así dar un paso más en mi formación profesional.
- Al Hospital de la Mujer, gracias por toda la colaboración prestada.

RESUMEN.

El cáncer de cuello uterino es una enfermedad neoplásica maligna de cérvix y cuya progresión final conduce a la muerte. En el mundo entero representa el cáncer más común, después del cáncer de mama, en los países en vías de desarrollo representa el principal problema de salud pública atribuible a cáncer que afecta a la población femenina. En Bolivia el cáncer de cuello uterino tiene una de las tasas más altas de incidencia de 58.1 nuevos casos por cada 100,000 mujeres al año siendo responsable de la muerte de 2 a 4 mujeres cada día.

Las lesiones precursoras que dan origen a cáncer cervical pueden ser irreversibles o mantenerse in situ por varios años antes del establecimiento del cáncer invasor. Así mismo evidencias identifican el rol etiológico del Virus Papiloma Humano (VPH) en el desarrollo del cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras, concluyendo que el factor definitivo en la etiología de este cáncer es la infección persistente del cérvix por algunos genotipos de alto riesgo oncogénico de VPH.

El diagnóstico oportuno de lesiones precursoras y del cáncer cervical basado en el examen ginecológico, incluye el estudio citológico, colposcópico e histopatológico. En la actualidad se incorporó a esta estrategia métodos moleculares dirigidos específicamente a la detección del ADN viral, que además permiten con elevada sensibilidad y especificidad la identificación genética de virus relacionados con alto riesgo oncogénico.

De acuerdo con esto, el presente trabajo tuvo como objetivo implementar, desarrollar y evaluar el uso de procedimientos moleculares para el diagnóstico de VPH mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y valorar su aplicación en muestras cervicales de cáncer cérvico uterino y lesiones intraepiteliales precursoras, con la finalidad de contribuir al desarrollo de tecnología para la detección temprana y precoz del cáncer cervical en nuestro medio.

La primera etapa del desarrollo de la PCR, incluyó la optimización de un protocolo de extracción de genoma viral. La segunda etapa incluyó el desarrollo del proceso de amplificación, para lo cual se utilizó como sustrato genético la línea celular SiHa. Se

utilizaron los iniciadores de consenso MY09/MY11, que permiten la amplificación de un fragmento de ADN viral de 450 pb presente en una región conservada del gen de expresión tardía L1 presente en todos los VPH, la identificación del producto se realizó mediante revelado por electroforesis en gel de agarosa.

Establecido el diagnóstico molecular del VPH mediante PCR, se llevó a cabo la detección de infección en muestras cervicales. Se trabajó con muestras celulares cervicouterinas de un total de 93 pacientes participantes de consulta colposcópica, clasificadas en cuatro grupos en función a su diagnóstico histopatológico. En nuestro estudio determinamos una frecuencia de 49% (n=46/93) de casos positivos de infección por VPH mediante detección de ADN/VPH.

Se encontró una distribución de las muestras positivas en los diferentes estadios clínicos de la siguiente manera: 9/21 de citologías normales (43%); 16/47 lesiones de bajo grado (34%); 16/20 lesiones de alto grado (80%) y 5/5 cáncer invasor (100%), observándose una clara tendencia de mayor positividad a infección por VPH según avanza el grado de lesión, lo que apoya la participación de este virus en el desarrollo de cáncer cervical.

Se pudo evidenciar una tendencia de mayor número de casos positivos de infección por VPH en pacientes que tuvieron mayor número de parejas sexuales, lo que concuerda con diversos estudios epidemiológicos que indican que el riesgo de cáncer cervical está fuertemente influenciado por factores relacionados con ciertas conductas sexuales como el número de parejas sexuales, edad de inicio de vida sexual activa y la conducta sexual de la pareja. Al evaluar la frecuencia de casos positivos de VPH en relación al número de partos se puede evidenciar que existe una relación proporcional donde los casos positivos se incrementan en las mujeres con más de 1 parto.

Una tercera etapa del estudio incluyó la tipificación de dos genotipos de alto riesgo oncogénico muy frecuentes a nivel mundial y responsables de la mayoría de las neoplasias cervicales: VPH-16 y VPH-18. Se tipificaron 17 muestras ADN/VPH positivas, 2 con metaplasia epidermoide, 10 casos con lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG) y 5 con diagnóstico de cáncer invasor. Los resultados obtenidos mostraron una frecuencia de infección por VPH-16 en el 100% (n=17) de las muestras tipificadas, 53% (n=9) de

infección por VPH-18, por lo tanto con estos valores 53% de coinfecciones VPH16/VPH18.

La frecuencia de infección de estos genotipos de alto riesgo oncogénico en función al diagnóstico cito-histopatológico de las pacientes fue de 100% de infección por VPH-16 en los tres grupos con diferente estadio clínico, es decir que este genotipo se hizo presente en las 17 muestras analizadas. Por otro lado VPH-18 fue encontrado en menor frecuencia en casos de lesión más avanzada.

De acuerdo a estos resultados se logró desarrollar la técnica molecular PCR para el diagnóstico de VPH, valorar su aplicación en muestras cervicales de cáncer cérvico uterino y lesiones intraepiteliales precursoras y finalmente la identificación de la frecuencia de los genotipos de alto riesgo oncogénico de mayor incidencia VPH-16 y VPH-18.

INDICE

- I. INTRODUCCION**
- II. MARCO TEORICO**
 - 2.1 CANCER**
 - 2.2 CANCER CERVICOUTERINO (CaCu)**
 - 2.2.1 El Cérvix**
 - 2.3 DESARROLLO DEL PROCESO DE CANCER CERVICAL**
 - 2.4 CLASIFICACION HISTOLOGICA Y CITOLOGICA DE LESIONES PRECANCEROSAS**
 - 2.4.1 Terminología actual "Nomenclatura Bethesda 2001"**
 - A. Terminología para Citología Negativa**
 - B. Reporte de Microorganismos**
 - C. Células Escamosas Anormales**
 - D. LIE-BG y LIE-AG**
 - E. Células Glandulares Anormales**
 - 2.5 EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER CERVICOUTERINO**
 - 2.6 CANCER CERVICOUTERINO EN BOLIVIA**
 - 2.7 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL DESARROLLO DE CANCER CERVICAL**
 - A. Uso Prolongado de Anticonceptivos Orales**
 - B. Multiparidad**
 - C. Infecciones de Transmisión Sexual**
 - D. Tabaquismo**
 - E. Factores Nutricionales**
 - F. Conducta Sexual**
 - G. Factor Socioeconómico**
 - H. Inmunosupresión**
 - 2.8 EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y SU RELACION CON CANCER DE CUELLO UTERINO**
 - 2.9 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)**
 - 2.9.1 Estructura**
 - 2.9.2 Genoma**
 - 2.9.3 Proteínas virales**
 - A. Proteína E1**
 - B. Proteína E2**
 - C. Proteína E4**
 - D. Proteína E5**
 - E. Proteína Oncogénica E6**
 - F. Proteína Oncogénica E7**

- G. **Proteína E2/E8**
- H. **Proteínas L1 Y L2**
- 2.9.4 **Clasificación**
- 2.9.6 **Clasificación del VPH según riesgo oncogénico**
- 2.9.7 **Epidemiología de la Infección por VPH**
- 2.9.8 **Replicación viral y mecanismos de oncogénesis de VPH**
 - A. **Adhesión, penetración y desensamblaje**
 - B. **Mantenimiento del genoma**
 - C. **Fase proliferativa**
 - D. **Amplificación del genoma, síntesis y liberación de viriones**
- 2.9.9 **Respuesta Inmune Frente a VPH**
- 2.10 **PATOGENIA DEL CANCER CERVICOUTERINO**
- 2.11 **DIAGNOSTICO DE CaCu**
 - 2.11.1 **Citología Exo-Endocervical**
 - A. **Técnica apropiada para el frotis Papanicolaou (Pap)**
 - B. **Estrategias para la correcta toma de muestra citológica**
 - C. **Citología falsa negativa**
 - D. **Causas de citología falsa negativa**
 - E. **Conductas según reporte de citología**
 - F. **Reporte de resultados**
 - 2.11.2 **Colposcopia**
 - A. **Test de IVA**
 - B. **Test de Schiller**
 - C. **Reporte de resultados**
 - 2.11.3 **Histopatología**
 - A. **Reporte de resultados**
 - 2.11.4 **Interpretación de epitelios normales mediante estudio colposcópico junto con Descripciones de Citología e Histología**
 - A. **Epitelio Escamoso Normal**
 - B. **Epitelio Cilíndrico Normal**
 - C. **Zona de Transformación Normal**
- 2.12 **DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO**
 - 2.12.1 **Antecedentes de diagnóstico**
 - 2.12.2 **Diagnóstico molecular de VPH**
 - A. **Diagnóstico molecular de VPH mediante PCR**
 - a) **Fundamento básico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**
 - b) **Revelado por electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**
 - B. **Diagnóstico de VPH mediante técnicas moleculares que no requieren amplificación génica**
 - a) **Hibridación "in situ" fluorescente (FISH)**

- b) Captura de híbridos (HC2)

2.13 TRATAMIENTO

2.13.1 Nuevas opciones en la prevención del cáncer de cuello uterino

A. Las vacunas profilácticas

- a) Las partículas similares al virus (*virus likeparticles* - VLP)

B. Vacunas terapéuticas

III. JUSTIFICACION

IV. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 DISEÑO METODOLÓGICO

5.2 TIPO DE ESTUDIO

5.3 POBLACIÓN EN ESTUDIO

A. Criterios de inclusión

B. Criterios de exclusión

5.4 MUESTRAS BIOLÓGICAS

5.5 DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE INVESTIGACIÓN

5.6 PREPARACIÓN Y CONTROL DE MEDIOS Y REACTIVOS BIOLÓGICOS

5.7 OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE CÉLULAS CERVICOUTERINAS

5.8 ESTUDIO EXPERIMENTAL

5.8.1 Determinación del genoma de VPH: Estandarización de protocolos de extracción de genoma viral

A. Evaluación de protocolos de extracción de genoma viral (ADN-VPH)

B. Cuantificación y determinación de pureza de ácidos nucleicos

- a) Cuantificación y determinación de pureza por espectrofotometría

- b) Cuantificación por corrida electroforética

5.8.2 Determinación del genoma de VPH:

Desarrollo del ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa con revelado por electroforesis en gel de agarosa para identificación de VPH

A. Iniciadores consenso MY09/MY11

B. Establecimiento del proceso de amplificación

C. Revelado por electroforesis en gel de agarosa

D. Interpretación de resultados

5.8.3 Genotipificación de VPH-16 y VPH-18 mediante PCR

A. Revelado por electroforesis en gel de agarosa

B. Interpretación de los resultados

5.9 ESTUDIO DIAGNÓSTICO

5.10 ANALISIS ESTADISTICO

VI. RESULTADOS.

6.1 ESTUDIO EXPERIMENTAL:

- 6.1.1 Evaluación de protocolos de extracción de genoma viral mediante espectrofotometría.**
- 6.1.2 Evaluación de protocolos de extracción de genoma viral mediante corrida electroforética en gel de agarosa**
- 6.1.3 Valoración del proceso de amplificación del genoma viral para la identificación de VPH**

6.2 ESTUDIO DIAGNOSTICO

- 6.2.1 Población en estudio.**
- 6.2.2 Diagnóstico de infección por VPH en las muestras en estudio.**
- 6.2.3 Presencia de infección por VPH en relación al número de parejas sexuales.**
- 6.2.4 Presencia de infección por VPH según número de partos.**
- 6.2.5 Presencia de infección por VPH según presencia de abortos.**
- 6.2.7 Presencia de infección por VPH según presencia de cesáreas.**
- 6.2.7 Presencia de infección por VPH según diagnóstico cito-histopatológico.**
- 6.2.8 Frecuencia de oncovirus VPH en lesiones cervicales.**

VII. DISCUSION.

VIII. CONCLUSIONES.

IX. PERSPECTIVAS.

X. BIBLIOGRAFIA.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anatomía cervical	6
Figura 2: Orificio cervical de diferentes mujeres en función al número de partos	7
Figura 3: Representación esquemática del epitelio escamoso estratificado	9
Figura 4: Representación esquemática del epitelio cervical	10
Figura 5: Tasa de incidencia de cáncer cervical por cada 100.000 mujeres en países de Sudamérica	18
Figura 6: Representación gráfica de la estructura de VPH	29
Figura 7: Representación gráfica del genoma de VPH	30
Figura 8: Ciclo de replicación de VPH	44
Figura 9: Mecanismo de carcinogénesis de VPH en la patogénesis del cáncer cervical	49
Figura 10: Desarrollo de lesiones precursoras hasta el progreso de cáncer cervical	51
Figura 11: Protocolo de manejo de la CITOLOGIA EXO – ENDOCERVICAL	57
Figura 12: Histogénesis del cáncer de cérvix	63
Figura 13: Pasos básicos de la PCR	71
Figura 14: Amplificación exponencial del PCR	72
Figura 15: Tubos de PCR que albergan la mezcla en un volumen total de 100 μ L	<u>72</u>
Figura 16: Termociclador para reacciones de PCR	73

Figura 17: Corrida electroforética en gel de agarosa de los extractos de ADN obtenidos de cada protocolo de extracción evaluado	106
Figura 18: Desarrollo de VPH – PCR mediante revelado por electroforesis en gel de agarosa de bandas de 450 pb correspondiente al fragmento amplificado del genoma viral	108
Figura 19: Frecuencia porcentual de infección por VPH	110
Figura 20: Frecuencia porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH según número de parejas sexuales de las pacientes en estudio	111
Figura 21: Frecuencia porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH según número de partos de las pacientes en estudio	112
Figura 22: Frecuencia porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH según presencia de abortos en las pacientes en estudio	113
Figura 23: Frecuencia porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH según presencia de cesarías en las pacientes en estudio	
Figura 24: Distribución porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH en las 93 muestras estudiadas, agrupados de acuerdo al grado de lesión presentado	
Figura 25: Detección molecular de VPH de alto riesgo oncogénico VPH-16 y VPH-18	
Figura 26: Resultados de la detección molecular de VPH-16 y VPH-18 de las muestras en estudio	
Figura 27: Resultados de la detección molecular de VPH-16 y VPH-18 de las muestras en estudio. Acercamiento de la imagen de la figura 26	
Figura 28: Frecuencia porcentual de casos positivos a la determinación de infección por VPH-16; VPH-18 y coinfecciones VPH-16/VPH-18	
Figura 29: Frecuencia porcentual de casos POSITIVOS a la determinación de infección por VPH-16; VPH-18 y coinfecciones VPH-16/VPH-18 según; diagnóstico cito-histopatológico	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación citológica e histopatológica de lesiones precancerosas	13
Tabla 2: Tasa de incidencia y mortalidad por cada 100.000	17
Tabla 3: Clasificación del Virus del Papiloma Humano según su potencial 36oncogénico	
Tabla 4: Virus del Papiloma Humano y su asociación clínica	37
Tabla 5: Procedimiento de extracción de genoma viral	92
Tabla 6: Procedimiento de extracción de genoma viral	93
Tabla 7: Protocolo de la fase de pre amplificación (mix PCR)	98
Tabla 8: Programas de amplificación	99
Tabla 9: Validación de controles VPH – PCR	100
Tabla 10: Programa de amplificación VPH16/18	101
Tabla 11: Validación de controles PCR VPH16/18	102
Tabla 12: Valores de relación de densidad óptica 260/280 nm y valores de cantidad (ug/mL) de ácidos nucleicos obtenidos de los cinco protocolos de extracción	104
Tabla 13: Número de casos en estudio clasificados según diagnóstico cito-histopatológico	109
Tabla 14: Muestras cervicales sometidas a tipificación de VPH según diagnostico cito - histopatológico	116

I. INTRODUCCION.

El cáncer de cuello uterino o cáncer cervical (CaCu), representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en países industrializados y la primera en algunos países o regiones en vías de desarrollo, registrándose en el mundo cientos de muertes diarias por esta enfermedad ^(49, 61, 76). Estudios epidemiológicos han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, donde diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo, entre ellos el inicio temprano de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, infecciones virales y bacterianas, hábitos reproductivos, uso prolongado de anticonceptivos orales, hábitos dietéticos y tabaquismo entre otros ⁽⁵⁹⁾. Así mismo evidencias identifican el rol etiológico del Virus del Papiloma Humano (VPH) en el desarrollo del cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras, concluyendo que el factor definitivo en la etiología de este cáncer es la infección persistente del cérvix por algunos genotipos de este agente infeccioso ^(49, 59).

La infección por el Virus del Papiloma Humano es frecuente en la especie humana. Existe una gran variedad de enfermedades asociadas con éste, desde la muy común pero benigna verruga vulgaris, hasta el mencionado cáncer cervical ⁽⁷⁷⁾. La infección a nivel genital representa una de las infecciones virales más difundidas en la población mundial al ser transmitida por contacto sexual cercano y repetido. En la actualidad es reconocida como una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más frecuente, pues en general la mayoría de las mujeres y hombres sexualmente activos han estado expuestos a este virus en algún momento de su vida, lo que tiene gran importancia si se considera la asociación que existe entre la infección por algunos VPH y la aparición de carcinomas genitales ^(49, 59, 73).

En los últimos veinte años, se han identificado alrededor de 100 genotipos del virus según diferencias en las secuencias de su ADN. De estos cerca de 40 genotipos infectan el tracto anogenital. Estos virus pueden ser subdivididos en función a su potencial o riesgo oncogénico en dos grupos: de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR) entre los más frecuentes VPH 6, 11 y 42, comúnmente encontrados en condilomas acuminados y lesiones

preneoplásicas de bajo grado de severidad con mínimo riesgo de progresión maligna o infecciones subclínicas que suelen ser transitorias y que casi siempre se resuelven y el segundo grupo de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) principalmente los tipos VPH 16, 18, 31, 33 y 45 los cuales bajo la forma de infección persistente, pueden conducir al carcinoma invasor^(49, 73). Actualmente existen evidencias suficientes para considerar que estos últimos tipos virales, en particular los VPH 16 y 18 son los más carcinogénicos en humanos^(49, 73, 79). Por esto la vacuna anti-VPH está dirigida a la prevención de la infección por estos genotipos virales.

El genoma de los tipos virales de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), está presente por lo general, en una configuración episomal intracelular, aunque también puede integrarse al ADN de la célula hospedadora. Las proteínas virales E6 y E7, son responsables de la transformación celular, debido a su capacidad de unirse e inactivar las proteínas intracelulares p53 y Rb (proto-oncogenes o genes supresores de tumores) del hospedero, estas proteínas de supresión tumoral son responsables de inhibir intracelularmente la acción de productos oncogénicos, detienen la progresión del ciclo celular y están involucradas en los procesos de apoptosis. Su función alterada por oncoproteínas virales, genera fallas en la regulación de la fase S (replicación del ADN) de la división celular y como consecuencia pueden desarrollarse eventos celulares que conducen a malignidad⁽⁷⁹⁾.

El diagnóstico oportuno de lesiones precursoras y de cáncer cervical basado en el examen ginecológico, incluye el estudio citológico, colposcópico e histopatológico. En la actualidad se incorporó a esta estrategia métodos moleculares dirigidos específicamente a la detección del ADN viral, que además permiten con elevada sensibilidad y especificidad la identificación genética de virus relacionados con alto riesgo oncogénico (genotipos). El hecho de que VPH no crece en medios habituales de cultivo y los estudios serológicos sólo tienen validez limitada, las técnicas de detección de ácidos nucleicos, como la amplificación genómica mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se considera una de las más adecuadas⁽⁷³⁾. El diagnóstico molecular de VPH incorporado a los programas de cribado para la prevención de cáncer cervical ha permitido mejorar el

diagnóstico precoz de esta enfermedad y la intervención médica apropiada en la población de riesgo.

De acuerdo con esto, el presente trabajo plantea el desarrollo de procedimientos moleculares para la identificación y tipificación del Virus del Papiloma Humano, con la finalidad de contribuir al desarrollo de tecnología para la detección temprana y precoz del cáncer cervical en nuestro medio.

El presente trabajo describe la estandarización del procedimiento molecular PCR con la utilización de sondas de consenso anti VPH de la región L1 del genoma viral y su aplicación en muestras cervicales. Se reporta frecuencia de VPH en muestras de consulta colposcópica y la determinación en lesiones precancerosas y cáncer VPH positivos de la frecuencia de genotipos de VPH cancerígenos 16 y 18.

J. MARCO TEORICO.

2.1 CÁNCER.

Los seres humanos se encuentran compuestos por células, constituyéndose estas en la unidad vital básica de un ser vivo. Normalmente el cuerpo humano forma células nuevas a medida que se necesitan para remplazar las células que envejecen y mueren ^(1, 2, 10).

El cáncer puede definirse como una enfermedad genética que se caracteriza por un desequilibrio entre la proliferación y la muerte de una célula en un determinado órgano o tejido ^(1, 2, 3). Las células adicionales forman masas de tejido extra llamados tumores los cuales pueden ser benignos o malignos ^(1, 2, 10).

Los tumores benignos no son considerados como cáncer mientras que los malignos si lo son, debido a que las células provenientes de tumores malignos pueden invadir tejidos cercanos y diseminarse a otras partes del cuerpo denominándose estos casos como metástasis ^(1, 2, 3).

El cáncer se desarrolla como un proceso con etapas y factores múltiples, es decir requiere de la presencia de varios factores que bloqueen los mecanismos normales de control de la proliferación y de la apoptosis o muerte celular ^(3, 4). Entre estos factores se incluyen la predisposición hereditaria, la alta frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células cancerosas y la alta frecuencia de mutaciones o alteraciones en genes involucrados en el control de la proliferación celular. Los estudios sobre el origen del desarrollo del cáncer son complicados porque no existen agentes cancerígenos completos; pueden transcurrir varios años entre la exposición a un agente cancerígeno (iniciación) y la inducción posterior del cáncer (progresión) y algunos años más hasta que éste sea clínicamente detectable y se produzca la muerte ⁽⁴⁾.

Se han propuesto varios modelos matemáticos de carcinogénesis, pero el más sencillo y más compatible con los conocimientos biológicos actuales es el de Moolgavkar (1978). En

él se plantea la hipótesis de la mutación ocasional de una célula madre sana; si una exposición concreta estimula la proliferación de células intermedias a partir de esta aumentan las posibilidades de que al menos una célula experimente una o más nuevas mutaciones y produzca un cáncer maligno ⁽⁴⁾.

Entre los diferentes agentes que pueden desarrollar un proceso tumoral se encuentran los biológicos como los virus y hormonas; factores de crecimiento, químicos; fármacos como la ciclofosfamida y el busulfan; compuestos cancerígenos como los hidrocarburos aromáticos del tabaco, B-naftilamina, las nitrosaminas, aminas, asbestos, etc; físicos como radiaciones gama, UV o en general cualquier agente que dañe el ADN alterando los genes ^(3, 4).

2.2 CANCER CERVICOUTERINO (CaCu).

El cáncer de cuello uterino es una neoplasia maligna, que surge por el crecimiento incontrolable de células anormales en el cuello cervical, es decir en la entrada del útero o matriz. La enfermedad comienza como una proliferación atípica de células epiteliales que poco a poco invaden el espesor del epitelio y degeneran en lesiones más graves hasta invadir el estroma que es cuando el cáncer se manifiesta, así como también la invasión del tejido subyacente y la producción de metástasis a distancia, cuya progresión natural lleva a la muerte ^(3, 7, 17, 19, 20).

La infección por algunos genotipos del Virus del Papiloma Humano, se reconoce como la causa principal y necesaria para generar transformaciones celulares preinvasivas e invasivas del aparato genital. La infección por VPH es la infección de transmisión sexual más común a nivel mundial, se estima que afecta al 50% a 80% de las mujeres con vida sexual activa, por lo menos una vez en algún momento de su vida ^(3, 9, 53).

Aunque esta enfermedad puede evitarse y prevenirse, los esfuerzos colectivos para prevenirla no han logrado disminuir su incidencia en la región de las Américas ^(5, 53).

2.2.2 El cérvix.

El cérvix o cuello uterino constituye parte del sistema reproductor de la mujer, se encuentra ubicado en la parte inferior del útero (matriz), continuando hacia abajo la vagina ⁽¹⁰⁾. En términos generales se puede decir que tiene forma cilíndrica midiendo 3 cm de longitud y 2,5 cm de ancho ^(27, 28, 29).

Entre sus funciones:

- ❖ Conecta el útero con la vagina, durante la menstruación, la sangre corre desde el útero por el cérvix hacia la vagina y la vagina conduce al exterior del cuerpo ⁽¹⁰⁾.
- ❖ Produce mucosidad durante la relación sexual, la mucosidad ayuda a los espermatozoides a moverse desde la vagina por el cérvix hacia el interior del útero ⁽¹⁰⁾.
- ❖ 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 ⁽¹⁰⁾.

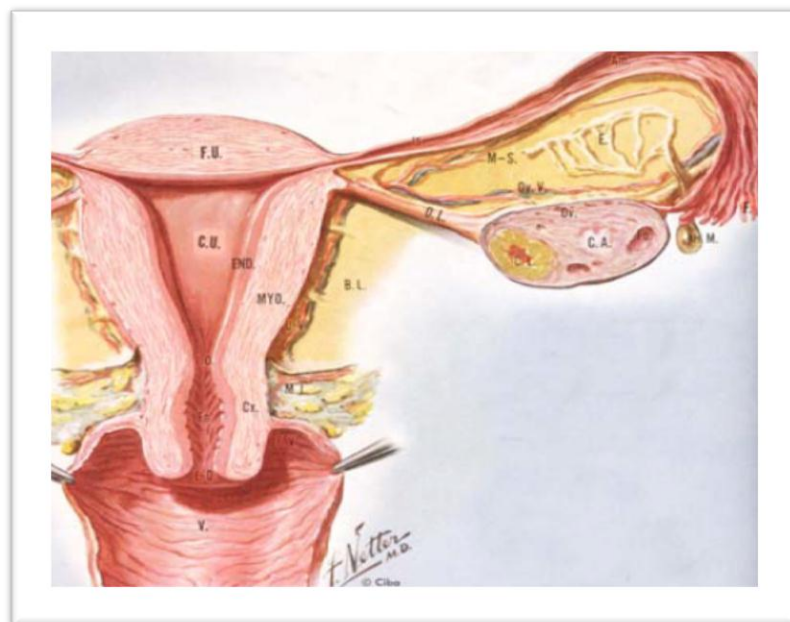


Figura 1: Anatomía cervical ⁽²⁹⁾

En el cérvix se distinguen dos partes: Una interna que se denomina **endocervix** y que constituye un canal que se dispone entre la cavidad uterina y la vagina y otra externa orientada hacia la vagina, que se denomina **exocervix** ^(27, 28, 29). El orificio externo es redondeado y puntiforme en la nulípara; transversal en la primípara y desgarrado en la multípara.

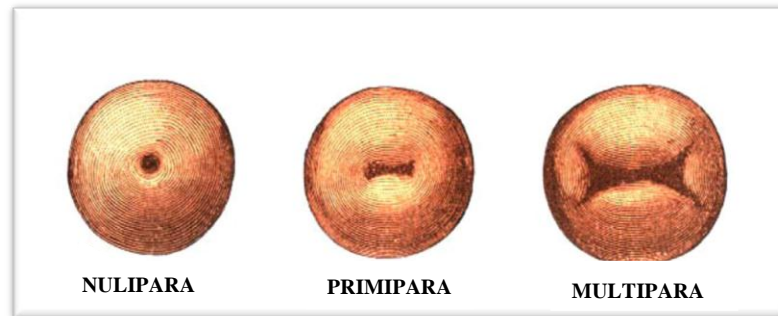


Figura 2: Orificio cervical de diferentes mujeres en función al número de partos. ⁽²⁹⁾

Tanto a nivel del endocervix como del exocervix 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 continúan las fibras musculares del miometrio y muy escasas en la porción más distal. Todo esto le confiere una consistencia firme y elástica ^(27, 28, 29).

Epitelio endocervical.

El epitelio del endocervix está revestido por un epitelio cilíndrico simple, con células epiteliales mucosecretoras y algunas ciliadas interpuestas en la parte superior del cérvix. Este epitelio cubre la superficie de la mucosa y reviste sus pliegues, hendiduras y túbulos. Los núcleos son pequeños y el citoplasma claro contiene abundante moco ^(3, 27, 28, 29).

Epitelio exocervical.

El epitelio del exocervix se encuentra revestido por un epitelio plano estratificado no queratinizado que asienta en una membrana basal. Está en continuidad con el epitelio vaginal y se une con el epitelio columnar en la denominada unión escamocolumnar o escamocilíndrica (zona de transición) ^(27, 28, 29).

El epitelio escamoso estratificado consta de 4 capas:

- a) **Capa basal:** Constituida por una sola capa de células inmaduras con capacidad proliferativa. Son pequeñas y redondas con un núcleo grande y escaso citoplasma, también llamado **estrato germinativo o basal** ^(3, 6).
- b) **Capa parabasal:** Abarca de dos a cuatro filas de células inmaduras, ligeramente más grandes que las células basales, son células con núcleo grande y escaso citoplasma ^(3, 6).
- c) **Capa escamosa:** Abarca de cuatro a seis filas de células de forma poliédrica, son células grandes de núcleo pequeño y abundante citoplasma, **también llamado estrato espinoso** ^(3, 6).
- d) **Capa escamosa madura (superficial):** Abarca de cinco a ocho filas de células aplanadas con núcleos picnóticos y abundante citoplasma, **también llamado estrato corneo o granuloso** ^(3, 6).

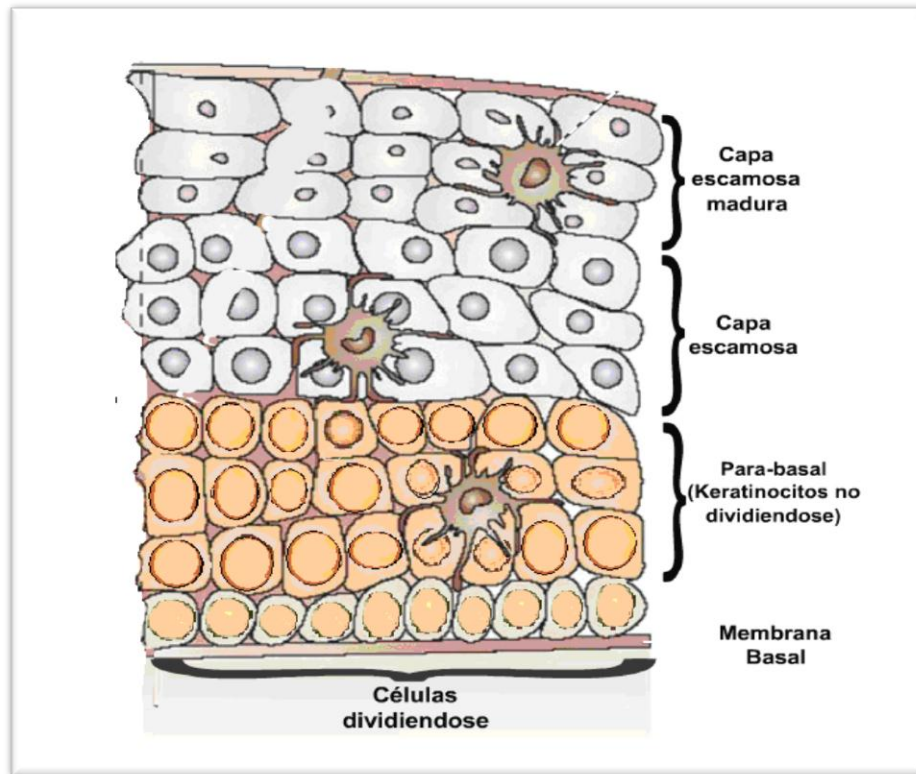


Figura 3: Representación esquemática del epitelio escamoso estratificado.⁽³⁾

Zona de transformación.

En general más del 90% de los casos de cáncer cervical se desarrollan en la zona de transformación, que es el sitio de unión o transición entre el epitelio escamoso plano estratificado que recubre el exocervix y el epitelio cilíndrico simple que recubre el canal endocervical^(3, 6). Probablemente en esta zona de transformación actúan los agentes con potencial carcinogénico dando origen a la metaplasia atípica, a las lesiones intraepiteliales cervicales y a los carcinomas invasores⁽³⁾.

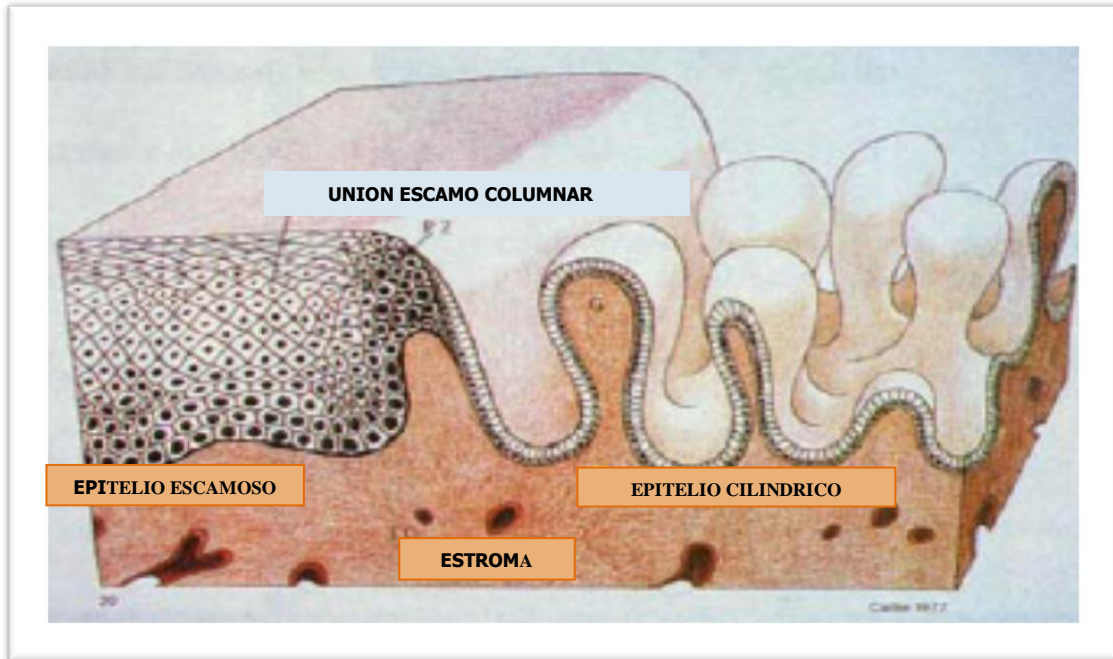


Figura 4: Representación esquemática del epitelio cervical. Epitelio escamoso estratificado, epitelio cilíndrico y zona de unión escamocolumnar o zona de transformación.⁽²⁹⁾

2.3 DESARROLLO DEL PROCESO DE CANCER CERVICAL.

El cáncer cervical empieza en las células de la superficie del cérvix o cuello uterino. Varios estudios indican que la primera etapa de la carcinogénesis corresponde a la **fase de inducción** esta se caracteriza por la iniciación que puede ser debida a diferentes agentes causales como sustancias químicas, virus, etc. que producen alteraciones permanentes y generalmente irreversibles en cierto número de células^(5, 13).

La segunda etapa corresponde a la **fase de promoción**, fenómeno reversible que ocurre consecuentemente a la iniciación del proceso neoplásico, complementado por la exposición crónica a diferentes factores promotores y posiblemente se presenta como consecuencia de la alteración de la expresión genética⁽¹³⁾.

La tercera etapa es la **fase de progresión** de la enfermedad, con crecimiento y multiplicación descontrolada de la masa celular y eventual infiltración de las estructuras donde asienta el tumor y diseminación metastática del mismo⁽¹³⁾.

Estudios realizados han demostrado que la aparición de cáncer de cuello uterino tiene una progresión gradual y viene precedido por lesiones precancerosas o premalignas que son estrictamente intraepiteliales, es decir se encuentran por encima de la membrana basal que separa el epitelio escamoso del estroma, y que pueden mantenerse en fase reversible o “in situ” por varios años en la mayoría de los pacientes, siendo el cáncer cervical 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^(3, 12).

2.5 CLASIFICACION HISTOLOGICA Y CITOLOGICA DE LESIONES PRECANCEROSAS.

Uno de los avances más importantes en el tratamiento del cáncer cervical ha sido la identificación de las lesiones precursoras, las cuales han sido objeto de diferentes clasificaciones⁽³⁾. Las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino han sido ampliamente estudiadas y discutidas desde la década de 1930 a la actualidad. Existen varios sistemas de clasificación de las lesiones de cuello uterino, que surgieron y evolucionaron a medida que se fue conociendo mejor la biología e historia natural de este cáncer.

Inicialmente en 1932 Broders introdujo el término de carcinoma “in situ” (CIS) para definir la lesión maligna que solo afectaba al epitelio del cuello uterino. A finales de los 50 (1949) la palabra displasia (leve, moderada y severa) fue introducida por Papanicolaou para designar la atipia epitelial cervical intermedia entre el epitelio normal y el carcinoma “in situ” (células carcinomatosas en todo el espesor del epitelio sin interrumpir la membrana basal)^(3, 12, 25, 26, 27).

Richart en 1969, insistió aún más en esta observación publicando que el cáncer cervical invasivo de células escamosas es el resultado final de la atipia displásica intraepitelial

progresiva que sucede en el epitelio metaplásico de la zona de transformación cervical. Fue pionero en la investigación de la historia natural de los precursores del cáncer cervical, proponiendo el término de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) para explicar el espectro de daño tisular, estableciendo tres grados de afectación: NIC I equivalente a displasia leve, NIC II a displasia moderada y NIC III a displasia grave y carcinoma in situ (CIS) ^(3, 12, 25, 26, 27). Esta terminología sigue empleándose en la actualidad en el diagnóstico histológico.

En 1989 surgió la necesidad de modificar la terminología usada hasta entonces, sobre todo en el campo de la citología, incluyendo nuevos conceptos sobre infección por VPH, basados en la confirmación de teorías etiológicas que relacionan el cáncer de cérvix y la infección por este virus ^(12, 25, 26). Así es como surgen las sucesivas clasificaciones de Bethesda cuya última edición se revisó y modificó en el 2001 ^(12, 25, 26).

En el sistema Bethesda se sustituye el término “neoplasia” por el de “lesión intraepitelial escamosa” (LIE) clasificada con dos categorías: de bajo grado (LIE-BG) y alto grado (LIE-AG). Esta división en dos grupos evidencia que en LIE-BG se incluyen básicamente a infecciones víricas auto limitadas en general y que solo excepcionalmente progresan a carcinoma y las displasias leves o NIC I, mientras que las LIE-AG corresponden a verdaderos cambios premalignos como las displasias moderadas o NIC II y las displasias graves o NIC III así como el carcinoma in situ (CIS) ^(3,12, 25, 26) (Tabla 1).

NOMENCLATURA EN CITO-HISTOPATOLOGIA CERVICAL			
Papanicolaou (1949)	Richart (1969)	Bethesda (1989) - (2001)	Interpretación
Clase I: Normal	Normal	Negativo para lesión intraepitelial o malignidad. ASC: Células escamosas atípicas: ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado. ASC-H: Células escamosas atípicas no excluyentes para LIE-AG. AGC: Células glandulares atípicas.	No se evidencia alteraciones Células escamosas con anormalidades mayores que puede atribuirse a cambios reactivos, pero que no cumplen los criterios de una lesión epitelial.
Clase II: Displasia leve	NIC I: Neoplasia intraepitelial grado I	LIE-BG: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado	Leves anormalidades celulares: los cambios son casi siempre atribuibles a infección por VPH presencia de coilocitos. Las anormalidades afectan solo el tercio inferior del grosor total del epitelio.
Clase III: Displasia moderada Clase IV: Cáncer <i>In situ</i> .	NIC II: Neoplasia intraepitelial grado II. NIC III: Neoplasia intraepitelial grado III y/o Cáncer <i>In situ</i> .	LIE-AG: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado y/o Cáncer <i>"In situ"</i> .	Anormalidades moderadas o severas de las células escamosas Las anormalidades afectan entre un tercio y dos tercios de todo el espesor del epitelio y pueden extenderse a todo el espesor del epitelio.
Clase V: Carcinoma.	Carcinoma.	Carcinoma invasivo de células escamosas. Carcinoma invasivo de células glandulares.	La posibilidad de cáncer es alta.

Tabla1: Clasificación citológica e histopatológica de lesiones precancerosas (3, 25, 26, 35)

2.5.1 Terminología actual “Nomenclatura Bethesda 2001”

El sistema de Bethesda fue desarrollado por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos en 1988 con el fin de proveer una terminología uniforme y facilitar la comunicación entre el patólogo y el clínico. Este sistema ha sido periódicamente perfeccionado, siendo su última revisión realizada en el verano del 2001. Este taller incluyó a más de 400 participantes de más de 20 países y la contribución de expertos citopatólogos ^(3,12, 27, 29).

F. Terminología para citología negativa.

El término “**negativo para lesión intraepitelial o malignidad**” ha sido sustituido por cualquiera de estas tres categorías:

- a) Dentro de los límites normales.
- b) Cambios celulares benignos.
- c) Cambios reactivos (inflamación, cambios por DIU).

G. Reporte de microorganismos.

El sobre crecimiento de cocobacilos, ahora se escribe como “**cambio en la flora sugestivo o indicativo de vaginosis bacteriana**”.

H. Células escamosas anormales.

El término “Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS)”, ha sido modificado. El nuevo término general es “**células escamosas atípicas (ASC)**” y fue subdividido en:

- **ASC-US:** Corresponde a cambios citológicos que son sugestivos de una lesión intraepitelial pero que carecen de criterio para una interpretación definitiva. Esta

categoría excluye los casos sugestivos de LIE-AG. Esta categoría ASC-US puede equivaler a un 90% de los ASC.

- **ASC-H:** Cambios citológicos que son sugestivos para LIE-AG, pero que carecen de criterio para una interpretación definitiva. Para la correlación entre citología e histopatología en esta categoría se hace recomendable y necesaria la evaluación de colposcopia y biopsia.

I. LIE-BG y LIE-AG.

La terminología LIE-BG y LIE-AG, para lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado, no tuvo ninguna modificación.

J. Células glandulares anormales.

El término “Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS), ha sido reemplazado por lo “**células glandulares**”:

- Células endocervicales atípicas.
- Células endometriales atípicas.
- Células glandulares atípicas.
- Adenocarcinoma in situ (AIS).
- Adenocarcinoma.

2.5 EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER CERVICOUTERINO.

El cáncer de cuello uterino representa uno de los principales problemas de salud pública que afecta a mujeres de todo el mundo, produciendo miles de muertes por año especialmente en países en vías de desarrollo ^(3, 5, 6, 7, 8, 53, 54, 59).

El cáncer cervical se mantiene en todo el mundo como el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres después del cáncer de seno ^(26, 5, 49); representa el 15% de todos los tumores malignos del género femenino. En países en vías de desarrollo es el primer cáncer más común entre las mujeres; constituye 20 a 30% de los cánceres femeninos, mientras que en los países desarrollados solo representa el 4 al 6%. Esta diferencia refleja sobre todo el impacto de la detección masiva con métodos citológicos cervicales ^(26, 5, 42, 71).

El CaCu es el primero reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que es relacionado a una infección viral. Las tasas más altas de incidencia de cáncer cervical se presentan en África, Asia, Centro y Sud América ^(3, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 20, 21, 71). Más del 80% del total de casos se producen en países en vías de desarrollo. quedando de esta manera como el tumor más común en el conjunto de países subdesarrollados ^(6, 7, 8, 11, 12, 14, 17, 18, 20, 21, 59).

Cuando se considera a la población en su conjunto y el impacto del cáncer, el CaCu ocupa el sexto lugar precedido por el cáncer de mama, pulmón, estomago, colorectal y próstata ⁽⁷⁾. Estudios realizados indican que cada año se diagnostican en el mundo alrededor de 500.000 nuevos casos de cáncer cervicouterino provocando la muerte de aproximadamente 250.000 mujeres anualmente, es decir casi el 50% de estos casos terminan en decesos ^(3, 6, 7, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 59, 71).

En los países en desarrollo los índices de mortalidad reportados es de aproximadamente 11,2 por cada 100.000 mujeres, cerca de tres veces más del nivel de los países desarrollados. Casi el 40% de las muertes por este cáncer tienen lugar en los países en desarrollo de Asia Meridional Central, una zona altamente poblada que abarca la India, Pakistán y Bangladesh ⁽⁹⁾. América Latina, Centro América y el Caribe tienen las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino más altas del mundo, que solo son comparables con las de África Oriental y algunos países de Asia ^(10, 17, 18, 21, 59) (tabla 2).

Región	Tasa de Incidencia	Tasa de Mortalidad
África Oriental	44,32	24,24
Melanesia	43,81	23,78
Centro América	40,28	17,03
Caribe	35,78	16,84
América del Sur	30,92	11,97
América del Norte	7,88	3,23

Tabla2: Tasa de incidencia y mortalidad por cada 100.000. Globocan 2000, IARC⁽¹⁰⁾

Aunque en los últimos 40 años, se ha evidenciado una disminución considerable en la incidencia de CaCu en Canadá, Estados Unidos, España y en otras economías de mercado consolidado donde los programas de tamizaje en mujeres asintomáticas junto con un diagnóstico, tratamiento y seguimiento se encuentran bien establecidos ^(10, 59). Estos son programas nacionales de pesquisa y control del cáncer cervicouterino, basados en las recomendaciones de la OPS/OMS y en criterios de eficiencia y costo efectividad que tienen como objetivo “disminuir la tasa de mortalidad e incidencia por cáncer invasor a través de la detección de etapas preinvasoras y tratamientos adecuados y oportunos”.

Las tasas de incidencia de esta patología son variables. Se describen desde cifras inferiores a 10 casos por cada 100,000 mujeres por año en Canadá, Estados Unidos y países Europeos, hasta más de 40 por cada 100.000 mujeres en países en vías de desarrollo del África, el Caribe, Centro América, Sur América y algunos países de Asia ^(3, 7, 9, 10, 17, 49). Esta mayor incidencia podría deberse a que los programas de detección temprana de CaCu no están bien establecidos o no son efectivos, la falta de programas efectivos para detectar los estados precancerosos y tratarlos en la mayoría de estos países, promueve al CaCu como la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres ^(3, 7, 9, 10).

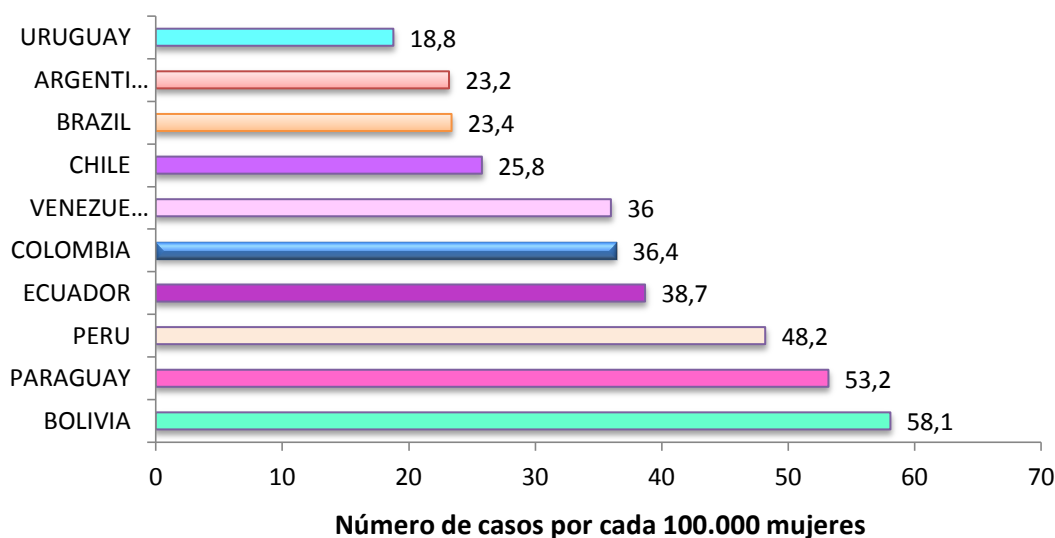


Figura 5: Tasa de incidencia de cáncer cervical por cada 100.000 mujeres en países de Sud América. Ferlay et al: Globocan 2000, IARC ^(10,88)

En América latina se registran anualmente más de 85.000 nuevos casos de cáncer cervical ⁽²²⁾. En los países latinoamericanos más de 33.000 mujeres mueren por cáncer de cérvix por año. Registros de cáncer obtenidos por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), muestran que hay incidencias moderadas alrededor de 40 casos por cada 100.000 mujeres en Brasil, Venezuela, Colombia y Perú; incidencias excesivamente elevadas entre 50 a 60 casos por cada 100.000 mujeres en Paraguay y Bolivia ⁽⁹⁾. Por otro lado, los países que presentan las tasas de mortalidad más bajas son Puerto Rico, Uruguay, Argentina y Chile con tasas alrededor de 20 por cada 100.000 mujeres ^(10, 13, 17, 20, 53). (Figura 5)

Las muertes por cáncer cervical son el indicador más revelador del impacto de la enfermedad sobre las mujeres, sus familias y comunidades. Los cálculos actuales sobre la incidencia del cáncer cervical y las tasas de mortalidad probablemente están por debajo de la situación real, porque muchas mujeres con la enfermedad no reciben atención médica y no quedan reflejadas en los registros de cáncer ⁽⁹⁾.

2.6 CANCER CERVICOUTERINO EN BOLIVIA.

En Bolivia el cáncer de cuello uterino representa un grave problema de salud pública, tiene una de las tasas más altas de incidencia de 58.1 de nuevos casos por cada 100,000 mujeres al año^(9, 10, 21, 24).

Las estimaciones de mortalidad obtenidas a través de la IARC 2002 (Asociación Internacional de Registros de Cáncer & IARC2002) para la región de América Latina y el Caribe, muestran que las tasas de mortalidad más altas se presentan en Haití, seguido de Nicaragua y **Bolivia con más de 26 por 100.000** mujeres. En total, en estos tres países se estima que se presentan cada año más de 5.000 nuevos casos de cáncer cervicouterino y se producen aproximadamente 2.300 muertes por este cáncer⁽²⁰⁾, lo que significa aproximadamente un total de 660 muertes en Bolivia por año atribuidas al cáncer de cuello uterino^(9, 10, 20, 21).

El cáncer cervical es una de las primeras causas de muerte en mujeres de 35 a 59 años de edad en Bolivia. Datos a partir de estudios internacionales indican que el año 2002 murieron más de dos mujeres al día por CaCu; y que la mortalidad ha aumentado en seis años a más de cuatro mujeres, es decir que del 2002 al 2008, la cifra de decesos subió de dos a cuatro mujeres por día⁽²³⁾.

Según las estadísticas, la incidencia de cáncer cervical más alta es reportada en la ciudad de La Paz con 53,1/100,000 mujeres, Oruro con 60,9 /100,000 y Potosí con 93.5/100,000. A su vez Oruro, Potosí y la ciudad de La Paz son las regiones con mayores índices de mortalidad a causa de esta enfermedad, esto se atribuye a que se trata de lugares donde prevalece la pobreza y por tanto falta el acceso a los sistemas de salud^(23, 74).

2.7 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICAL.

Estudios epidemiológicos han identificado una serie de factores llamados “**de riesgo**”, presentes con mayor prevalencia en casos diagnosticados de cáncer cervical que en grupos sanos en comparación ^(7, 59).

Entre estos factores se encuentran diferencias en el comportamiento sexual y de reproducción, el uso de anticonceptivos orales, el hábito de fumar, la historia de infecciones de transmisión sexual ^(7, 59). Sin embargo, los parámetros que miden la conducta sexual asociados al cáncer cervical como el resto de los llamados factores de riesgo han sido reevaluados y divididos en diferentes categorías:

- ❖ **Factores ambientales**, tales como factores hormonales por el uso prolongado de anticonceptivos orales, la multiparidad, las infecciones de transmisión sexual diferentes a VPH, el tabaquismo, factores nutricionales, factores relacionados con la conducta sexual y otros socioeconómicos ^(3, 6, 7, 16, 30).
- ❖ **Factores asociados al hospedero**, tales como variaciones en la producción hormonal y factores genéticos relacionados con la variabilidad en la respuesta inmunológica ^(3, 6, 7, 16, 30).
- ❖ **Factores virales**, como la infección con ciertos genotipos específicos del Virus del Papiloma Humano, la coinfección con más de una variante, la carga y la integración viral ^(3, 6, 7, 16, 30, 59).

Se afirma que factores como el número de parejas sexuales o edad de inicio de vida sexual solo reflejan la probabilidad de exposición al VPH o la edad de la primera exposición al virus. Sin embargo estos hechos son el factor etiológico central del cáncer cervical debido a que favorecen la infección por este agente viral ⁽⁷⁾.

Así mismo se considera que para estimular la progresión de lesiones infecciosas a lesiones preneoplásicas probablemente son importantes los siguientes factores ⁽⁷⁾.

I. Uso prolongado de anticonceptivos orales.

En base a algunos estudios realizados, se determinó, que el uso prolongado de anticonceptivos orales, podría incrementar el riesgo del desarrollo de cáncer cervicouterino, debido a que probablemente sus metabolitos serian factores determinantes en la progresión de lesiones premalignas a malignas ^(3, 6, 7, 13). Al parecer promoviendo la integración del genoma del VPH al genoma celular lo que induce la expresión de los genes virales E6 y E7 que están relacionados con la modulación de la división celular y apoptosis ^(3, 6, 7).

Aunque el cáncer de cérvix no se considera un tumor hormono-dependiente, se ha demostrado la presencia de altos niveles de receptores hormonales para estrógenos y progesterona, en los núcleos de fibroblastos del estroma subyacente al epitelio displásico, lo que sugiere que estas hormonas podrían actuar indirectamente en células epiteliales infectadas por VPH ⁽⁷⁾.

Por otro lado también se demostró que los anticonceptivos orales pueden aumentar la inmunidad local en adolescentes, quienes suelen presentar niveles inferiores de estrógenos, progesterona y frecuente disfunción menstrual, en estos casos el tratamiento con anticonceptivos orales incrementa los niveles de IgA permitiendo esto una mejor respuesta contra el VPH y por consiguiente la disminución del riesgo de cáncer cervical ⁽⁷⁾.

Sin embargo la evidencia más fuerte de la participación de los anticonceptivos orales deriva de un estudio realizado por la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC). Este estudio demuestra que el riesgo aumenta con los años de uso de los anticonceptivos, no se encontró un incremento significativo de riesgo por debajo de 4 años de uso, sin embargo, el uso de anticonceptivos orales por más de 5 años se asocia

significativamente con el desarrollo de neoplasia cervical invasiva y con carcinoma “*in situ*”^(3, 7).

J. Multiparidad.

Durante las últimas décadas la multiparidad ha sido asociada al cáncer cervical, debido a que una variedad importante de factores tanto nutricionales, hormonales, traumáticos e inmunológicos han sido propuestos como coadyuvantes biológicos asociados a la multiparidad en relación al desarrollo de cáncer^(3, 7, 13).

Las hipótesis a través de las cuales se ha tratado de explicar la relación entre multiparidad y cáncer cervical están relacionadas principalmente con traumas obstétricos repetidos, cambios hormonales e inmunosupresión durante el embarazo. En modelos animales se ha podido evidenciar 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. Los cambios hormonales que se dan durante el embarazo (incremento progresivo en las concentraciones sanguíneas de estrógenos y progesterona) pudieran ser responsables de alteraciones en la unión escamocolumnar (zona de transformación) produciendo ectopia cervical y manteniendo la zona de transformación sobre el exocervix por muchos años en las mujeres con gran número de embarazos, facilitando con esto la directa exposición al VPH. Así mismo el embarazo provoca un estado de inmunosupresión que podría aumentar la susceptibilidad del organismo a los agentes infecciosos^(3, 7, 13).

K. Infecciones de transmisión sexual.

Se ha podido evidenciar como factores de riesgo importante para el desarrollo de cáncer cervical a varias infecciones de transmisión sexual (ITS) juntamente a la presencia de infección por el Virus del Papiloma Humano. Varios estudios han evaluado la asociación entre otras enfermedades infecciosas y el proceso de carcinogénesis generado por VPH^{(3,}

⁷⁾. La coexistencia de otras infecciones de transmisión sexual puede ser facilitada por el desgaste epitelial causado por la infección del VPH ⁽⁷⁾.

Entre las ITS, la infección por *Chlamydia trachomatis* ha sido postulada como posible factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical. Esta infección es la más común de las infecciones de transmisión sexual de origen bacteriano. Aunque la mayoría de estas infecciones cursan asintomáticas pueden ser causa de enfermedad inflamatoria pélvica, de uretritis o cervicitis, que dan lugar a un proceso inflamatorio asociado con atipia metaplásica de la zona de transformación del cérvix ^(3, 7). Los mecanismos propuestos para explicar su implicación en el desarrollo del cáncer cervical se relacionan con el hecho de que la infección por *Chlamydia* durante la respuesta inflamatoria produce óxido nítrico en altas concentraciones por periodos prolongados, promoviendo la oxidación celular y como consecuencia daño a nivel del ADN. Esto permite concluir que la infección por *Chlamydia trachomatis* puede actuar como cofactor del VPH en el proceso carcinogénico a través del proceso inflamatorio o modulando la respuesta inmune del huésped ^(3, 7).

También se encontró una interacción significativa entre el VPH y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Las mujeres que han estado expuestas al virus tienen mayor probabilidad de ser VPH positivas y desarrollar neoplasias en las que este virus tiene un papel etiológico importante, además de presentar una más rápida y agresiva evolución de la enfermedad y un alto número de carcinomas invasores ^(7, 31).

Así mismo la infección por Herpes simplex tipo 2 (HSV-2), podría actuar de manera sinérgica con el VPH en el proceso carcinogénico. La infección a nivel genital por Citomegalovirus Humano (CMV), si es concurrente con VPH puede incrementar el riesgo de cáncer, sin embargo infecciones solas por HSV-2 o CMV no muestran estar asociadas con procesos malignos, es así que se considerarían más como cofactores del VPH en la etiología del cáncer cervical ^(3, 7).

L. Tabaquismo.

La evidencia de que fumar incrementa el riesgo de desarrollar cáncer cervical se ha incrementado a lo largo de los últimos 25 años, no está claro el papel que puede jugar el tabaco en la etiología, sin embargo, el fumar cigarrillos podría estar asociado al riesgo de contraer infección por el VPH como consecuencia de la correlación existente entre fumar y ciertos comportamientos de conducta sexual ^(3, 7).

Por otro lado, está demostrado que los cigarrillos contienen cancerígenos órgano-dependientes y sus metabolitos han sido detectados en la mucosa cervical. De esta manera algunos autores han sugerido que la exposición al tabaco podría afectar la capacidad del hospedero para montar una respuesta inmune a nivel de la mucosa cervical contra la infección viral, debido a que se demostró que algunos compuestos del tabaco podrían reducir el número de células de Langerhans y otras moléculas involucradas en la función inmunológica ^(3, 7). Es por esto que la hipótesis del efecto cancerígeno del tabaco sobre el cuello uterino no puede ser excluida sobre todo tomando en cuenta que en la actualidad, se incrementa más el número de mujeres jóvenes que fuman de manera habitual ⁽⁷⁾.

M. Factores nutricionales.

Varios factores nutricionales relacionados con la dieta y el estado nutricional de los individuos se han tratado de asociar como cofactores del VPH en la progresión maligna a cáncer cervical ⁽³⁾. Aunque no se tienen datos concluyentes, algunos estudios han evaluado que la deficiencia nutricional específicamente de algunos alimentos y nutrientes se relaciona como posibles cofactores en el desarrollo de cáncer cervical ^(3, 7). También se exploró la asociación entre concentraciones circulantes de antioxidantes y persistencia de infección por VPH, encontrando que dichas sustancias tienen un efecto protector en relación con la severidad de las lesiones precancerosas, es decir que mientras más bajas sean las concentraciones de antioxidantes más grave es la lesión. Así mismo se plantea que la carencia de ácido fólico puede estar asociada a cáncer cervical ^(3, 7).

N. Conducta sexual.

Diversos estudios epidemiológicos concuerdan con el hecho de que el riesgo de cáncer cervical está fuertemente influenciado por factores relacionados con ciertas conductas sexuales como el número de parejas sexuales, edad de inicio de vida sexual activa y la conducta sexual de la pareja. Sin embargo una vez establecida la relación que existe entre infección por VPH y cáncer cervical, dichos factores en general se convierten más específicamente en parámetros para medir el riesgo de exposición al virus ^(6, 7, 13).

O. Factor socioeconómico.

La relación entre el nivel socioeconómico y cáncer cervical evidencia un consistente incremento de la incidencia de dicha patología conforme decrece el nivel socioeconómico, medido a través de indicadores como el nivel de educación y ocupación ^(6, 7). Esto probablemente refleje la relación existente entre estilo de vida y los factores relacionados con la exposición al VPH o la posibilidad o no de acceso a programas adecuados de detección oportuna de cáncer cervical ^(6, 7).

P. Inmunosupresión

La inmunosupresión, ya sea primaria o inducida por tratamientos médicos por otras enfermedades, implica un elevado riesgo de infecciones virales que incluyen al VPH, sus recurrencias y su persistencia hasta el desarrollo de cáncer cervical ^(7, 13).

Las mujeres con patologías como Hodgkins, leucemias u otro tipo de cáncer pueden tener mayor riesgo a desarrollar cáncer cervical debido a la inmunosupresión inducida, al igual que el caso de mujeres con trasplantes que también son expuestas a una inmunosupresión médica ^(7, 13).

El embarazo también es considerado como un periodo transitorio de inmunosupresión, en este aspecto los principales mecanismos por los que se considera que las mujeres

embarazadas son más vulnerables a la infección del VPH están relacionados con ciertas características del epitelio y del sistema inmune que cambian durante el estado de gravidez, como ser: disminución en la actividad de linfocitos T, el efecto de hormonas esteroides durante el embarazo y estimulación de la transcripción y proliferación del VPH por la presencia del 17beta-estradiol⁽⁷⁾.

2.8 EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y SU RELACION CON CANCER DE CUELLO UTERINO.

Hace más de cien años ya se establecieron relaciones epidemiológicas entre el cáncer de cérvix y conductas sexuales de riesgo. Durante varias décadas se intentó relacionar sin éxito a la mayoría de los agentes responsables de las enfermedades de transmisión sexual con dicha neoplasia⁽³³⁾. Sin embargo la etiopatogenia del cáncer cervical ha podido ser investigada en forma detallada gracias a adelantos científicos en virología, epidemiología, inmunología, biología celular y molecular^(3, 10, 14, 15, 33, 34). Estos avances han permitido describir el rol etiológico de la infección persistente por ciertos genotipos de VPH con el desarrollo de lesiones premalignas y malignas de cáncer de cuello uterino; teniendo a su vez importantes implicaciones en la metodología de screening, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad^(3, 10, 14, 15, 33, 34, 44, 49, 56, 57, 58, 59).

Precisamente debido al conocimiento de su potencial oncogénico y asociación con tumores, en especial con el cáncer de cuello uterino, VPH reviste gran interés en la vigilancia epidemiológica, considerando a su vez el incremento de su frecuencia en la población sexualmente activa, por ser un agente primordialmente de transmisión sexual y representar a su vez una de las infecciones de transmisión sexual más común a nivel mundial^(9, 32, 33, 59).

La asociación entre cáncer cervical y VPH fue demostrado a principios de los años 80 por el doctor Harald Zur Hausen de tal manera que la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad, pero no suficiente ya que existen a su vez otros factores

involucrados en la progresión de la patología. La infección por VPH puede ser causa de otros carcinomas ano genitales incluyendo de pene, vagina, vulva y ano ^(3, 6, 15, 33, 35).

La naturaleza causal de la asociación entre VPH y cáncer de cérvix se basa en lo siguiente:

- ❖ Existencia de múltiples resultados sobre estudios epidemiológicos realizados en distintas poblaciones y con diferentes diseños los cuales demuestran de forma coherente que las infecciones por ciertos tipos virales son el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical ⁽³³⁾.
- ❖ La detección regular de ADN de VPH de alto riesgo oncogénico en células cancerosas (en un 99,7% en una serie internacional de cánceres de cuello uterino con una PCR de alta sensibilidad, en el 100% de los casos confirmados por una revisión histológica experta y en más del 90% en lesiones precursoras) ^(6, 7, 10, 14, 33, 35).
- ❖ La demostración de la expresión de las proteínas oncogénicas virales de los tipos de alto riesgo oncogénico producidas por los genes E6 y E7 de VPH en el tejido neoplásico pero no en tejido sano ^(14, 33).
- ❖ La capacidad transformadora de estos oncogenes por bloqueo efectivo de las proteínas reguladoras del ciclo celular (p53, pRb) ^(14, 33).
- ❖ El mantenimiento de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH de alto riesgo como requisito indispensable para mantener el fenotipo maligno de las células cancerosas ^(14, 33).

La evidencia epidemiológica que relaciona a VPH con el cáncer se encuentra sustentada en dos estudios principales:

1. 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, la prevaecía de los genotipos virales fue: VPH 16 (53%), VPH 18 (15%), VPH 45 (9%), VPH 31 (6%) y VPH 33 (3%). 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 ^(3, 7).

2. En el segundo estudio, donde participaron 13 países y se incluyeron 2000 casos y 2000 controles, se encontró una fuerte relación entre los genotipos VPH 16 y VPH 18 con cáncer cévico – 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 ^(3, 7).

2.9 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH).

Los Virus del Papiloma Humano (VPH) infectan epitelios planos estratificados queratinizados, son específicos de especie y están asociados con la aparición y persistencia de neoplasias benignas y malignas de piel y mucosas, produciendo la transformación e inmortalización de sus células blanco ^(7, 32, 38).

2.9.2 Estructura.

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es de tamaño pequeño, mide entre 52 a 55 nm de diámetro. Los viriones no poseen envoltura, están compuestos por una cápside proteica de simetría icosaédrica de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), conformada por proteínas estructurales: en un 95% por la proteína L1 y en un 5% por la proteína L2. El interior de la cápside proteica contiene un genoma de ADN de doble cadena y circular compuesto de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) constituido por ocho genes y una región regulatoria no codificante ^(6, 7, 13, 32, 35, 36, 38, 60).

El VPH es relativamente estable y aunque carece de envoltura, puede permanecer infeccioso en ambientes húmedos durante meses ⁽⁶⁾.

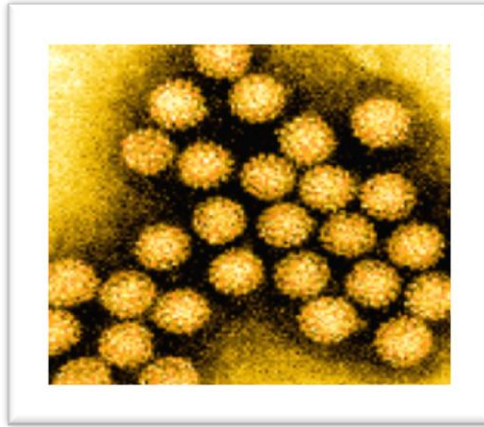


Figura 6: Representación gráfica de la estructura de VPH ⁽⁸⁹⁾

2.9.2 Genoma.

El genoma del VPH se compone de una molécula de ADN circular de doble cadena, constituida aproximadamente de 8000 pb y una masa molecular de $5,2 \times 10^6$ Da asociado a proteínas tipo histona, aunque se trata de un ADN de doble cadena solo una es codificante (3, 6, 7, 13, 32, 34, 35, 36, 38, 60).

Se divide en tres regiones: la región larga de control (RLC) que no contiene ningún marco de lectura; la región de genes codificados en etapas tempranas de la infección conocidos como genes E (del inglés Early=temprano) y aquellos que son codificados durante las etapas tardías del ciclo replicativo conocidos como L (del inglés Late=tardío)^(3, 6, 7, 13, 32).

La región larga de control (RLC) compuesta por 800 a 1000 pb no codificadora, contribuye al control de la regulación genética de VPH, dentro de esta región se encuentra el núcleo del promotor p97 que regula la transcripción de los marcos de lectura abiertos y es la región de mayor variabilidad del genoma de VPH^(3, 32).

La región L (casi 40% del genoma) contiene dos marcos de lectura que codifican dos proteínas estructurales L1 mayor y L2 menor relacionadas con el ensamblaje de las partículas virales (proteínas de la cápside). Estos genes se expresan en fases finales de la infección y su transcripción esta mediada por reguladores celulares de la transcripción, producidos solo cuando la célula escamosa se diferencia^(6, 7, 32, 34, 35, 36).

La región E (45% del genoma) codifica hasta 7 proteínas, con marcos de lectura que se superponen, son genes regulatorios no estructurales y están relacionados con el control de la replicación del ADN viral y la oncogénesis del virus^(3, 6, 32, 34, 35, 36). Se conocen seis genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6, E7 que se encuentran en todos los VPH estudiados a la fecha^(3, 32, 35, 36).

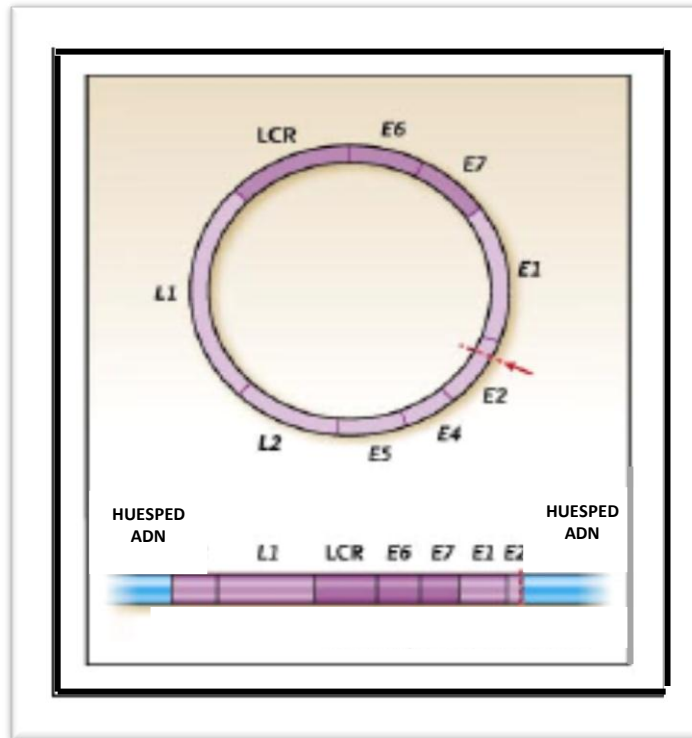


Figura 7: Representación gráfica del genoma de VPH⁽⁶⁾

2.9.5 Proteínas virales.

K. Proteína E1.

El gen E1 es el más grande y conservado del VPH encargado de codificar la proteína E1, una helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral. Estas funciones de ATPasa y de helicasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática. La interacción física de E2 y E1 favorece al reclutamiento de E1 al sitio de origen de replicación, E1 interactúa con subunidades de la ADN polimerasa alfa para activar la replicación del ADN viral^(3, 6, 7, 32, 35).

L. Proteína E2.

El producto de la expresión del gen E2, es una proteína nuclear de 45 kDa denominada E2, responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. La capacidad oncogénica de VPH reside en las proteínas E6 y E7 cuya expresión depende de un gran número de factores celulares y la presencia de la proteína viral reguladora E2^(3, 6, 7, 32).

M. Proteína E4.

El gen E4, aproximadamente 260 pb, está contenido dentro del marco de lectura de E2 y codifica a la proteína E4, de 10 a 44 kDa, esta se expresa a partir de un ARNm procesado de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación del ADN. La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma y también se halla de manera difusa en regiones perinuclares y citoplasmáticas de la célula huésped. E4 causa el colapso de dichas queratinas lo que permite la liberación de los viriones^(3, 6, 7).

N. Proteína E5.

El gen E5, de aproximadamente 230 a 250 pb, codifica la proteína E5 de 90 aminoácidos. Esta proteína hidrofóbica de asociación a membranas intracelulares, tiene como función principal incrementar la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como es el caso del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) al unirse a una subunidad formadora de poros de la ATPasa vacuolar, cuya subunidad de 16 kDa forma el poro por lo que pasan los iones H⁺ que acidifican el contenido de los endosomas. De esta manera E5 inhibe la acidificación de los endosomas en los queratinocitos humanos^(3, 6, 7, 35).

La vacuola eucariótica es un organelo central que interviene en numerosos procesos celulares esenciales, como la internalización ligando-receptor, así como el reciclamiento

del mismo, el transporte de proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico y en la homeostasis de iones. La actividad de la ATPasa es acidificar el lumen vacuolar necesario para que se lleve a cabo en forma adecuada los procesos que tienen lugar en este organelo celular. Por tanto E5 inhibe el procesamiento de péptidos antigénicos dependiente de pH, altera la presentación de antígenos a las células del sistema inmune, altera la producción y el procesamiento de proteínas recién sintetizadas^(3, 6, 7).

O. Proteína oncogénica E6.

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica la proteína E6 de casi 150 aminoácidos, esta coopera con la proteína E7 en la inmortalización y transformación de la célula huésped. Durante la infección por VPH la proteína E6 juega múltiples papeles, se expresa tempranamente durante la infección lo cual le confiere varias funciones que neutralizan los sistemas de control del ciclo celular. E6 bloquea la apoptosis dependiente de p53 promoviendo su degradación por la vía de ubiquitina, también origina la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300 y CBP e incrementa la vida celular mediante la sobre activación de la telomerasa^(3, 6, 7, 35).

La proteína p53 tiene por función controlar la progresión del ciclo celular monitoreando la integridad del ADN, normalmente su concentración en la célula es baja, pero cuando se detecta daño en el ADN, p53 aumenta su concentración 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 p21 y p27 que son proteínas encargadas de regular negativamente el ciclo celular al bloquear complejos ciclina/cdk; el paro del ciclo celular en G1 tiene como finalidad dar tiempo a la célula para que subsane su daño, pero si no es reparable, p53 induce la apoptosis de la célula para evitar que el daño pase a la descendencia y se acumulen mutaciones que podrían llevar a la transformación celular⁽⁶⁾.

La degradación de P53 por E6, es un proceso mediado por la proteína ligasa de ubiquitina, para ello E6 requiere asociarse a esta proteína celular (E6-AP), reemplazando a Mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a P53. Este cambio reduce dramáticamente la vida media de P53 desde 3 horas hasta 20 minutos. De tal manera que la célula no detiene su ciclo ante cualquier daño del ADN y tampoco se induce la apoptosis para eliminar a las células alteradas, lo que genera inestabilidad genética y permite acumular mutaciones en diversos genes^(3, 6, 7).

P. Proteína oncogénica E7.

El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica la proteína E7 de aproximadamente 100 aminoácidos. E7 tiene la mayor capacidad transformante y contribuye de gran manera a la progresión carcinogénica, actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB (proteínas supresoras del retinoblastoma) involucradas en el control de la replicación celular^(3, 6, 7, 35, 60).

La unión de E7 a la forma activa de pRB induce la liberación del factor de transcripción E2F-1, del complejo formado (pRB/E2F-1), E2F1-libre activa la expresión de ciertos genes necesarios para la progresión del ciclo celular independiente a la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso del ciclo celular hacia la fase S y por tanto la replicación celular.

De esta manera se anula el mecanismo de freno, que asociado a la activación de los complejos quinasas dependientes de ciclinas (cdk/ciclinas), llevan a la desregulación del ciclo. E7 también se asocia con otras proteínas supresoras de tumores como p107 y p130, puede unirse a desacetilasas de histonas (HDAC), a factores de transcripción como AP-1, a la proteína TBP, a ciclinas, a cdks y con inhibidores de cdk. Estas interacciones son las que desregulan el ciclo celular, potencializan la proliferación y la immortalización y finalmente provocan la transformación de la célula^(3, 6, 7, 35, 60).

Q. Proteína E2/E8.

Recientemente se ha descrito una nueva proteína, resultado de una fusión del producto del pequeño marco de lectura E8 con parte de la proteína E2. Esta proteína de 20 kDa reprime la replicación viral, así como la transcripción y por tanto se creó que es importante para el mantenimiento del estado latente observado en las células basales del epitelio infectado ^(6, 7).

R. Proteínas L1 Y L2.

La proteína L2 de 78 kDa, es la minoritaria de la cápside viral, la proteína mayoritaria L1, de 57 kDa conforma la mayor parte de la cápside, se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaédrica. Estas dos proteínas solo se producen en queratinocitos diferenciados de la capa superficial del epitelio, donde se producen particular virales maduras ^(3, 6, 7, 60).

2.9.6 Clasificación.

El Virus del Papiloma Humano (VPH), pertenece a la familia *Papillomaviridae*, un grupo extenso de virus causante de varias enfermedades proliferativas; que recientemente fue reconocido por el Consejo Internacional de Taxonomía Vírica (ICTV) como una familia distinta a la *Polyomaviridae* ^(3, 6).

Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza, tienen tropismo por epitelios en determinados sitios anatómicos, siendo comunes las infecciones de piel y de mucosas del tracto oral, respiratorio y anogenital sitio donde se ha encontrado una fuerte asociación entre infección por VPH y desarrollo con diferentes lesiones neoplásicas y cáncer cervical invasor ^(6, 34). Los VPH han sido clasificados en base a su tropismo celular en cutáneos y mucosos, en base a la homología de su genoma y por su potencial oncogénico que llega a ser la clasificación más importante desde el punto de vista clínico ⁽³⁾.

A diferencia de lo que ocurre en otras familias virales, las proteínas de la cápside de los diversos tipos de VPH son antigénicamente similares, por lo tanto los VPH no pueden ser clasificados en serotipos; de tal forma, que su clasificación en genotipos y subtipos se basa en el porcentaje de homología de su secuencia de ADN ^(7, 36, 38). El gen L1 es el más conservado del genoma viral y por tanto ha sido usado para identificar nuevos tipos virales. Un nuevo tipo viral es reconocido como tal solo si la secuencia del gen L1 difiere por poco más del 10% de aquella del tipo viral conocido más cercano, diferencias de 2 a 10% definen a un subtipo viral, mientras que la diferencia menor a 2% define solo a una variante viral ^(6, 7, 35).

2.9.5 Clasificación del VPH según riesgo oncogénico.

Además de los factores de riesgo ya mencionados para la progresión del cáncer de cuello uterino, el genotipo específico viral, es otro factor de riesgo importante, pues diversos estudios sugieren que estos difieren biológicamente en su potencial oncogénico ⁽⁶⁾. Es así que la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) clasifican al VPH según el riesgo de carcinogenicidad en genotipos de alto y bajo riesgo ^(15, 34, 35).

La clasificación de los Papilomavirus Humanos en virus de alto y bajo riesgo oncogénico se basó originalmente, en que los primeros se detectaron mayormente en muestras de tejido canceroso de cuello uterino y ano a diferencia de los de bajo riesgo. Se observó que los de alto riesgo podían transformar queratinocitos humanos, inducir aberraciones cromosómicas, como consecuencia del efecto de las oncoproteínas virales en el descontrol celular. Se ha visto que los tipos virales cuyas proteínas E6 y E7 tienen baja afinidad por sus blancos celulares son de bajo riesgo oncogénico y los genotipos virales cuyas oncoproteínas tienen gran afinidad por sus blancos son potencialmente de alto riesgo oncogénico ^(3, 32, 35).

Los genotipos de alto riesgo oncogénico son detectados en más del 95% de los casos de carcinoma cervical. Por tanto, una identificación del tipo viral podría ser relevante en el manejo clínico de lesiones cervicales y cáncer ⁽⁵⁶⁾.

Hasta la fecha han sido caracterizados más de 100 genotipos virales diferentes, de los cuales aproximadamente 40 tipos pueden infectar el tracto anogenital y otras áreas mucosas del cuerpo ^(3, 6, 7, 13, 14, 15, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 54, 56, 57, 59).

Datos procedentes de estudios de casos y controles que exploraron la asociación entre infección por VPH y cáncer de cérvix realizados en diferentes países han identificado más de 15 tipos virales como de alto riesgo oncogénico (**VPH-AR**) y más de 12 tipos se han catalogado como tipos de bajo riesgo oncogénico (**VPH-BR**) ^(14, 32, 33, 35, 57, 59) (Tabla 3).

VPH	GENOTIPO	LESION ASOCIADA
VPH DE ALTO RIESGO ONCOGENICO	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 73, 82.	Asociados con cánceres invasivos de cuello uterino, vulva, pene o ano. VPH-16: asociado a 50% todos los cánceres cervicales. VPH-18: representa 10-20% de los cánceres cervicales.
VPH DE BAJO RIESGO ONCOGENICO	6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 61, 69, 70, 71, 72, 74, 81.	Pueden causar cambios benignos o de bajo grado en las células cervicouterinas y verrugas genitales. VPH-6 y VPH-11: Mayor asociación a verrugas genitales.

Tabla 3: Clasificación del Virus del Papiloma Humano según su potencial oncogénico ^(10,14, 15, 32, 33, 34, 41, 57, 59, 71, 73)

Los genotipos de bajo riesgo (preferentemente VPH 6,11) se encontraron comúnmente en condilomas acuminados y lesiones preneoplásicas de bajo grado de severidad con mínimo riesgo de progresión maligna y los de alto riesgo (principalmente VPH 16, 18, 31, 33 y 45) producen infección persistente y pueden conducir al carcinoma invasor. Actualmente existen evidencias suficientes para considerar que estos últimos tipos virales, en particular los VPH 16 y 18 son carcinogénicos en humanos ⁽⁴⁹⁾.

HPV	GENOTIPOS	LESION ASOCIADA
CUTANEOS	1, 2, 3, 4, 10, 26, 27, 28, 29, 50	Verrugas comunes de la piel: V. plantaris, V. vulgaris, V. plana, V. ulgaris,
CUTANEOS	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 47	Lesiones cutáneas benignas y malignas en pacientes inmunodeprimidos y epidermodisplasia verruciforme (EV).
CUTANEOS	6,65	Lesiones cutáneas benignas: verrugas pigmentadas.
CUTANEOS	7, 40, 43, 48.	Lesiones cutáneas de bajo riesgo: verrugas del carnicero, neoplasia intraepitelial de pene (NIP), hiperplasia vulvar, carcinoma de células escamosas cutáneo.
MUCOSOS	26, 53, 69.	Lesiones benignas en mucosas,
MUCOSOS	18, 39, 45, 57, 59, 68,	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH 18 es más frecuente en adenocarcinomas que en carcinomas escamosos de cérvix.
MUCOSOS	16, 30, 31, 33, 34, 35, 51, 52, 56, 58, 66, 67, 62, 64	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas. VPH 16 más frecuente en lesiones y carcinomas escamosos de cérvix que en adenocarcinomas.
MUCOSOS	6, 11, 13, 32, 42, 44, 54, 55, 70, 74.	Lesiones benignas en mucosas genitales, condilomas, papilomas faríngeos, laríngeos, hiperplasia epitelial focal, papiloma vulvar, papulosis Bowenoide. VPH 6 y 11 frecuente en verrugas genitales o condilomas acuminados de cérvix,

Tabla 4: Virus del Papiloma Humano y su asociación clínica ^(6, 32).

La infección por el virus del papiloma humano puede asociarse a lesiones benignas y malignas. Las benignas incluyen verrugas comunes (verrugas vulgares, verrugas plantares, verrugas genitales o condilomas acuminados), lesiones de la boca, nariz y laringe, papilomatosis conjuntival y neoplasia intraepitelial cervical. También puede asociarse a epidermodisplasia verruciforme (EV) que es una enfermedad en la que las personas pueden desarrollar cáncer de piel, en áreas de lesión por el virus, luego de exposición a la luz. Las lesiones malignas, asociadas al virus, incluyen cánceres de células escamosas de la cavidad oral y respiratoria, del área anogenital y cáncer de cérvix uterino⁽³⁴⁾.

2.9.10 Epidemiología de la infección por VPH.

La infección genital por VPH es considerada como la más frecuente de las infecciones sexualmente transmisibles. Los numerosos y diversos estudios realizados muestran un amplio rango de prevalencia de VPH dependiendo de la población de estudio, las técnicas de muestreo, los métodos de estudio, la sensibilidad de los instrumentos y métodos de detección y las diferencias en la expresión viral, que pueden explicar las diferencias existentes en las prevalencias reportadas⁽⁷⁾.

Estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos de América (EUA) muestran que 75% de la población de entre 15 y 50 años está infectada a nivel genital con el Virus de Papiloma Humano, 60% por demostración serológica correspondiente a infección transitoria, 10% con infección persistente (detección de ADN), 4% con signos citológicos leves y 1% con lesiones clínicas^(8, 71).

El pico más alto de la prevalencia de la infección se presenta en mujeres entre los 20 a 25 años de edad, después decrece, presumiblemente porque después de esa edad se adquiere inmunidad celular. La prevalencia de la infección por VPH después de la tercera década de la vida decrece y varía de 5 a 15%, pudiendo presentar un nuevo pico de prevalencia después de los 65 años de edad⁽⁷¹⁾.

Las prevalencias reportadas de infección por VPH alrededor del mundo en diferentes estudios basados en mujeres sanas con citología normal van desde 2% a 44%, más alta entre mujeres jóvenes y decayendo conforme la edad aumenta. Además, la incidencia de infección con tipos virales oncogénicos parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos^(6, 7).

Estudios realizados en casos de cáncer cervical específicamente las prevalencias de VPH encontradas fueron por encima del 95,5% hasta 100%, en países como Rusia, Argentina, Japón, Costa Rica, Estados Unidos^(7, 71).

La prevalencia varía también dependiendo de la severidad de la lesión, en mujeres con citología anormal (NIC II, III o cáncer in situ) las prevalencias son menores que las reportadas para lesiones invasoras y varían cerca del 80%⁽⁷⁾.

Un análisis de datos compartidos de 11 estudios de casos y controles de nueve países, que incluyen a 1918 mujeres con cáncer cervicouterino, reveló que ocho genotipos (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58) se encontraron en el 95 por ciento de los cánceres de cuello uterino. El tipo 16, el de mayor prevalencia, respondía por el 50 a 60 por ciento de los casos y el VPH 18, segundo en orden de prevalencia, daba cuenta de un 10 a 12 por ciento⁽⁸³⁾.

Numerosos estudios han confirmado reiteradamente la presencia de los genotipos 16 y 18 con mayor frecuencia en carcinomas cervicouterinos de mujeres de América Latina y el Caribe⁽¹⁰⁾. En estas regiones también fue el VPH de alto riesgo oncogénico más frecuente es el genotipo 16, detectable en aproximadamente del 50% a 80% de todos los cánceres, el genotipo 18 presente en cerca del 14% y el resto de casos de infección es atribuible a los otros genotipos; aunque la distribución de frecuencias varía notablemente en función de las poblaciones analizadas^(7, 32, 33, 75).

El exceso de riesgo (odds ratio) de cáncer de cérvix asociado con VPH-AR en estudios de casos y control es superior a 150, esto significa que el riesgo de desarrollar cáncer de

cuello de útero en una mujer infectada por VPH-AR es 150 veces superior al de la mujer no infectada⁽³³⁾.

La infección por VPH-BR puede causar lesiones subclínicas o clínicas como los condilomas o verrugas genitales que pueden afectar a todo el tracto genital (vulva, vagina y cérvix), el área anorectal, uretra y tracto aéreo superior (papilomatosis laríngea), los tipos virales 6 y 11 son responsables del 90% de todas las verrugas anogenitales. Las infecciones clínicas por VPH-BR causan una importante morbilidad y costos sanitarios derivados de su diagnóstico, seguimiento y tratamiento^(33, 75).

2.9.11 Replicación viral y mecanismos de oncogénesis de VPH.

El ciclo de replicación de VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas; exhibiendo un alto grado de tropismo por el epitelio escamoso en diferentes regiones corporales donde los tipos asociados a lesiones anogenitales se encuentran solamente en la región genital, mientras que los tipos asociados con verrugas cutáneas en manos y pies se encuentran restringidos a dichas áreas^(7, 36).

E. Adhesión, penetración y desensamblaje.

El VPH inicia su ciclo productivo infectando a células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio que son mitóticamente activas, donde inicia la transcripción de sus genes de la región temprana, el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio a través de lesiones, microheridas y abrasiones del epitelio estratificado. La vía de transmisión más común para el VPH genitoanal en adultos es la sexual, si bien no la única. También puede producirse por traumatismos con material contaminado o superficies que porten el virus^(6, 7, 34, 35, 36, 38, 71).

El virus se une a su célula blanco a través de un receptor específico de membrana, no identificado totalmente, pero el complejo integrina $\alpha 6 - \beta 4$ se ha propuesto como candidato^(6, 36). Además se ha visto que la entrada depende de la presencia de

proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, que podrían ser el lugar de unión inicial previo a la unión con el receptor^(3, 6).

La internalización del virus ocurre por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina. El desensamble del virión se lleva a cabo por rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside, lo que permitiría el transporte del DNA viral al núcleo celular⁽⁶⁾.

F. Mantenimiento del genoma.

Dependiendo de una variedad de factores, la infección puede permanecer latente o volverse productiva. La infección latente se refiere al mantenimiento de una infección viral sin la producción de virus infecciosos, en la que el ADN viral permanece en el núcleo como una molécula libre extracromosomal, circular y autoreplicativa llamada episoma^(34, 35). En esta fase, la replicación del virus se hace simultáneamente con la división de la célula del huésped, por lo que el número de copias virales por célula no disminuye con el tiempo^(32, 34).

Después de la infección y desensamble en las células basales y para mantener su genoma episomal en bajo número de copias, de 10 a 200 por célula, se expresan las proteínas E1 y E2 que son reguladoras de la replicación y transcripción viral, se ha visto que si hay una falla para expresar E1, se pierde el estado episomal y el genoma viral se integra al de la célula⁽⁶⁾.

La fase de incubación dura aproximadamente de 6 semanas a 8 meses, aunque puede prolongarse por años, periodo en el cual grandes zonas del epitelio genital y anal son colonizados sin que ocurra manifestaciones clínicas ni histológicas, es decir los efectos citopáticos del virus no están presentes en estas células; en este momento la infección es conocida como latente (replicación episomal viral)^(32, 34, 35, 71).

G. Fase proliferativa.

Seguido a la integración del ADN viral al genoma de la célula se inicia una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S⁽⁶⁾.

Cuando el genoma de VPH se inserta rompe una parte del gen E2/E1, la división del gen E2 produce su inactivación del cual solo se transcribe el dominio activador de la transcripción desregulada de E6 y E7, este ADN integrado se replica durante cada mitosis celular, de tal modo que un contenido cromático aneuploide se desarrolla en la célula huésped y le da morfología displásica; en estos casos, la producción de ADN viral es mucho menor y los productos de genes tardíos casi nunca aparecen^(7, 32, 34).

La expresión de E6 y E7, evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato suprabasal del epitelio. Estas proteínas retardan la diferenciación celular y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control del ciclo celular (p53, pRB)^(6, 34). Se considera que la integración del ADN viral al genoma celular es de importancia para el desarrollo de células tumorales⁽³⁴⁾.

Sin embargo la integración del genoma viral no siempre es condición previa para la aparición de cáncer cervicouterino; en primer lugar, la integración se encontró no solo en cáncer sino también en lesiones de neoplasia intraepitelial cervical y en segundo lugar en un porcentaje significativo de biopsias de cáncer cervical se encontró ADN episómico viral. Debido a la falla de los mecanismos de control celular producidos por la actividad de E6 y E7 no se impide el crecimiento celular, ni se repara el daño del ADN. Las células transformadas pierden la capacidad de expresar proteínas de la cápside del virión y por tanto no son permisivas para la producción del virus⁽³⁴⁾.

Finalmente la evolución de la infección al immortalizar las células epiteliales, permite adquirir una acumulación gradual de cambios celulares específicos, requeridos para la génesis del tumor y que van a reflejar el largo periodo de tiempo que se describe entre el inicio de la infección y la aparición de lesiones invasivas del cérvix. Se ha encontrado que E6 y E7 son activamente transcritos en el cáncer cervical, lo que sugiere que se requiere la expresión permanente y no regulada, de estos genes para mantener el fenotipo transformado. In vitro se ha observado que al inhibir las funciones de E6/E7 las células transformadas vuelven a la normalidad^(3, 34).

H. Amplificación del genoma, síntesis y liberación de viriones.

Cuando se presenta la división celular una célula empieza a migrar hacia la superficie e inicia su proceso de diferenciación, lo cual es un problema para el virus que requiere de toda la maquinaria replicativa de la célula para la síntesis de su ADN; sin embargo; el virus requiere de algún nivel de diferenciación ya que el promotor que regula la síntesis de la cápside solo se activa en células parcialmente diferenciadas. Por lo tanto el virus debe alterar la progresión de la fase G1 a la S para realizar su replicación en la capa espinosa y la síntesis de la cápside y amplificación de su ADN cerca de la capa granular o córnea⁽³⁵⁾.

En la infección productiva la replicación del ADN viral ocurre de manera independiente al ADN cromosomal, lo cual produce grandes cantidades de material genético del virus y lleva a la producción de viriones⁽³⁴⁾.

Para que se produzcan viriones infecciosos, los VPH deben amplificar su genoma y empaquetarlo en la cápside proteica. La amplificación del genoma ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación. Este promotor se halla en el marco de lectura del gen E7 y promueve la transcripción de proteínas involucradas en la replicación del ADN viral, tales como E1, E2, E4 y E5, así como las constituyentes de la cápside, L1 y L2. Para la replicación viral se necesita que E2 se una a la LCR y que promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral. El ensamble de las partículas virales

ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaman de la capa superior de este ^(6, 34, 35).

El VPH no es lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye a la liberación del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina ⁽⁶⁾. Estas células si muestran los efectos citopáticos característicos de la infección por VPH y pueden ser detectados citológica e histológicamente ⁽³⁴⁾.

El progreso de la infección a su expresión activa, con el efecto citopático viral relacionado representa la pérdida del control del ciclo celular local y requiere la interacción con la célula huésped, el estado inmune del huésped y factores de riesgo, tales como la infección por otros virus, comienzo de relaciones sexuales a temprana edad, uso de nicotina, tipo de HLA y genotipos del VPH ⁽³²⁾.

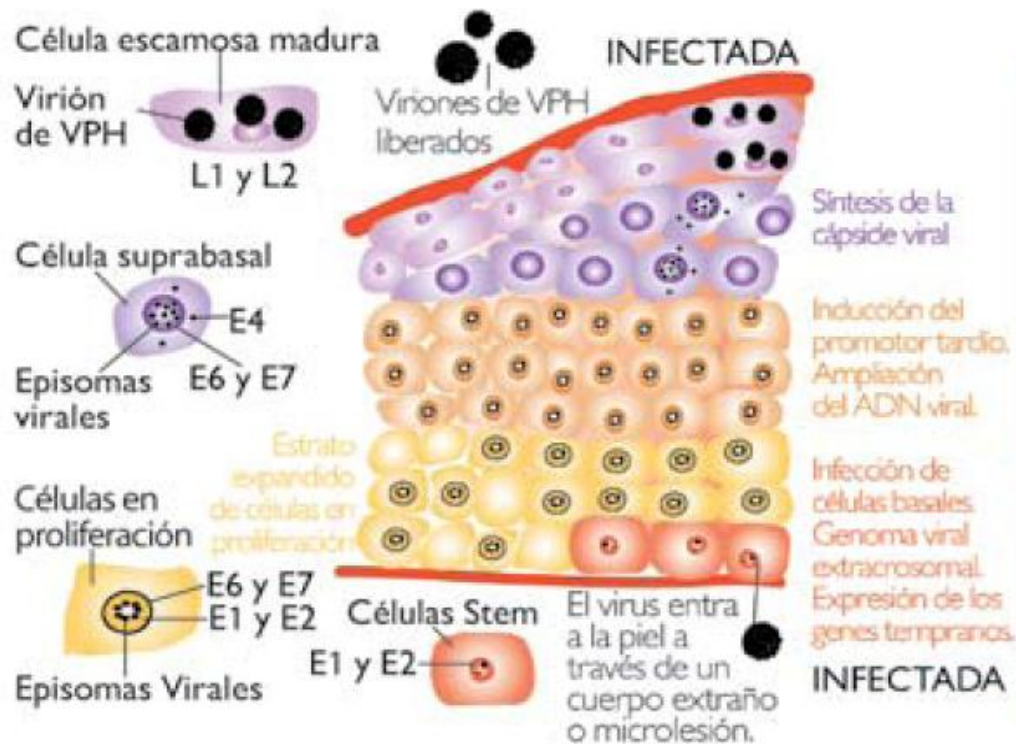


Figura 8: Ciclo de replicación de VPH ⁽⁶⁾

2.9.12 Respuesta inmune frente a VPH.

Globalmente, aproximadamente 40% de los adultos activos sexualmente son infectados por VPH. La respuesta inmune innata y adaptativa es capaz de eliminar más del 90% de las infecciones y protege consecuentemente del desarrollo de tumores relacionados con los VPH de alto riesgo oncogénico. Sin embargo, en la infección viral del queratinocito se presentan diferentes condiciones fisiopatológicas que limitan teóricamente la respuesta inmune efectora local. La erradicación de la infección por VPH en sujetos sanos requiere desarrollar una activación efectiva tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. En los pacientes que cursan por inmunosupresión o inmunodeficiencia, el riesgo de infección persistente y de transformación a malignidad se incrementa en forma importante^(3, 14).

La primera línea de defensa en las mucosas contra la infección viral es la respuesta inmune innata (RII), en esta participan citocinas, células centinelas locales, el sistema del complemento y linfocitos citolíticos poco específicos llamados asesinos naturales (NK). Poco después, la RII interactúa con la respuesta inmune adaptativa (RIA) e inicia la respuesta específica con linfocitos B y T. Un gran eslabón para ambos tipos de respuesta es la participación de las células presentadoras profesionales de antígenos (CPPA), a este nivel específicamente las células dendríticas y citocinas liberadas⁽¹⁴⁾.

En presencia de señales inflamatorias de peligro provocadas por necrosis tumoral, trauma celular, coinfección u otras señales de citocinas proinflamatorias, las células dendríticas viajan del cérvix a los ganglios linfáticos regionales donde los péptidos procesados son presentados en la superficie celular unidos a las moléculas clase I o clase II del MHC, para interactuar con los receptores específicos de los linfocitos T CD8 o T CD4 respectivamente. Así las células dendríticas transmiten a los linfocitos T un estímulo de activación convirtiéndolas en células efectoras, denominándose en esos casos linfocitos T citotóxicos CD8 (LTc) y linfocitos T ayudadores CD4 (LTh)⁽¹⁴⁾.

Los LTc específicos destruyen a los queratinocitos infectados y los LTH secretan citocinas proinflamatorias para potenciar el efecto de los LTC y estimular la respuesta IgG2a de los linfocitos B (anticuerpo que activa la cascada del complemento, al unirse a los receptos Fc de los macrófagos o de las células NK e inicia la citotoxicidad dependiente de anticuerpos). Al mismo tiempo las células dendríticas reclutan y secretan mediadores que aumentan el ambiente inflamatorio y promueven la respuesta antiviral de los linfocitos T. Algunos linfocitos efectores después de haber lisado (por medio de gránulos de perforina y granzima) o inducido el suicidio (vía Fas) a las células diana, se retiran y estimulan su producción, convirtiéndose en células de memoria que podrán reactivarse nuevamente cuando se encuentren con el mismo antígeno. Múltiples estudios han demostrado la importancia de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T contra las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH 16⁽¹⁴⁾.

Diferentes razones conducen a que en la infecciones por los VPH se genere una respuesta inmune poco potente. Los VPH son inmunógenos naturales débiles debido a que su propio patrón de composición molecular no es reconocido por los receptores de las células de la respuesta inmune innata, al estar constituidos por una doble cadena de DNA a diferencia de los virus RNA son poco inmunogénicos y su expresión se presenta en escasa cantidad comparada con la expresión de proteínas inmunogénicas de otros virus, provocando respuesta inmune innata local mínima. En estas condiciones la infección por los VPH en los queratinocitos o en las lesiones preinvasoras epiteliales está limitada a las células superficiales y no penetra por debajo de la membrana basal.

Los VPH mantienen un ciclo de vida sin salir del queratinocito infectado, inducen proliferación celular, no provocan lisis celular y por ello también no inducen una respuesta inflamatoria potente^(3, 14).

Por otra parte, la infección por VPH no provoca fase virémica y por lo tanto cursa sin presentación sistémica del antígeno, ya que su replicación está delimitada al queratinocito. Además VPH no infecta a las CPPA y al no lisar queratinocitos impide también que las CPPA fagociten a los viriones y presenten los antígenos virales a los linfocitos T y B. Por

ello no se genera una respuesta sistémica inmune. Dadas estas condiciones el sistema inmune tiene limitada oportunidad de identificar y combatir eficientemente la infección por VPH, por lo que se desencadena una respuesta inmune innata limitada en el hospedero, que a su vez bloquea la generación de señales que inician la respuesta inmune adaptativa específica global, por lo que frecuentemente el huésped queda inmunológicamente ignorante de la infección y desconoce su estado infeccioso ⁽¹⁴⁾.

En general, las infecciones persistentes se asocian inicialmente a una respuesta deficiente de la respuesta celular, primero de la innata y posteriormente de la respuesta inmune adaptativa. Asociado a que en general la respuesta inmune natural del huésped contra la infección por VPH es débil, tomando en cuenta también que los VPH de alto riesgo oncogénico pueden ser ignorados porque emplean adicionalmente otros mecanismos para minimizar o evadir las respuesta innata y adaptativa ⁽¹⁴⁾.

La respuesta innata antiviral comprende la liberación de citocinas por las células infectadas como ser interferones α - β - δ , TNF α , IL6, IL12, las cuales participan en casi todas las fases de la respuesta inmune contra la infección viral, incluyendo el control de la inflamación, la inducción del estado antiviral, la regulación de la respuesta adaptativa y la comunicación entre la RII y la RIA. Los VPH de alto riesgo oncogénico impiden la respuesta antiviral inmune innata en el epitelio cervical porque las proteínas E6 y E7 bloquean la actividad del interferón α y β por inhibición de su síntesis, de esta manera los VPH no son reconocidos como extraños ^(3, 14).

La proteína E6 también inhibe la adhesión entre las células epiteliales y las CPPA (células de Langerhans o células dendríticas) por baja expresión de E-caderina, esta molécula en la superficie celular de queratinocitos infectados por VPH 16 se reduce, por esto las CPPA en estos sitios son escasas. A esto se adiciona la proteína E5 la cual acidifica los endosomas, reduciendo el procesamiento y presentación antigénica ^(3, 14). Los anticuerpos específicos contra la proteína L1 aparecen varios meses después de la primera infección viral y los correspondientes contra E7 frecuentemente solo se destacan en condiciones de cáncer invasor ^(3, 14).

Además, las células tumorales del cáncer cervical son deficientes en la presentación de los antígenos propios y extraños por vía endógena, tanto por desregulación frecuente en la expresión de moléculas de clase I del MHC, como de las proteínas del sistema de transportación del antígeno del citoplasma a la luz del retículo endoplásmico. Esto debido en parte a la inestabilidad génica y a las diversas mutaciones que se presentan en el cromosoma 6, sitio de codificación de las moléculas del MHC y del sistema funcional del inmunoproteosoma, esto permite que la célula tumoral escape de los mecanismos de inmuno-identificación y citotoxicidad por los linfocitos CD8 específicos ⁽¹⁴⁾.

En la mayoría de los casos el control local de la infección por VPH se lleva a cabo por una respuesta eficiente del sistema inmune del hospedero. Sin embargo, en lesiones preinvasivas de alto grado, en carcinoma “in situ” e invasor, se observan diversas alteraciones en los sistemas de presentación antigénica celular, así como falla en los sistemas de respuesta de linfocitos T CD4 y CD8 que impiden la regresión o el control inmunológico de estas lesiones ⁽¹⁴⁾.

2.13 PATOGENIA DEL CANCER CERVICOUTERINO.

En la patogénesis del cáncer cervical existen cinco componentes, cuatro de ellos relacionados de manera directa con la infección persistente por VPH ⁽³⁾.

1. Genotipo específico de VPH ⁽¹⁴⁾.
2. Influencia de la carga viral ⁽¹⁴⁾.
3. Los efectos de las oncoproteínas E6 y E7 ⁽³⁾.
4. Grado de integración del ADN viral en regiones de los cromosomas que están relacionados con fenotipos asociados a tumores ⁽³⁾.
5. La presencia de alteraciones genéticas recurrentes no ligadas a la presencia de VPH ⁽³⁾.

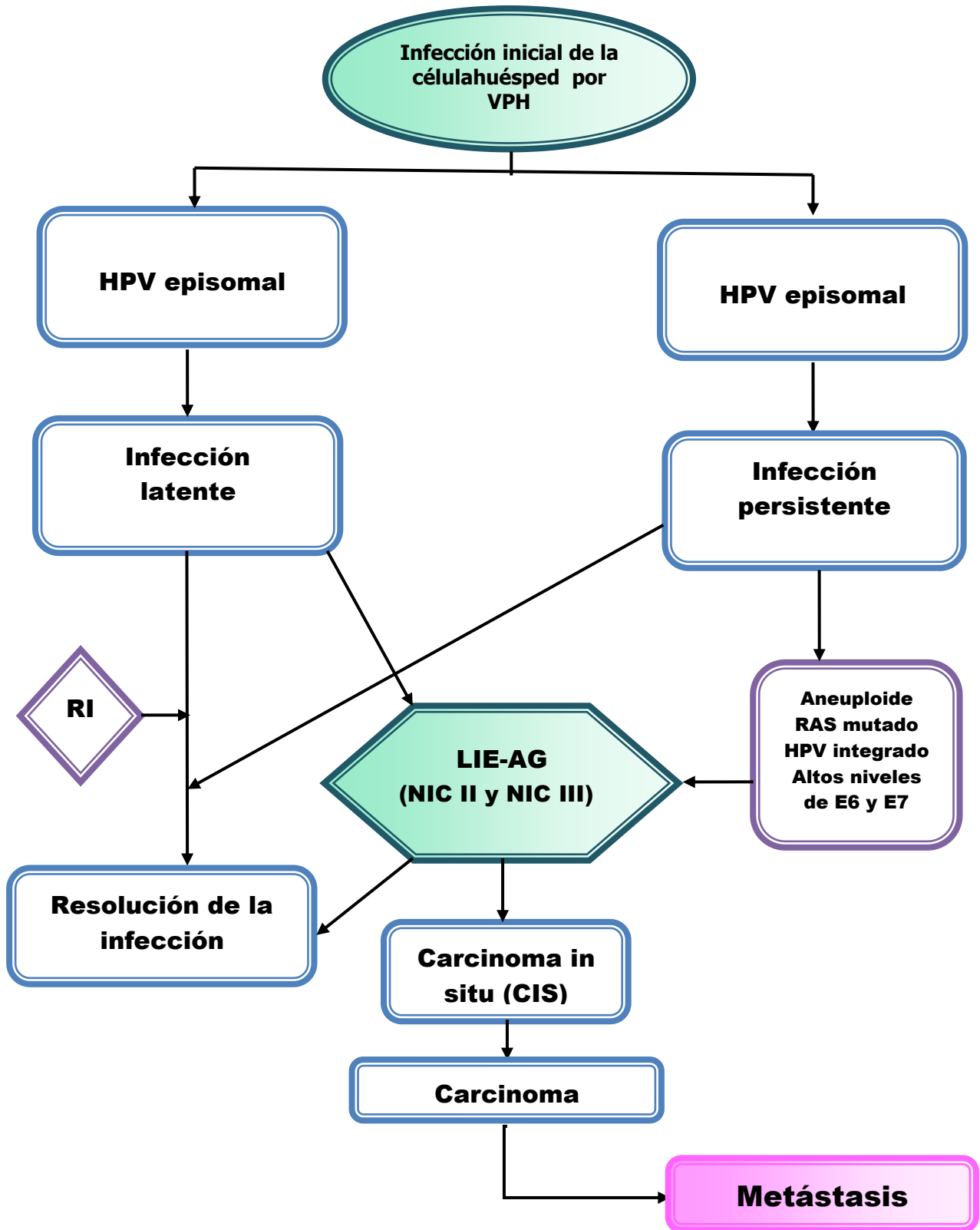


Figura 9: Mecanismo de carcinogénesis de VPH en la patogénesis del cáncer cervical ^(3,7)

Se ha encontrado que la infección con múltiples tipos virales de VPH está asociada con persistencia. Los estudios de Bachtiry y Van Der Graaf sugieren que la infección múltiple está asociada con 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 ⁽⁶⁾. Sin embargo los casos de persistencia de infección con VPH de alto riesgo oncogénico por muchos años puede iniciar una transformación en el epitelio cervical (etapa preinvasora, caracterizada por la presencia de lesiones intraepiteliales) que con el transcurso de los años y asociado a la presencia de otros cofactores de riesgo puede llegar a desencadenar el cáncer local, regional y a distancia ^(14, 33). Esto fue evidenciado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, Lyon, Francia), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS) que ha establecido en 1995 que ciertos tipos de VPH (denominados de alto riesgo) son carcinogénicos. Esta afirmación está basada en evidencias epidemiológicas y moleculares que indican que los VPH de alto riesgo pueden interferir en el control de la proliferación celular. Esto marcó un hito, señalando a la infección por VPH como condición necesaria para la génesis del tumor ⁽⁷¹⁾.

La mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes. Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. Sin embargo, la mayoría son transitorias, solo cerca del 25% desarrollan una lesión intraepitelial de bajo grado LIE-BG, de estas solo el 20 a 60% progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado LIE-AG. Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren una infección por VPH, solo el 5 o 15% de ellas desarrollarán una LIE-AG, mientras que cerca del 85% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia clínica alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses. Sin embargo, en aquellas con una deficiencia inmune adquirida, heredada o inducida farmacológicamente, hay una fuerte tendencia para que la infección persista y malignice en caso de infección con VPH de alto riesgo oncogénico. Si el virus permanece en forma latente, una mujer que parece haber tenido una regresión de su infección estaría aún en riesgo de desarrollar alguna lesión asociada al VPH ^(6, 7).

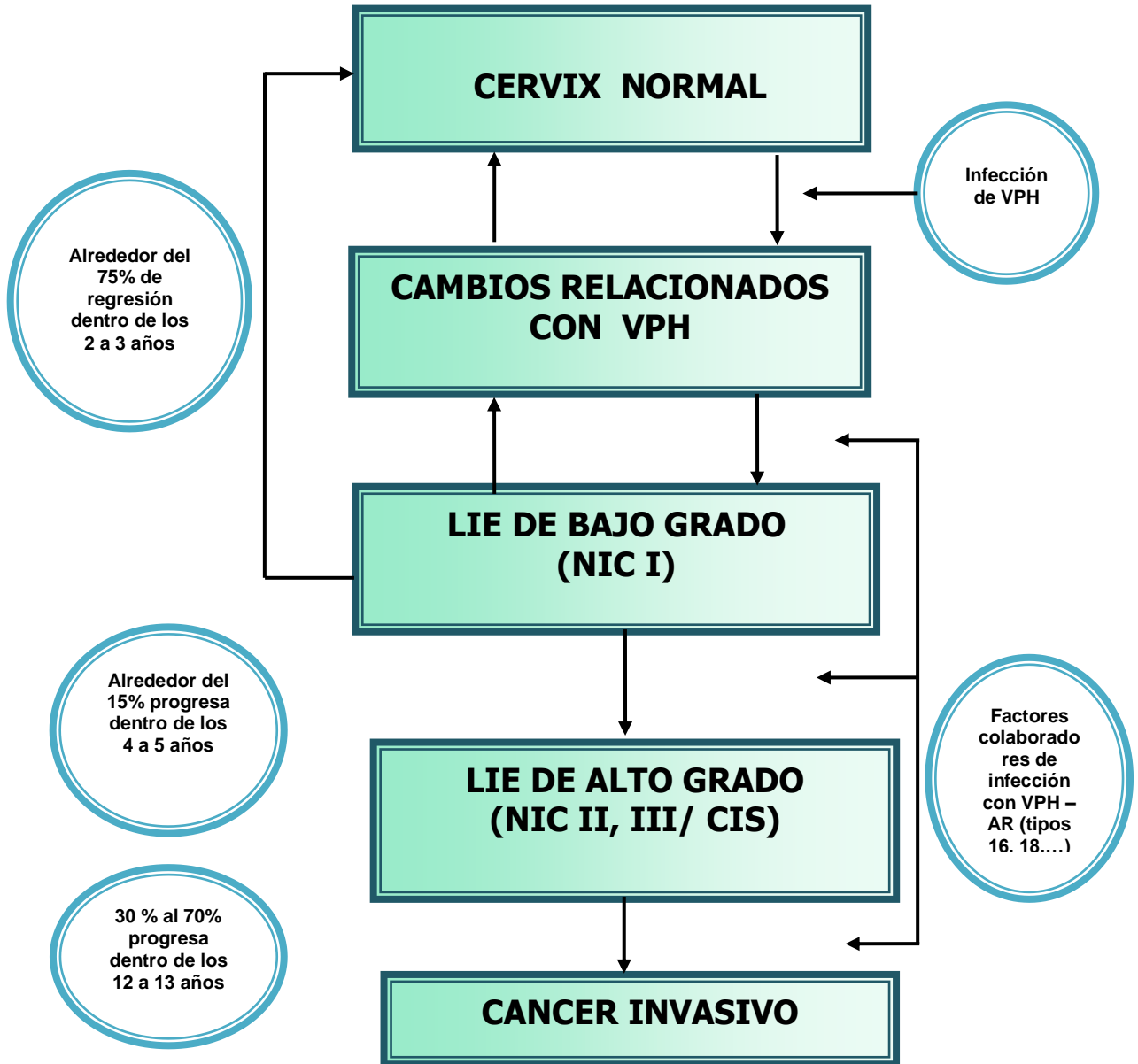


Figura 10: Desarrollo de lesiones precursoras hasta el progreso de cáncer cervical ⁽⁷⁾

No se conoce con certeza el tiempo que se requiere para que una lesión evolucione desde bajo grado hasta un cáncer in situ, o para que eventualmente progrese a un cáncer invasor. Sin embargo, se ha desarrollado modelos matemáticos para entender dicho fenómeno, se ha calculado que el tiempo promedio que le toma a una lesión epitelial progresar de un

grado al siguiente es aproximadamente de 4 a 5 años y de 12 a 13 años lo que toma a una lesión de alto grado para progresar a cáncer invasor⁽⁷⁾.

El desarrollo de una lesión precancerosa de cuello uterino involucra varios eventos. La exposición a algún VPH de alto riesgo produce una infección inicial del epitelio escamoso en la zona de transformación seguido por alteraciones morfológicas y biológicas de las células infectadas por el VPH. Aunque en este proceso es clara la interacción entre VPH y genes celulares, algunos estudios apoyan la participación de alteraciones en oncogenes celulares, además de la respuesta inmune del huésped, para que se produzca un cáncer invasor⁽⁷⁾.

2.14 DIAGNÓSTICO DE CaCu.

La facilidad de acceso al cuello uterino permite la aplicación de técnicas de detección y diagnóstico cuya eficacia ha permitido que sea, el cáncer de cérvix, el primer cáncer en el que la prevención sistemática consiguió rebajar su incidencia en todos los países en que estas técnicas se han aplicado de forma masiva⁽²⁶⁾.

Para que un sistema de detección (screening) sea eficaz debe cumplir los siguientes requisitos:⁽²⁹⁾.

1. Debe detectar la enfermedad en una etapa temprana con el fin de proporcionar un tratamiento definitivo.
2. Debe ser lo suficientemente sensible.
3. Debe ser lo suficientemente específico.
4. Debe ser un método simple, accesible e indoloro.
5. Debe tener bajo costo para la paciente o para un programa de screening.

2.14.1 Citología Exo-endocervical.

También llamado: Examen citológico, Papanicolaou (PAP), Extendido cervical o Citología vaginal.

La introducción del frotis de células recolectadas del cuello uterino y vagina, para la detección de cáncer cervicouterino, se debe a George Nicolás Papanicolaou. Ha pasado largo tiempo desde la introducción de esta técnica en 1940⁽²⁶⁾.

El objetivo fundamental de la aplicación de esta prueba es la detección de lesiones precursoras del cáncer de cérvix de forma que se logre una reducción de la incidencia de lesiones invasivas. Este examen citológico se basa en la exfoliación espontánea o inducida de células normales o patológicas del cuello uterino. Su principal aplicación clínica es la distinción entre lesiones cervicales benignas de aquellas precancerosas o francamente malignas y como procedimiento de seguimiento en pacientes con tratamiento previo⁽²⁶⁾.

El test de Papanicolaou o citología cervicovaginal, sigue siendo la prueba más utilizada y apropiada para cribado de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino frente a otras disponibles, la detección de lesiones cervicales con este método se basa en el estudio de la zona de transición escamocolumnar denominada también zona de transformación, donde se desarrolla un proceso continuo de metaplasia escamosa, que cambia como reacción a la pubertad, embarazo menopausia y estimulación hormonal, la cual es conveniente reconocerla para llevar a cabo una buena citológica^(26, 29), es así que en esta zona bajo el efecto de estímulos infecciosos virales por VPH, el proceso de metaplasia puede desviarse, dando lugar a un proceso discariótico en la zona de transformación, siendo el punto de partida de los eventos neoplásicos del cérvix⁽²⁹⁾.

G. Técnica apropiada para el frotis Papanicolaou (Pap).

La prueba se desarrolla a partir del estudio de células obtenidas de un raspado de la pared cervical, que son posteriormente colocadas en una laminilla de vidrio (portaobjetos), fijadas, teñidas y estudiadas al microscopio por un citólogo ^(16, 36).

El 90% de las lesiones precancerosas de cérvix tiene lugar en la zona de transformación. El epitelio columnar endocervical representa el límite superior de la zona de transformación por consiguiente es ampliamente aceptado que la presencia de células endocervicales en el extendido es el parámetro más importante que indica que la muestra es representativa de esta zona ⁽²⁹⁾.

Un porcentaje del 25% de células endocervicales o más con buena preservación representa lo óptimo en el control de calidad de la muestra, porcentajes menores al 12,5 % se consideran inadecuados para el diagnóstico, por consiguiente el frotis debe ser rechazado para su interpretación y el PAP debe repetirse ⁽²⁹⁾.

H. Estrategias para la correcta toma de muestra citológica ^(16, 29).

1. El espejo debe introducirse sin lubricantes y evitando traumatismos cervico-vaginales.
2. Visualizar bien el cérvix para ubicar la zona de transformación (zona de transición escamocolumnar) la cual varía con las diversas etapas de la vida.
3. La toma ectocervical se realiza con espátula de madera (espátula de Ayre), se raspa suavemente el exocervix en toda su extensión y se coloca el material en la placa de vidrio en forma ondulante.
4. La toma endocervical se realiza idealmente el cepillo (cytobrush) endocervical y rotándolo sobre el conducto endocervical se toma una buena muestra la cual se extiende en el extremo inferior del portaobjetos en sentido longitudinal y en forma rotante, quedando una lámina fina y transparente al microscopio.

5. El material extendido en el portaobjetos, se fija inmediatamente con alcohol al 96 % o con spray fijador citológico.
6. Verificar los datos del paciente, número de placa y enviar al estudio citológico.

I. Citología falsa negativa.

El PAP falso negativo resulta cuando es reportado como normal y por otros métodos (colposcopia, biopsia, HPV/DNA) se reporta patología premaligna o maligna. El porcentaje de falsos negativos es hasta un 20% para el cáncer invasor y de un 20% a 50% para lesiones intraepiteliales de alto o bajo grado (LIE-AG, LIE-BG) ⁽²⁹⁾.

Existe una gran variabilidad en los resultados de sensibilidad y especificidad comunicados por diferentes estudios, se han obtenido rangos de sensibilidad de 11 a 99% y de especificidad de 14 a 97%. Con una tasa de resultados falsos negativos señalados en la literatura que varía de 20 a 50%, pero al repetir el estudio esta tasa disminuye de 1 a 2% ^(16, 26).

De tal manera que pese a su éxito, la principal limitación de la citología son los falsos negativos; de los cuales cerca de un tercio son atribuibles a errores en su interpretación y dos tercios a la toma de muestra y preparación de la placa ^(15, 16).

J. Causas de citología falsa negativa.

- ❖ **Error en la toma de muestra:** Las células diagnosticadas no se encuentran en la placa de vidrio, este error es el más común y ocurre generalmente cuando la paciente usa medicamentos tópicos o mantiene relaciones sexuales antes del análisis y no se limpia el cuello para tomar la citología o cuando las muestras de las células del cérvix no son representativas de la lesión, por mala técnica en reconocer la zona de transformación o por no usar material adecuado (espátula de Ayre o Cytobrush) ^(15, 26, 29).

- ❖ **Errores por mala fijación:** Secado al aire libre, uso de lacas, con estos procedimientos la célula sufre cambios de degeneración que pueden dar errores de lectura, esencialmente debe realizarse con un fijador en forma de spray^(15, 29).
- ❖ **Errores en la evaluación:** La falta de pericia del evaluador puede representar una causa importante de falsos negativos. Si el patólogo examina las células en cuestión y considera benignas cuando de hecho eran premalignas o malignas representa un error que puede evitarse cuando los laboratorios de citopatología utilizan el procedimiento de citología líquida^(15, 26, 29).

K. Conductas según reporte de citología.

En general se acepta que no más de un 10% de las citologías tomadas deben ser remitidas para colposcopia.

De acuerdo con los resultados de la citología las conductas a seguir son:

- ❖ La citología cervical se realizará cada tres años en aquellas mujeres con dos citologías previas anuales consecutivas, con resultado negativo a infección por Virus del Papiloma Humano, displasias o cáncer^(26, 29).
- ❖ Si la citología reporta cambios benignos se analizan las causas, se ordena el tratamiento necesario y se continúa con el control citológico trimestral o semestral y cuando sean dadas de alta reiniciarán su vigilancia anual. Las mujeres con resultados positivos a procesos inflamatorios inespecíficos persistentes deberán continuar con exámenes anuales hasta que tengan dos resultados negativos^(26, 29).
- ❖ Si la citología es reportada como anormal, la paciente debe ser remitida a una unidad de Patología Cervical y Colposcopia para el estudio colposcópico y posterior estudio histopatológico^(26, 29).

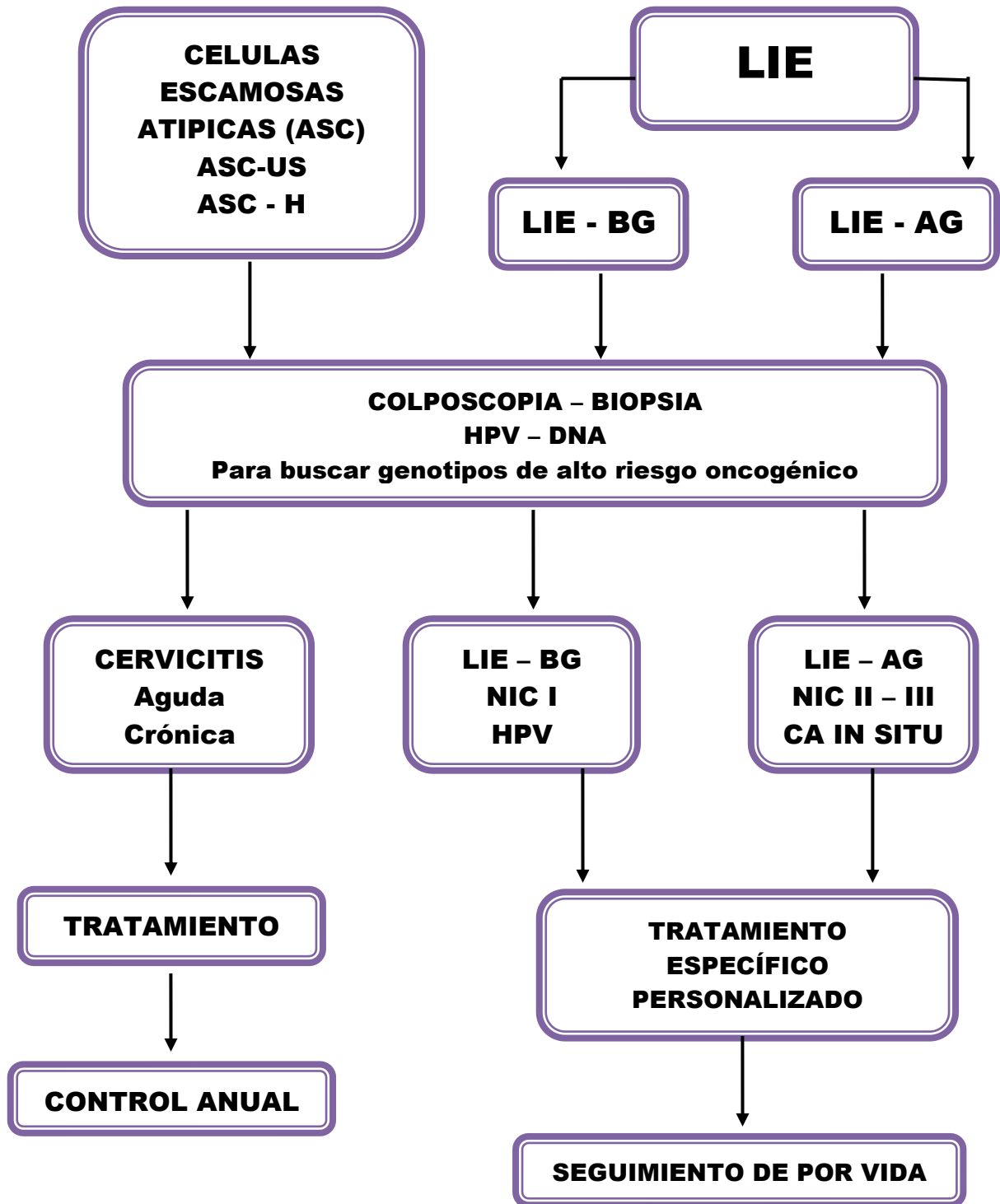


Figura 11: Protocolo de manejo de la citología Exo – endocervical ⁽²⁹⁾

L. Reporte de resultados.

Para el informe de los resultados se han empleado diversos métodos proponiéndose últimamente el sistema de 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 incluyen en esta categoría el término ASC (células escamosas atípicas), otra variedad de lesiones son las dadas por las células glandulares de significación indeterminada (AGUS) ⁽²⁶⁾.

2.14.2 Colposcopia.

El cérvix es una estructura de fácil acceso a través de la exploración ginecológica, lo que ha contribuido al desarrollo de técnicas para su estudio. Sin embargo, la visión directa a través del espéculo, apartando las paredes de la vagina, no ofrece mucha información y se torna necesario el uso del colposcopio para estudiar las características normales y los distintos procesos patológicos ⁽⁴⁰⁾.

El colposcopio es un instrumento implantado por primera vez por Hinselman en 1925, básicamente se trata de un lente binocular de 10 aumentos provisto de luz potente, que proporciona una visión con aumento variable. Su principio es la visualización esteroscópica del cuello mediante magnificación con iluminación directa con lo cual es posible reconocer, delimitar y diagnosticar los diferentes aspectos normales y anormales del exocervix vagina y genitales externos ^(26, 40).

El principal propósito de la colposcopia es localizar el origen de las células anormales detectadas por medio del frotis de Papanicolaou; determinar la extensión de la lesión para planificación del tratamiento y seleccionar los sitios para realizar las biopsias y establecer un diagnóstico histopatológico. La sensibilidad de la colposcopia es elevada, en cambio la especificidad es baja, es decir, que no resulta fácil determinar que lo observado mediante visión colposcópica es una NIC I, II, o III ^(26, 36).

El cuello uterino normal y el cuello uterino patológico muestran patrones colposcopicos determinados y en la mayor parte de las ocasiones emiten criterios que se correlacionan con la citología e histopatología. No obstante, la colposcopia al ser poco específica emite hallazgos anormales que no corresponden necesariamente a una lesión ^(26, 40).

El estudio colposcópico cuenta con los siguientes pasos: ^(26, 40).

1. Anamnesis.
2. Evaluación clínica de los genitales externos.
3. Aplicación del espéculo a través de la vagina, debe introducirse sin lubricantes y evitando traumatismos cervico - vaginales.
4. Obtención de muestras para examen bacteriológico.
5. Obtención de muestra exo y endocervical.
6. Observación directa del cérvix, realizar limpieza de secreciones o moco con solución fisiológica y visión eventual con el uso del filtro verde.
7. 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).
8. Aplicación de lugol y observación de los cambios (test de Schiller).
9. Biopsia dirigida.

D. Test de IVA.

Este test consiste en observar el cuello uterino a simple vista después de limpiar el cuello uterino 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 ^(26, 36).

E. Test de Schiller.

En 1928 Hinselmann describe como primer método de perfeccionamiento de la colposcopia la prueba de Yodo enunciada por Schiller que permitía, destacar el epitelio normal. 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 con anormalidad no presentaba tinción ⁽²⁶⁾.

F. Reporte de resultados.

La clasificación colposcópica debe tener validez conceptual y concordancia del comportamiento biológico de las lesiones comprendidas en la misma clase. La clasificación Internacional comprende lo siguiente: ⁽²⁹⁾.

2. Hallazgos colposcópicos normales.

- a) Epitelio estratificado escamoso originario.
- b) Epitelio cilíndrico.
- c) Zona de transformación.

3. Hallazgos colposcópicos anormales.

- a) Zona de transformación atípica.
 - 1) Mosaico.
 - 2) Punteado.
 - 3) Epitelio blanco.
 - 4) Queratosis.
 - 5) Vasos atípicos.
- b) Carcinoma invasor sospechoso.

4. Hallazgos colposcópicos insatisfactorios (línea escamo-cilíndrica no visible)

5. Varios
 - a) Modificaciones inflamatorias.
 - b) Modificaciones atróficas.
 - c) Condiloma.
 - d) Papiloma.

2.14.3 Histopatología.

El grado de avance de la lesión intraepitelial escamosa debe ser determinado por un estudio histopatológico, que permite diferenciar los estratos del epitelio afectado, de este modo detectar tanto el nivel de infiltración celular como las áreas de invasión; es por esto que el diagnóstico histopatológico es considerado como la prueba de oro para la detección y clasificación de las lesiones ⁽³⁶⁾.

Constituye sin duda el método más exacto y seguro para establecer el diagnóstico de la neoplasia intraepitelial cervical, es incorrecto iniciar un tratamiento sin concluir previamente con un diagnóstico histológico de muestras tisulares obtenidas a través de biopsias dirigidas bajo visión colposcópica y conización 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 ⁽²⁶⁾.

B. Reporte de resultados.

El resultado histopatológico podría ser reportado de la siguiente manera: ⁽²⁶⁾.

1. Tejido de cérvix normal.
2. Cervicitis aguda o crónica.
3. Infección viral (herpes, VPH).

4. Displasia leve, (NIC I), (LIE-BG).
5. Displasia moderada, (NIC II), (LIE-AG).
6. Displasia severa, (NIC III), (LIE-AG).
7. Cáncer in situ (NIC III), (LIE-AG).
8. Cáncer microinvasor.
9. Cáncer invasor.
10. Adenocarcinoma endocervical o endometrial.
11. Sarcoma y otros tumores.
12. Maligno no especificado.
13. Insuficiente para diagnóstico.

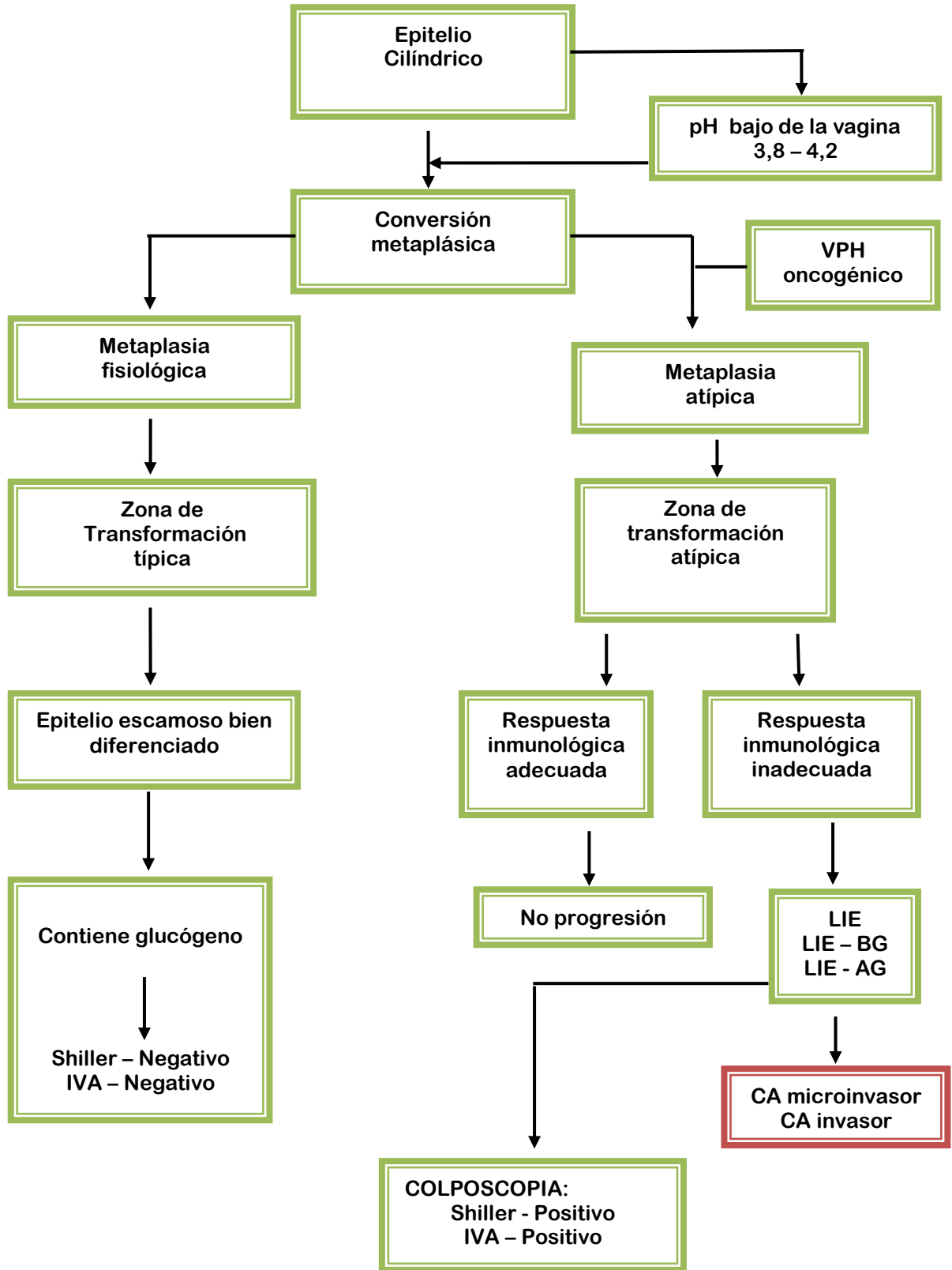


Figura 12: Histogénesis del cáncer de cérvix ⁽²⁹⁾

2.14.4 Interpretación de epitelios normales mediante estudio colposcópico junto con descripciones de citología e histología.

Los hallazgos colposcópicos normales descritos en la clasificación de Barcelona de 2002 corresponden a los tres tipos de epitelio que se hallan en el cuello normal: Epitelio escamoso, epitelio cilíndrico y epitelio metaplásico (zona de transformación) ⁽⁴⁰⁾.

D. Epitelio escamoso normal.

También denominado epitelio pavimentoso o mucosa originaria. Frente al **estudio colposcópico** se muestra de color rosado de superficie uniforme, lisa y húmeda. No presenta cambios tras la aplicación de ácido acético y se tiñe de color caoba tras la realización del test de Schiller (aplicación de lugol) ⁽⁴⁰⁾.

El **estudio histológico** muestra un epitelio plano poliestratificado con 7-10 hileras de células que se dividen en tres estratos: Estrato basal, con células de núcleos grandes y citoplasma fundamentalmente basófilo, estrato intermedio o espinoso, que muestra varias hileras de células ovaladas con núcleo vesicular y citoplasma grande. La relación núcleo / citoplasma va disminuyendo conforme las capas son más superficiales y estrato superficial que presenta células grandes de contornos regulares y núcleos picnóticos. Este epitelio se reemplaza cada 4 a 5 días, es muy sensible a los estrógenos y progesterona y contiene glucógeno. En las mujeres posmenopáusicas es atrófico, con muy poco glucógeno y cambios celulares que se pueden confundir con una neoplasia intraepitelial ⁽⁴⁰⁾.

En el **estudio citológico** se pueden encontrar todos los tipos celulares descritos, las células basales y parabasales se aprecian fundamentalmente en frotis atróficos (niñas, posmenopáusia, puerperio), mientras que las células intermedias y superficiales se ven fundamentalmente en mujeres en edad reproductiva. En fase proliferativa tardía se verían abundantes células superficiales de citoplasma grande y núcleos picnóticos ⁽⁴⁰⁾.

E. Epitelio cilíndrico normal.

Se trata de un epitelio monoestratificado con células cilíndricas altas que revisten la superficie del conducto endocervical y todas sus formaciones glandulares.

En el **estudio citológico** normal, se aprecian células endocervicales en cantidad variable. Se muestran en grupos o empalizadas de células basófilas de núcleos uniformes y citoplasma vibrátil. Una muestra citológica satisfactoria debe mostrar células endocervicales o de la zona de transformación, que son más fáciles de recoger utilizando un microcepillo o “cytobrush”⁽⁴⁰⁾.

En el **estudio colposcópico** es de color rojo. Tras la aplicación de ácido acético, el color rojo palidece en distinto grado y se aprecian perfectamente las papilas en forma de granos de uva dispuestos sobre un mismo plano. Este efecto del ácido acético es transitorio y se reproduce tras nuevas aplicaciones pero de forma menos clara⁽⁴⁰⁾.

En el **estudio histológico** se muestra un estrato único de células altas con núcleo basal de forma ovalada. El citoplasma se halla ocupado por finas vacuolas de moco. Este epitelio presenta invaginaciones de dirección variable que constituyen las glándulas endocervicales en las que puede haber elementos de epitelio plano en su profundidad⁽⁴⁰⁾.

F. Zona de transformación normal.

Es una zona de alta actividad celular en la que asientan la mayoría de las lesiones preinvasoras e invasoras y es conveniente conocerla bien. En su definición, se trata de la porción del cérvix que originariamente tenía epitelio cilíndrico y ahora tiene epitelio escamoso. Los fenómenos de metaplasia escamosa ocurren continuamente y están influenciados por cambios hormonales locales y cambios en el pH vaginal. Cuando la transición entre epitelios es abrupta, se mostraría al colposcopio como una línea que tras la aplicación de ácido acético es ligeramente blanca y tras el lugol es ligeramente color pajizo (yodo débil)⁽⁴⁰⁾.

La frontera entre los hallazgos normales y los cambios menores no siempre está clara y un epitelio normal puede verse mediante el **estudio colposcópico** como anormal o viceversa. Si hay dudas hay que realizar biopsia siguiendo la clasificación de Barcelona donde se distinguen: ⁽⁴⁰⁾.

Zona de transformación tipo I. Se ve completamente y está situada en ectocervix.

Zona de transformación tipo II. Situada toda o en parte en endocervix pero visible completamente.

Zona de transformación tipo III. Está en canal cervical y no se ve en su totalidad

La sustitución del epitelio cilíndrico por el epitelio escamoso se puede mostrar al **estudio histológico** en distintas formas. Cuando la transición es brusca, se muestran ambos epitelios sin apenas cambios. Otras veces es posible ver hileras de células de reserva bajo el epitelio cilíndrico, glándulas abiertas y quistes de Naboth ⁽⁴⁰⁾.

En el **estudio citológico** se observan células metaplásicas con mayor o menor grado de madurez. Estas células tienen forma poligonal con extensiones externas fusiformes aracniformes, presentan núcleos redondeados y citoplasma con vacuolas. Es importante entender e identificar bien la transformación porque el cáncer de cérvix y las lesiones preinvasoras comienzan típicamente dentro de esta zona ⁽⁴⁰⁾.

2.15 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO.

2.15.1 Antecedentes de diagnóstico.

La evidencia que la infección por VPH es un precursor temprano de la neoplasia cervicouterina, determina que el diagnóstico de este virus deba incluirse como test de screening en la prevención del cáncer cervicouterino. De acuerdo a la conclusión de paneles de consenso de la Asociación Internacional de Registros de Cáncer (IARC) y la Organización mundial de la Salud (OMS) existe bastante justificación para evaluar la presencia de infección junto con el frotis de Papanicolaou en el screening de cáncer

cervicouterino. 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 cáncer cervicouterino ⁽⁴⁰⁾.

Aunque el VPH tiene tropismo específico por el epitelio escamoso, in vitro no es posible el aislamiento de virus en sistemas de cultivo a partir de muestras clínicas. Sin embargo las infecciones por VPH pueden ser diagnosticadas a través de los indicios clínicos, citológicos, histopatológicos y pruebas moleculares ^(3, 36).

Hasta hace poco el método de diagnóstico más ampliamente utilizado para la detección del VPH fue la **citología (Papanicolaou)**, en este método la presencia de coilocitos es el indicador clave de una infección por VPH. Según la edad del paciente y la localización de la infección, la sensibilidad del método varía entre 30 a 90% en manos de un patólogo experto, además que requiere de la biopsia para mejorarla sensibilidad del diagnóstico ^(3, 36).

El **diagnóstico histopatológico** es considerado como la mejor prueba para la detección y clasificación de las lesiones inducidas por VPH pero no proporciona una determinación del tipo de VPH involucrado ⁽³⁶⁾. Aunque los cambios morfológicos asociados con la infección por el virus son fácilmente reconocidos y relativamente característicos, las metodologías basadas en dichos cambios no permiten verificar la presencia en forma directa del virus, ni tampoco determinar el tipo de VPH presente en la lesión, esta información es de relevancia considerando que algunos tipos virales están estrechamente asociados con el desarrollo de condiciones malignas ⁽³⁶⁾.

La detección de anticuerpos contra las proteínas E6 y E7 ha sido de gran validez ya que la presencia de altos niveles de estos anticuerpos (anti-E6 y anti-E7) está asociada con la progresión a malignidad de la enfermedad debido a la gran producción de E6 y E7 por las células infectadas por VPH. Por esto, la utilización de proteínas recombinantes de estos antígenos y la producción de proteínas estructurales de la región L1 y L2 como partículas parecidas a virus (VLP) han sido utilizadas para pruebas serológicas tipo ELISA ⁽³⁶⁾. Sin

embargo las técnicas serológicas no han tenido el auge deseado debido a que la sensibilidad adecuada y el número de falsos negativos no está acorde con niveles de confiabilidad, debido principalmente al tipo de respuesta inmune de cada huésped o tipo de VPH involucrado⁽³⁶⁾.

De igual forma se ha aplicado la tinción de inmunoperoxidasa para la detección de la proteína L1 de VPH en aquellos extendidos celulares del cérvix con interpretación citológica compatible con lesiones intraepiteliales escamosas tanto de bajo grado como de alto grado. En estos estudios sólo se logró detectar la proteína L1 en menos del 50% de los casos, siendo significativamente baja y aun menor frecuencia en los tejidos infectados por los genotipos 16 y 18. Sin embargo, en casos de lesiones premalignas de bajo grado que regresan espontáneamente, el porcentaje de detección de L1 fue mayor (69%)^(36, 72).

2.12.2 Diagnóstico molecular de VPH.

Debido a los antecedentes y problemas metodológicos mencionados en acápite anterior el diagnóstico de la infección por VPH está basado fundamentalmente en la detección del ácido nucleico viral⁽⁷⁰⁾.

C. Diagnóstico molecular de VPH mediante PCR.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), actualmente es la única técnica que presenta mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de innumerables enfermedades genéticas, parasitarias, bacterianas y virales. En el caso de VPH, la PCR nos permite identificar el ADN de un solo tipo viral específico, con la utilización de iniciadores que se unen a secuencias específicas de éste o puede detectar un amplio espectro de tipos mediante iniciadores generales o consenso^(69, 70).

La detección y tipificación del VPH a través de técnicas de biología molecular están limitadas a un pequeño grupo de laboratorios de mayor complejidad por diversas razones, entre ellas de infraestructura y costo. Sin embargo la detección de VPH y su genotipificación contribuye al manejo médico más adecuado del paciente⁽⁷¹⁾. El ADN

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 a los 40 VPH que infectan el tracto anogenital en una sola reacción; presenta alta sensibilidad (10-40 copias virales) y especificidad (100%). Los iniciadores PCR (MY09/MY11) permiten identificar a los 40 tipos que infectan el tracto anogenital, PCR (GP5/GP6) permiten identificar a 37 tipos que infectan el tracto anogenital y los PCR (L1C1/L1C2) también permiten identificar a 37 tipos que infectan el tracto anogenital ⁽⁷¹⁾.

c) **Fundamento básico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es la síntesis "in vitro" de un gran número de copias a partir de un fragmento mínimo de ADN en particular, en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde ^(62, 63, 65, 66, 68).

El producto que se obtiene al finalizar la reacción es una gran cantidad de un fragmento del gen viral con alto grado de pureza ^(62, 63, 64, 65, 68).

La técnica se basa, en su forma más simple en la replicación del ADN por la enzima ADN polimerasa y la aplicación de reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte, cuarenta o más veces ^(63, 64, 65, 66). La actividad de la enzima ADN polimerasa es capaz de llevar a cabo la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5´a 3´ usando como molde una cadena sencilla ya existente, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers o cebadores) que son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3´ del fragmento de ADN que se desea amplificar y también la presencia de nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina) ^(62, 66, 68).

Partiendo de este principio, la Reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de cada ciclo formado por tres etapas: ^(62, 65).

1. Desnaturalización del ADN doble cadena.
2. Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.
3. Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa.

En la primera etapa (**desnaturalización**) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación a altas temperaturas (93 - 97°C). La renaturalización se produce cuando la temperatura disminuye ^(62, 63, 64).

En el segundo paso (**hibridación**), la temperatura se reduce aproximadamente entre 50 - 65°C, para permitir el "apareamiento" de cada una de dos cadenas cortas de iniciadores con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Los iniciadores son segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos iniciadores, deben ser complementarios del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde ^(62, 63, 64).

En tercer lugar (**elongación o polimerización**), una enzima ADN polimerasa extiende los iniciadores, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde en dirección 5' a 3'. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxidonucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquella a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo y así sucesivamente ^(62, 63, 64).

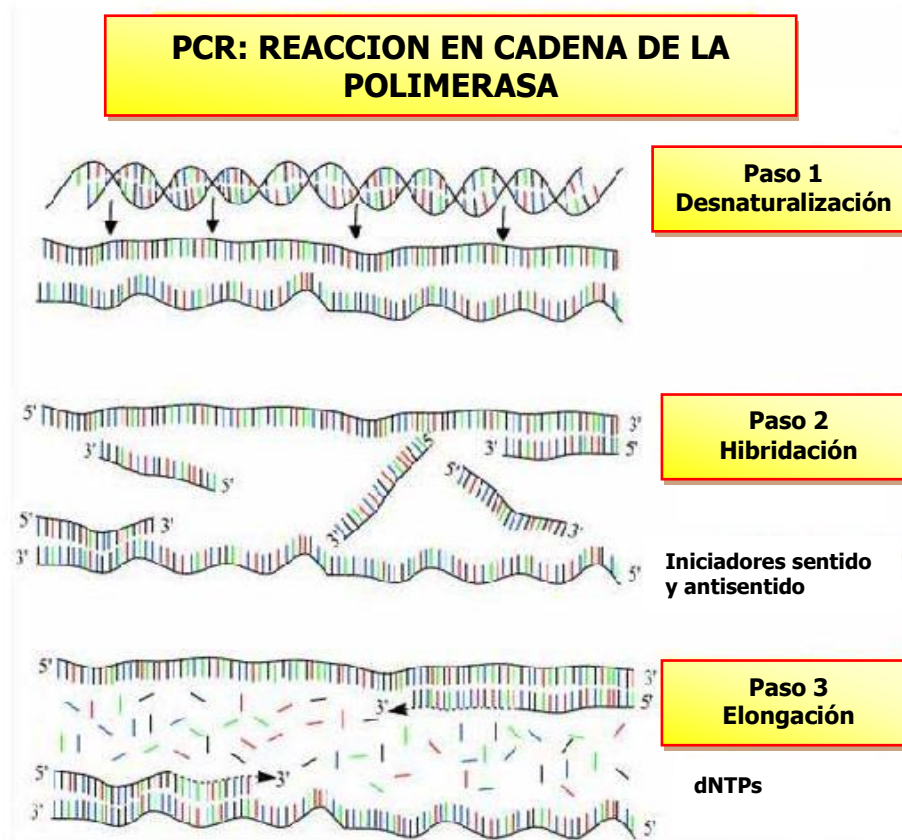


Figura 13: Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstracte 1999) ⁽⁶²⁾

Existen algunas etapas independientes a la secuencia de ciclos: una etapa que se lleva a cabo antes del primer paso de desnaturalización del primer ciclo que es la inicialización, otro después del paso de elongación del último ciclo llamado Elongación final y al final de todo una etapa denominada Conservación ⁽⁶³⁾.

La **inicialización** consiste en llevar la reacción al principio hasta una temperatura mayor a 90°C (dependiendo de la polimerasa utilizada), que se mantiene durante 1 a 10 minutos. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor ⁽⁶³⁾.

La **elongación final** es una etapa única 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 ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado ⁽⁶³⁾.

Finalmente la **conservación** es un paso se lleva a cabo entre 4 a 15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo ⁽⁶³⁾.

El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los iniciadores, una vez completado el primer ciclo, disponemos de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo tenemos 4, al final del tercero 8 si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, obtenemos una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión exponencial ⁽⁶²⁾.

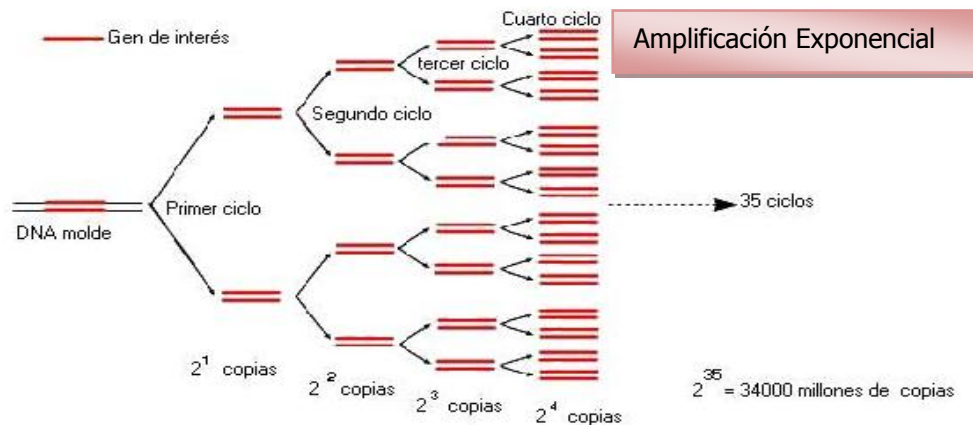


Figura 14: Amplificación exponencial del PCR (de Andy Vierstracte 2001) ⁽⁶²⁾

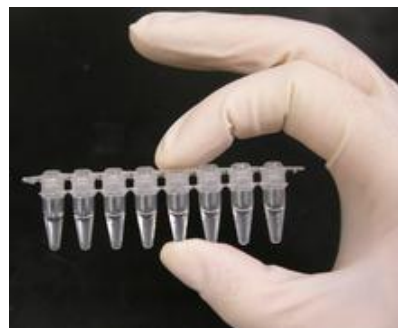


Figura 15: Tubos de PCR que albergan la mezcla en un volumen total de 100 μ L ⁽⁶³⁾

Para el ensayo básicamente se requieren los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTPs) como sustrato para polimerizar nuevo ADN; dos iniciadores complementarios a una de las dos hebras del ADN, estas secuencias cortas de entre seis y cuarenta nucleótidos o normalmente de 18 a 22 permiten que la polimerasa inicie la reacción y deben estar situados enfrentados delimitando la zona de ADN a amplificar, es decir corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar; por otro lado también se requiere iones divalentes, se suele usar magnesio (Mg^{2+}) agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$) que actúan como cofactor de la polimerasa; una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa; ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la polimerasa Taq), ADN molde que contiene la región de ADN que se va a amplificar y un termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo⁽⁶²⁾.



Figura16: Termociclador para reacciones de PCR⁽⁶³⁾

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su carga, longitud y a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes; en acrilamida para los más pequeños y también de forma más rápida y aplicable a la PCR asociada a marcaje fluorescente (PCR real time)^(63, 68).

d) Revelado por electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. A diferencia de las proteínas, las cuales pueden tener una carga positiva o negativa, los ácidos nucleicos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato. Por lo tanto, en una electroforesis, los ácidos nucleicos migrarán hacia el polo positivo, desde el polo negativo ⁽⁶⁷⁾.

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente pero que a altas temperaturas se torna líquida. Esta característica permite una fácil preparación de una matriz porosa para ser usada en electroforesis: simplemente se pesa la cantidad de agarosa requerida, se disuelve en un amortiguador adecuado, se calienta y se vacía sobre un molde particular. Una ventaja que posee la agarosa es que no es un compuesto tóxico y además permite el análisis de ácidos nucleicos con pesos moleculares muy variados ⁽⁶⁷⁾.

La concentración de agarosa típicamente utilizada para electroforesis está entre 0.5 % y el 2%. La concentración a usar se escoge según el tamaño del ácido nucleico a analizar. Esto porque la concentración de agarosa define el tamaño de los poros de la matriz, a mayor concentración, menor el tamaño de los poros y viceversa. Durante la electroforesis, los ácidos nucleicos lineales con un alto peso molecular migrarán al ánodo más lentamente que ácidos nucleicos lineales con un menor peso molecular. La razón de esto es que los ácidos nucleicos de alto peso tardan más tiempo en atravesar los poros de agarosa ^(52, 67).

Una electroforesis básicamente consiste de los siguientes pasos: ⁽⁶⁷⁾

- a) Preparación del gel de agarosa a la concentración requerida.
- b) Mezclar las muestras a analizar con un amortiguador adecuado y un colorante (azul de bromofenol) el cual indica el frente de corrida de la electroforesis.
- c) Montar las muestras en el gel.
- d) Realizar la corrida electroforética.
- e) Visualizar los ácidos nucleicos.

Para la visualización de los ácidos nucleicos se utiliza un colorante fluorescente, como el bromuro de etidio. Este colorante tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN y el ARN. Debido a esta propiedad es un agente mutagénico y debe manipularse con cuidado. El bromuro de etidio generalmente se incorpora a la agarosa antes de vaciado del gel, o puede incorporarse luego de la corrida electroforética. Actualmente existen a disposición el uso de colorantes fluorescentes no mutagénicos para remplazar el uso del bromuro de etidio ^(52, 67).

D. Diagnóstico de VPH mediante técnicas moleculares que no requieren amplificación génica.

c) Hibridación “in situ” fluorescente (FISH).

La hibridación in situ permite visualizar una secuencia de ADN o ARN justo en el sitio físico en el que se encuentra permitiendo analizar su distribución en células y tejidos. Es una técnica relativamente rápida y accesible a los laboratorios de diagnóstico. Existen equipos comerciales que emplean esta tecnología; el número límite de copias de ADN viral capaz de ser detectado es de alrededor de 10-100 copias por célula ⁽⁷¹⁾. Esta técnica, de la que han surgido diferentes variantes, se basa en la complementariedad de las bases que componen los ácidos nucleicos: G con C y A con T en el caso del ADN y G con C y A con U en el caso del ARN. Se diseña una sonda marcada con un fluorocromo que hibride con la secuencia a detectar es así que este sistema nos permite estudiar la distribución in situ de una determinada secuencia de interés. La detección se lleva a cabo marcando previamente la sonda a hibridar con la secuencia de interés con un fluorocromo. El siguiente paso es la hibridación de la secuencia marcada con las muestras problema, aplicándola directamente sobre células extendidas o tejidos. La detección de la fluorescencia emitida permite identificar la presencia de la secuencia y su localización exacta en la muestra ⁽⁷¹⁾.

d) Captura de híbridos (HC2).

Este método comercial fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA) en 1995. El ADN extraído de las células o tejido de la lesión es hibridado con dos mezclas de sondas correspondientes a los HPV de bajo riesgo (tipos 6, 11, 42, 43 y 44) y de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Presenta una buena sensibilidad (25-75 fg) y especificidad (>95%). Es sencillo y rápido para su realización, aunque su costo es elevado y exige disponer de un luminómetro. No tipifica, sólo indica si el virus que se detecta en la muestra es de alto o bajo riesgo oncogénico⁽⁷¹⁾.

2.13 TRATAMIENTO.

Por los conocimientos actuales sobre la historia natural de la neoplasia y papel etiológico del Virus del Papiloma Humano, el tratamiento debe limitarse generalmente pero no siempre a mujeres con displasia moderada y grave (LIE-AG), puesto que la mayoría de los casos de displasia leve no avanzan o se normalizan espontáneamente sin tratamiento, sin embargo es preciso vigilar a las mujeres con lesiones leves a intervalos apropiados⁽²⁶⁾.

El manejo de las lesiones depende de la extensión del cuadro, tiempo de evolución, forma clínica, el estado inmunológico y el deseo por parte del paciente de someterse a tratamiento. El objetivo del tratamiento es remover las lesiones clínicas presentes. Los conocimientos actuales permiten inferir que con los tratamientos disponibles se disminuye posiblemente la infectividad, pero sin certeza de su erradicación. La existencia de múltiples modalidades terapéuticas refleja la ausencia de un tratamiento antiviral eficaz⁽⁷¹⁾.

El tratamiento de casos de cáncer cervicouterino comprende medidas quirúrgicas junto con radioterapia y quimioterapia, las cuales tienen un costo elevado y con frecuencia provocan efectos psíquicos y fisiológicos que alteran de manera determinante la vida de las pacientes, es por ello que la prevención y detección oportuna de las lesiones premalignas

antes del desarrollo del cáncer es de vital importancia en la prevención de dicha patología⁽³⁾.

Una vez efectuado el diagnóstico por citología, colposcopia, histopatología dirigida por colposcopia y detección molecular de VPH, las opciones de manejo para lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG) varían ampliamente en el mundo, destaca la simple observación hasta terapias excisionales por medio de asa electroquirúrgica (destrucción por calor de los tejidos afectados)^(6, 15, 16, 26).

Las guías de manejo para lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG) están bien establecidas, se recomienda curetaje endocervical de no existir lesión visible en el ectocérvix. En toda paciente con LIE-AG confirmado por biopsia debe realizarse conización o electroconización (extirpación de porciones de tejido dañado en forma cónica del cuello uterino) o crioterapia (congelación de tejidos con bisturí frío) para excluir enfermedad invasora^(6, 15, 16, 26).

En mujeres con cáncer invasor, se requieren test adicionales para establecer la etapa de la enfermedad. El tratamiento depende primariamente de la extensión de la lesión y también de factores como la edad, el deseo de conservar la fertilidad y presencia de otras condiciones médicas^(6, 15, 16, 26).

Virtualmente todas las pacientes con etapa IA1 sin compromiso de espacios vasculares se curan con histerectomía tipo I, si existe deseo de preservación de fertilidad, por conización, si los márgenes están libres de enfermedad. El tratamiento recomendado para la etapa IA2 es la histerectomía radical tipo II con linfadenectomía pélvica. Como alternativa a la cirugía, las etapas IA se podrían tratar con radioterapia intracavitaria exclusiva. En los demás estadios iniciales (IB1 y IIA), los resultados terapéuticos son buenos con cirugía (histerectomía radical tipo III con linfadenectomía pélvica) y con radioterapia pélvica externa e intracavitaria, siendo la primera el tratamiento de elección en mujeres jóvenes, sin obesidad ni enfermedad grave asociada. Estudios recientes que incluyeron pacientes con cáncer cervicouterino localmente avanzado, etapas IB2-IVA, y pacientes con

enfermedad en etapa IB1 o IIA con linfonodos pélvicos metastásicos demostraron beneficios significativos en la supervivencia con el uso combinado de quimioterapia con cisplatino y radiación postcirugía primaria, con una reducción de la mortalidad de 30-50%. En base a estos estudios la recomendación actual es quimiorradioterapia en todos los casos en que exista indicación para usar radioterapia en el tratamiento del cáncer cervicouterino ^(6, 15, 16).

2.13.1 Nuevas opciones en la prevención del cáncer de cuello uterino.

El reconocimiento de que la infección por VPH es una de las causas centrales de la neoplasia cervicouterina ha creado nuevos frentes en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad. Mediante la prevención y control de la infección genital por VPH específicamente de genotipos de alto riesgo oncogénico se podría lograr la prevención primaria del cáncer cervicouterino. La prevención de la infección genital por VPH podría conseguirse tomando estrategias de promoción de la salud dirigidas a un cambio en el comportamiento sexual teniendo como blanco todas las ETS de significado en salud pública ^(3, 15).

Si bien la prevención primaria de la infección por VPH reduciría considerablemente los índices de mortalidad por cáncer cervical, prevenir su transmisión presenta más desafíos que la mayoría de las enfermedades de transmisión sexual. La infección por VPH, por lo general, es asintomática y fácilmente transmisible. El virus puede existir en gran parte en el área anogenital (incluyendo áreas que el preservativo masculino no cubre). Si bien existen estrategias para el tratamiento de las verrugas genitales ocasionadas por VPH, no existe terapia que elimine la infección ⁽¹³⁾.

Dentro de las ventajas que proporciona la detección oportuna de VPH es que se tiene la oportunidad de dar un seguimiento y/o tratamiento con lo que se busca disminuir la probabilidad de desarrollo de malignidad ⁽³⁾.

La vacunación contra VPH podría tener gran valor en los países en vías de desarrollo, donde ocurre cerca del 80% de los nuevos casos de cáncer cervicouterino y en los cuales la mortalidad por cáncer de cérvix es un verdadero problema de salud pública y donde los programas de screening o cribado con PAP han sido inefectivos por largo tiempo. Actualmente están en desarrollo dos principales tipos de vacunas: profilácticas para prevenir la infección por VPH y en consecuencia el desarrollo de lesiones anogenitales asociadas al virus y vacunas terapéuticas que tienen como finalidad inducir la regresión de lesiones precancerosas o la remisión de cáncer cervical avanzado ^(15, 33, 35).

C. Las vacunas profilácticas.

Las vacunas profilácticas contra los VPH oncogénicos generan una respuesta inmune efectiva humoral en la superficie de la mucosa genital, induciendo anticuerpos neutralizantes dirigidos contra los epítopes conformacionales de las proteínas de cápside viral, capaces de reconocer e inactivar a los VPH antes que el virus infecte las células epiteliales del huésped. Esta protección depende de la cantidad de anticuerpos producidos por el huésped, de su disponibilidad en el sitio de infección y de la duración de su presencia; sustancialmente se requiere mantener niveles altos de anticuerpos en la superficie de las mucosas por largos periodos de tiempo ^(14, 35, 39).

Si estas vacunas que generan protección contra la infección de VPH se aplicaran en las adolescentes antes de iniciar la actividad sexual, podrían prevenir el desarrollo del cáncer cervical en las siguientes décadas, el resultado exitoso tendría el potencial de salvar la vida de más de 200.000 mujeres en el mundo por año ⁽¹⁴⁾.

Una vacuna profiláctica ideal contra los VPH requiere varios atributos: como no provocar riesgos, ser económica en su producción y venta, aplicarse en una sola ocasión, que proteja por muchos años y que conlleve a una reducción significativa en la incidencia del cáncer cervical ^(14, 36).

Por la dificultad de replicar en grandes cantidades de VPH en el laboratorio, las vacunas profilácticas han sido diseñadas empleando subunidades virales (componentes virales purificados) más que utilizar virus vivos atenuados o inactivados ^(14, 36).

Las vacunas profilácticas están en fase muy avanzada de desarrollo presentan programas clínicos en los cuales no solo se ha demostrado su seguridad e inmunogenicidad sino también su eficacia para la prevención de infecciones persistentes y lesiones cervicales neoplásicas de bajo y alto grado ⁽³³⁾.

b) Las partículas similares al virus (*virus like particles* - VLP).

El desarrollo de vacunas frente al VPH se aceleró de forma importante cuando a principios de los años noventa se desarrolló la síntesis de las partículas semivirales o partículas similares al virus (VLP). El fundamento básico de la vacuna es que cuando las proteínas L1 son expuestas entre ellas, mediante expresión en cultivos de células procariotas o eucariotas (levaduras, células de insecto) tienen la característica de autoensamblarse, formando estructuras tridimensionales vacías que se han denominado VLP, estas partículas son similares a los viriones de VPH nativos; la única diferencia es la falta de material genético del virus. Las VLP purificadas se utilizan como antígenos y resultan ser altamente inmunogénicas ya que inducen una fuerte respuesta humoral con anticuerpos neutralizantes cuando son presentados al sistema inmunitario, al mismo tiempo por no contener material genético, no pueden causar infección en el huésped ^(14, 15, 33, 36, 39).

Diferentes ensayos clínicos en fases I, II y III demostraron que las VLP de L1 inducen títulos elevados de anticuerpos por lo menos 40 veces más altos que los encontrados en la infección natural; una aplicación bien tolerada y que generan una respuesta inmune humoral local y sistémica e incluso respuesta celular ⁽¹⁴⁾.

Actualmente existen dos vacunas profilácticas contra VPH basadas en las partículas similares al virus (VLP): la vacuna bivalente frente a los VPH 16 y 18 y la tetravalente frente a los tipos 6, 11, 16 y 18. La vacuna bivalente ha sido desarrollada por

GlaxoSmithKline Biologicals (Cervarix) y está compuesta por VLP de L1 de VPH 16 y de L1 de VPH 18 y se produce en *Baculovirus* como sustrato celular. La vacuna tetravalente ha sido desarrollada por Merck Research Laboratories (Gardasil) e incluye VLP de L1 de los VPH 6, 11, 16, 18 y el sistema de expresión que se utiliza es *Saccharomyces cerevisiae*^(33, 39).

D. Vacunas terapéuticas.

Estas vacunas tienen como objetivo eliminar una infección ya existente al intentar controlar el crecimiento de células transformadas e inducir la regresión de lesiones preexistentes a través de la generación de una respuesta inmunológica de tipo citotóxica en células T, dirigida hacia las células infectadas que expresan los antígenos virales E6 y E7; entre ellas se tiene vacunas basadas en péptidos, las basadas en proteínas, interferones^(35, 36).

S. JUSTIFICACION.

El cáncer cervical es una de las neoplasias más comunes que afecta los órganos reproductivos de la mujer. Mundialmente es el segundo cáncer más frecuente después del cáncer de mama y en Latinoamérica ocupa el primer lugar en incidencia ^(54, 61). En Bolivia el cáncer de cuello uterino representa realmente un grave problema de salud pública, tiene una de las tasas más altas de incidencia de 58.1 nuevos casos por cada 100,000 mujeres al año ^(9, 10, 21, 24). Según la IARC 2002 (Asociación Internacional de Registros de Cáncer 2002) las estimaciones de mortalidad por esta enfermedad obtenidas de la región de América Latina y el Caribe, muestran que las tasas más altas la presenta Haití, seguido de Nicaragua y Bolivia con más de 26 decesos por cada 100.000 mujeres al año ^(9, 10, 20, 21).

Se encuentra firmemente establecida la infección persistente por genotipos de alto riesgo oncogénico del Virus del Papiloma Humano (VPH) como prerequisite necesario y principal factor de riesgo asociado al desarrollo de cáncer cervical y de lesiones precancerosas ^(54, 57). Considerando que no todos los genotipos de VPH son oncogénicos ya que infecciones por genotipos como VPH-6, 11, 42 entre otros pueden llegar a producir simplemente infecciones asintomáticas sin importancia clínica; existen otros, principalmente el VPH-16, 18, 31, 33, 45 que pueden conducir a infecciones malignas. Esto nos motiva a buscar nuevas alternativas en el campo del diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad tomando en cuenta el estudio virológico.

Dada la indiscutible asociación de cáncer cervical con genotipos oncogénicos de VPH, disponer de un ensayo molecular para la detección de estos tipos virales contribuiría al diagnóstico precoz del cáncer cervicouterino. Por esto el presente trabajo plantea establecer el desarrollo de la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con revelado por electroforesis en gel de agarosa para la detección del Virus del Papiloma Humano (VPH-PCR) y tipificación de dos tipos virales de alto riesgo oncogénico de mayor incidencia (VPH-16 y VPH -18).

Por lo general la prevención del cáncer cervical se basa fundamentalmente en programas de tamizaje citológico y de tratamiento de lesiones; el uso de pruebas moleculares para la detección de genotipos de alto riesgo oncogénico de VPH permitirá contar con una importante alternativa en el diagnóstico precoz, control y prevención oportuna de este carcinoma.

T. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL.

- Desarrollar la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico del Virus del Papiloma Humano (VPH) y valorar su aplicación en muestras cervicales de cáncer cervicouterino y lesiones intraepiteliales precursoras.

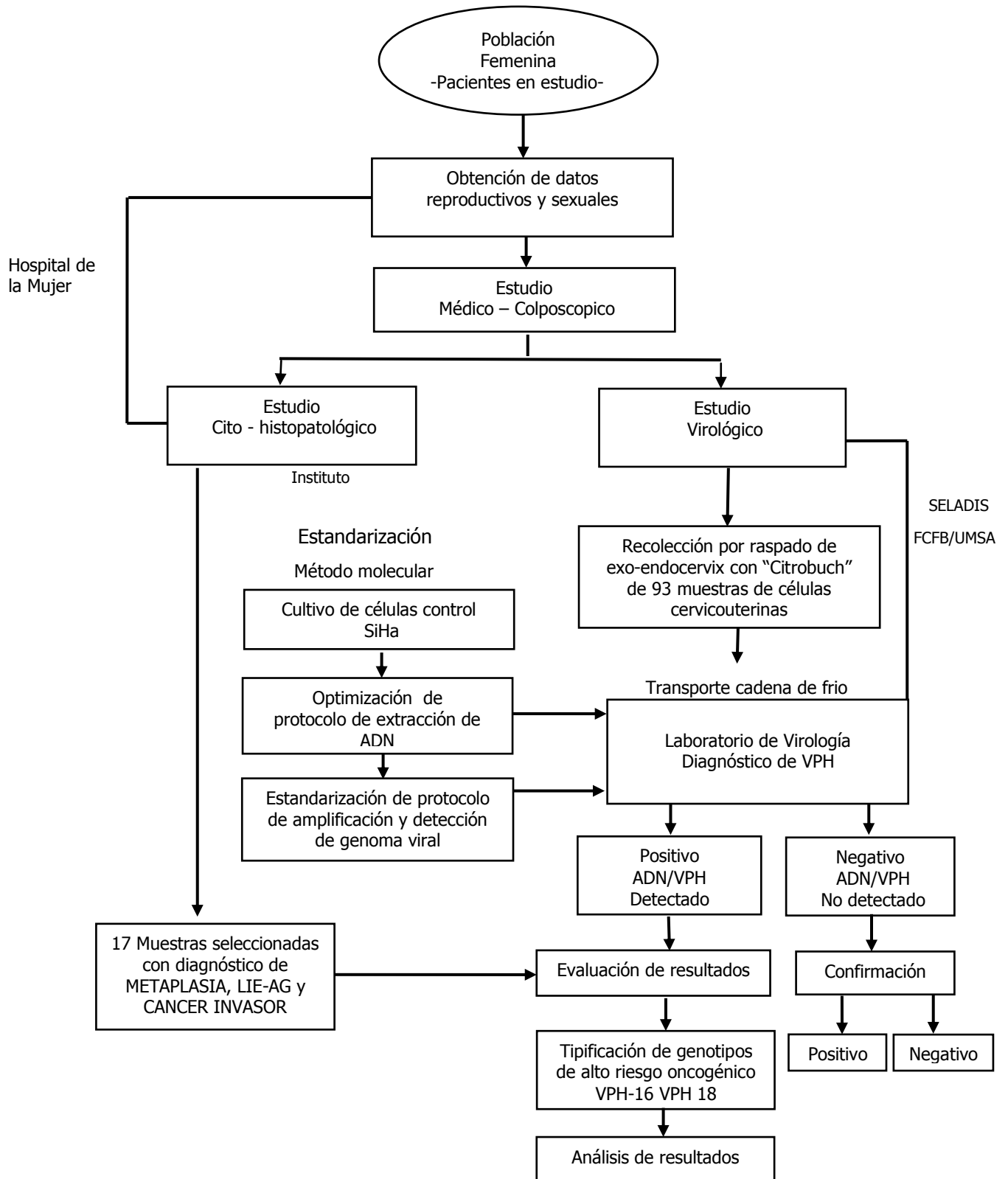
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Estandarizar y optimizar, los protocolos de extracción de genoma viral, a partir de células cervicales de cultivo y muestras biológicas.
- Implementar y estandarizar el proceso de amplificación de la región L1 de ADN del VPH mediante PCR y su posterior identificación mediante revelado por electroforesis en gel de agarosa utilizando como sustrato genético la línea celular SiHa.
- Optimizar la obtención y transporte de muestras de células cervicales recolectadas por cepillado de ecto y endocervix.
- Aplicar el ensayo PCR al diagnóstico de VPH en muestras biológicas cervicales incluidas en el estudio.
- Identificar la frecuencia de los genotipos de alto riesgo oncogénico de mayor incidencia VPH-16 y VPH-18, en muestras cervicales de metaplasia epidermoide, lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG) y cáncer invasor, mediante PCR y revelado por electroforesis en gel de agarosa.

- Evaluar los resultados obtenidos del diagnóstico molecular (genérico y tipificación) de VPH según diferentes datos reproductivos, sexuales y el diagnóstico citohistopatológico.

U. MATERIALES Y METODOS.

5.1 DISEÑO METODOLÓGICO.



5.2 TIPO DE ESTUDIO.

El trabajo tiene dos componentes:

- Primero, el estudio experimental de implementación y estandarización de los procedimientos moleculares.
- Segundo, el estudio diagnóstico en población de tipo descriptivo, de corte transversal y observacional.

5.3 POBLACIÓN EN ESTUDIO.

El estudio experimental fue desarrollado utilizando líneas celulares de origen cervical humano, consistentemente inyectadas con VPH.

El estudio descriptivo se llevó a cabo en población femenina de la unidad de colposcopia del Hospital de la Mujer de la ciudad de La Paz que voluntariamente acepto participar. La población fue seleccionada bajo criterios de inclusión y exclusión A y B (ver abajo). La edad promedio de las pacientes estudiadas fue de 38 años con un rango entre 16 y 60 años que iniciaron su actividad sexual. De todas las pacientes incluidas se obtuvieron datos reproductivos, sexuales y diagnóstico cito-histopatológico.

C. Criterios de inclusión.

- Pacientes con previo diagnóstico clínico de cervicitis, IVA+, procesos infecciosos o sospechosos que requieren de estudio colposcópico e histopatológico.
- Pacientes con previo diagnóstico citológico positivo a algún criterio fuera de lo normal o esperado que requiere confirmación por estudio colposcópico e histopatológico.

- Pacientes con diagnóstico histopatológico confirmado para algún proceso de malignidad o transformación sometidas a tratamiento.

D. Criterios de exclusión.

- Pacientes que no requieren de estudio colposcópico.
- Pacientes sin previa consulta externa.

5.4 MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Las muestras biológicas que se utilizaron fueron células epiteliales provenientes de epitelio escamoso, cilíndrico y de transición del cérvix uterino. Se trabajó con un total de 93 muestras de cepillado exo-endocervical. Las muestras se agruparon en base al diagnóstico cito – histopatológico aplicando el criterio de la nomenclatura Bethesda 2001.

5.5 DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE DE INVESTIGACIÓN.

El presente estudio se llevó a cabo en la unidad de Virología del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud “SELADIS” de la Universidad Mayor de San Andrés. El instituto está ubicado en la ciudad de La Paz, zona de Miraflores. Esta institución tiene la capacidad de prestar servicios clínicos y llevar a cabo investigaciones en diferentes áreas, siendo precisamente el área de Virología encargada de realizar pruebas serológicas, detección de antígenos virales, genoma viral y actividad replicativa, para el diagnóstico de diferentes procesos infecciosos principalmente de origen viral.

5.6 PREPARACIÓN Y CONTROL DE MEDIOS Y REACTIVOS BIOLÓGICOS.

Los medios y reactivos fueron preparados meticulosamente (PBS, Versene, MEM, soluciones de lisis) y según instrucciones de preparación. Los productos fueron

resuspendidos en agua destilada desionizada y esterilizados por filtración con membranas Millipore de 0,22 μm de diámetro de poro y algunos por autoclave. Para comprobar la esterilidad de los reactivos, alícuotas de los mismos fueron incubados entre 2 a 3 días para verificar crecimiento bacteriano o micótico. Por observación macroscópica y microscópica se evaluó la existencia de partículas extrañas, cambios de coloración y enturbamiento del medio por contaminación ⁽⁵¹⁾.

El control biológico fue realizado con todos los medios y reactivos preparados que iban estar en contacto con células. Para esto, alícuotas de los reactivos fueron puestos en contacto con suspensiones celulares. Las células fueron incubadas a 37 °C, saturación de humedad y 5% de CO₂ por diferentes tiempos (30, 60, 120 minutos) al cabo de los cuales se determinó la calidad de los reactivos preparados por el método de exclusión del colorante. Los resultados, en términos de porcentaje fueron comparados con la viabilidad celular inicial ⁽⁵¹⁾.

5.7 OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE CÉLULAS CERVICOUTERINAS RECOLECTADAS POR RASPADO DEL EXO Y ENDOCÉRVIX.

Las muestras celulares fueron obtenidas previo al estudio colposcópico, las células fueron tomadas directamente del cérvix por el médico ginecólogo.

El material citológico cervical fue recolectado mediante raspado del exo – endocérvix realizando movimiento rotatorio con el cepillo cónico *Cytobrush* ^(41,45, 79); posteriormente el cepillo fue introducido al tubo colector que contenía 2 mL de medio de transporte esencial mínimo (MEM) para que las células se resuspendan en el mismo ⁽⁴²⁾. Inmediatamente los especímenes fueron refrigerados y transportados al laboratorio de Virología, manteniendo la cadena de frío de 5 a 10 °C ^(41,42).

Las muestras se conservaron a 4 °C por no más de 72 horas ⁽⁴⁵⁾. Las células cervicales fueron sometidas a un recambio de medio celular ^(41,45), para lo cual cada muestra fue

centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 500 uL de medio. Seguidamente, la suspensión celular fue alícotada en dos partes: la primera fue destinada a la extracción de ADN^(43, 79) y la segunda fue congelada y almacenada a -195°C en nitrógeno líquido^(41,44) como parte de un banco de muestras. También se criconservaron las extracciones de genoma viral.

5.11 ESTUDIO EXPERIMENTAL.

5.11.1 Determinación del genoma de VPH: Estandarización de protocolos de extracción de genoma viral.

Se utilizaron linfocitos humanos para trabajar con estos en la evaluación de los diferentes métodos de extracción de ADN. Se obtuvieron células blancas a partir de una muestra de 5 mL de sangre total colectada con EDTA como anticoagulante. Para la separación de células se realizó una dilución 1 en 2 con PBS celular y medio LSM vol/vol. Las células fueron centrifugadas a 1000 rpm por 20 minutos y la interface celular fue separada con ayuda de una pipeta Pasteur. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS celular y el pellet celular fue resuspendido en 5 mL de medio MEM.

Una vez homogenizada la suspensión de células blancas, se tomó una alícuotade 20 uL, se realizó una dilución 1 en 2 de la misma con azul tripan (método de exclusión del colorante), se incubó la dilución 5 minutos a temperatura ambiente y se prosiguió a realizar el recuento celular en cámara de Neubauer. Para esto se cargó la cámara con 20 uL de la suspensión celular y se realizó el recuento de células en los cuatro cuadrantes destinados para el recuento de glóbulos blancos. Para el cálculo del número de células blancas por mL se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ células contadas} \times 2 \times 10^4}{4}$$

Luego del ajuste celular, el paquete de células fue dividido en cinco alíquotas a razón de 100.000 células/mL. Cada alíquota celular fue destinada para la evaluación de un protocolo de extracción de genoma viral.

C. Evaluación de protocolos de extracción de genoma viral (ADN-VPH).

Para la extracción del ADN genómico, cinco diferentes protocolos de extracción fueron evaluados al mismo tiempo, en las mismas condiciones y con muestras celulares a la misma concentración (células blancas 1×10^5 células/mL). Se consideraron procesos enzimáticos, shock térmico, con solventes orgánicos, entre otros (Tabla 5 y 6).

Protocolo 1		Protocolo 2	
<u>LISIS</u> Suspensión celular	1000 uL	<u>LISIS</u> Suspensión celular	1000 uL
Buffer de lisis.	200 uL buffer de lisis (Tris 10 mM, SDS 0,5 %, EDTA 20 mM)	Buffer de lisis.	225 uL buffer de lisis (Tris – HCL 10 mM, KCl 100 mM, MgCl2 2,5 mM Tween 20 0,5%, NONIDET 0,5%)
Incubación 37 °C	Toda la noche	Incubación 95°C	30 minutos
		Proteinasa K	225 uL de 2mg/mL
		Incubación 56 °C	Toda la noche
		Incubación 95°C	10 minutos
<u>EXTRACCIÓN</u>		<u>EXTRACCIÓN</u>	
Fenol/Cloroformo	Vol/Vol	Fenol/Cloroformo	Vol/Vol
Centrifugación	12000 rpm 10 minutos	Centrifugación	12000 rpm 10 minutos
Separación de la fase acuosa	Si	Separación de la fase acuosa	Si
<u>PURIFICACIÓN</u>		<u>PURIFICACIÓN</u>	
Etanol Absoluto	Volumen doble a la fase acuosa	Isopropanol	Volumen doble a la fase acuosa
Centrifugación	12000 rpm 20 minutos	Centrifugación	12000 rpm 20 minutos
Eliminar sobrenadante	Si	Eliminar sobrenadante	Si
Secado	Si	Secado	Si
Resuspender	100 uL de agua libre de nucleásas	Resuspender	100 uL de agua libre de nucleásas

Tabla 5: Procedimiento de extracción de genoma viral
(Protocolo 1 ^(46,59) y Protocolo 2 ⁽⁴¹⁾)

Protocolo 3		Protocolo 4		Protocolo 5	
<u>LISIS</u>		<u>LISIS</u>		<u>LISIS</u>	
Suspensión celular	1000 uL	Suspensión celular	1000 uL	Suspensión Cel	1000 uL
Proteinaza K	200 uL de 2 mg/mL	Incubación 95 °C	15 minutos	Incubación a 95°C	15 minutos
Incubación a 37 °C	15 minutos				
SDS 5 %	200 uL				
Incubación 56 °C	30 minutos				
<u>EXTRACCIÓN</u>		<u>EXTRACCIÓN</u>		<u>EXTRACCIÓN</u>	
Fenol/Cloroformo	Vol/Vol	Fenol/Cloroformo	Vol/Vol	Centrifugación	2000 rpm 5 minutos y desechar sobrenadante
Centrifugación	12000 rpm 10 minutos	Centrifugación	12000 rpm 5 minutos		
Separación de la fase acuosa	Si	Separación de fase acuosa	200 uL	Tris 50 mM	500 uL y centrifugar 12000 rpm 5 minutos
		Cloroformo	200 uL		
		Centrifugación	14000 rpm x 5 minutos	Eliminar sobrenadante	Si
		Separación de la fase acuosa	Si		
<u>PURIFICACIÓN</u>		<u>PURIFICACIÓN</u>		<u>PURIFICACIÓN</u>	
Etanol Absoluto	Volumen doble a la fase acuosa	Etanol Absoluto	200 uL + 10% de NaCl 6N	Cloroformo	100 uL
Centrifugación	12000 rpm 20 minutos	Centrifugación	14000 rpm 10 minutos	Centrifugación	14000 rpm 5 minutos
Eliminar sobrenadante	Si	Eliminar sobrenadante	Si	Separación de la fase acuosa	Si 100uL
Secado	Si	Secado			
Resuspender	100 uL de agua libre de nucleásas	Resuspender	Si 100 uL de agua libre de nucleásas		

Tabla 6: Procedimiento de extracción de genoma viral (Protocolo 3 ^(47,48), Protocolo 4 ⁽⁴⁹⁾ y Protocolo 5 ⁽⁴⁴⁾)

Los extractos de ADN obtenidos de cada protocolo de extracción fueron almacenados a -20 °C hasta la cuantificación y determinación de pureza de ácidos nucleicos.

D. Cuantificación y determinación de pureza de ácidos nucleicos.

c) Cuantificación y determinación de pureza por espectrofotometría.

La espectrofotometría es método aceptado internacionalmente para la cuantificación de ADN, está basado en la medición de la densidad óptica a 260 nm; en la que el ADN y ARN tienen la máxima absorbancia de luz. La espectrofotometría es un método rápido, no destructivo y se utiliza para determinar concentraciones menores a 2,5 ug/mL ^(52, 67).

Para determinar la pureza de ácidos nucleicos se calculó la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm. Las proteínas celulares pueden ser contaminantes del genoma e interfieren en la amplificación por esto se debe determinar la cantidad a 280 nm. La pureza del extracto se calcula por determinación de la relación entre 260 y 280 nm, se considera una pureza aceptable de 1,65 a 1,85; un valor menor a 1,65 refiere alta contaminación proteica y un valor mayor supone una contaminación con fenol, si este ha sido utilizado durante el proceso de extracción ⁽⁵²⁾.

Para evaluar ambos parámetros (concentración y pureza), de cada uno de los extractos de ADN obtenidos de los 5 protocolos de extracción, se preparó una dilución 1 en 10 de los ácidos nucleicos obtenidos, mezclando 20 uL de muestra con 180 uL de agua libre de nucleasas como diluyente. A continuación se efectuó la lectura de absorbancias utilizando como blanco agua libre de nucleasas en cubetas de cuarzo. Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm de longitud de onda y así se obtuvo la relación de pureza. La concentración de cada extracto fue obtenida tomando en cuenta que la absorbancia de una solución de ADN de 50 ug/mL es igual a 1,000 de absorbancia a 260 nm de longitud de onda ⁽⁵²⁾.

d) Cuantificación por corrida electroforética.

La mayor parte de las macromoléculas están cargadas eléctricamente, por lo que pueden movilizarse en un campo eléctrico, de acuerdo a su peso molecular y estructura. El sentido del movimiento en un campo eléctrico depende del signo de la carga de la molécula, pero la velocidad de desplazamiento es proporcional a la magnitud de carga total de la molécula, del potencial, la intensidad de corriente eléctrica y de la fuerza de fricción dependiente de la concentración del gel a utilizarse ⁽⁵²⁾.

El tipo de electroforesis más usado para la identificación de ácidos nucleicos se desarrolla en geles de agarosa. Este procedimiento permite separar moléculas de ADN de acuerdo a su peso molecular, influidos por la concentración de agarosa, intensidad de corriente eléctrica y la presencia de sales ⁽⁵²⁾.

El revelado puede conseguirse mediante la utilización de reactivos fluorescentes no mutagénicos que emiten fluorescencia por incidencia de luz ultravioleta a 300 nm de longitud de onda, esto permite la visualización de bandas de ADN por intercalación del fluorocromo con la molécula ⁽⁵²⁾.

En el laboratorio los extractos de ADN obtenidos de cada protocolo evaluado fueron cuantificados por corrida electroforética mediante la observación de presencia o ausencia de ácidos nucleicos durante el revelado. Para esto se realizó una dilución 1 en 2 de cada extracto mezclando 10 uL de muestra con 10 uL agua libre de nucleasas como diluyente. Se preparó el gel de agarosa al 1,2 % con tampón TBE 1X (Tris 446mM, Ácido Bórico 446mM y EDTA 10mM) como diluyente ⁽⁴⁴⁾; una vez gelificada la agarosa se procedió al cargado de los pozos, cada muestra fue cargada por duplicado (muestra pura y muestra diluida 1 en 2) los protocolos 4 y 5 solo fueron cargados con muestra pura, el volumen de muestra que se utilizó de cada extracto de ADN fue de 10 uL mezclado con 2 uL de tampón de cargado 6X (Glicerol 50%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,1%, Xylencianol 0,1% y ddH₂O). Para el revelado de ADN se utilizó el reactivo fluorescente EZ-Visión, en una dilución 1 en 6, es decir 2 uL del fluorocromo con 10 uL de la mezcla

de muestra con el tampón de cargado. La corrida electroforética se llevó a cabo a un voltaje de 150 Voltios, 350 mAmpereos por 20 minutos, con tampón de corrida TBE 1X, las bandas fueron visualizadas en un transiluminador con la incidencia de luz ultra violeta a 300 nm de longitud de onda.

La determinación de la cantidad aproximada de ADN presente en la muestra fue evaluada mediante observación directa de la intensidad de la señal que fue relacionada con parámetros cualitativos de leve o baja señal como (+), moderada señal como (++) y alta señal como (+++) o como ausencia de ADN en caso de no observar nada.

5.11.2 Determinación del genoma de VPH: Desarrollo del ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa con revelado por electroforesis en gel de agarosa para identificación de VPH.

La estandarización del ensayo de amplificación fue realizada utilizando cultivos de células de adenocarcinoma denominados SiHa. Las células fueron establecidas a partir de un carcinoma uterino humano y en cultivo presenta una morfología celular epitelial ⁽⁵⁰⁾. Esta línea celular SiHa tiene incorporado en su genoma 1 copia del genoma de VPH-16 por cada célula y por esto también puede considerarse como control positivo de infección por VPH ⁽⁵⁰⁾.

En el laboratorio las células fueron cultivadas de modo rutinario en medio MEM al 5% a 37°C, saturación de humedad y 5% de CO₂ (condiciones de laboratorio). Las células se cultivaron, hasta alcanzar una confluencia celular del 80 – 90%, momento en el que se observan células en monocapa y en crecimiento exponencial. Una vez alcanzada esta confluencia, fueron versenizadas para desprender las células del soporte en el que se encontraban. Las células fueron transferidas a un tubo de centrífuga y concentradas mediante centrifugación. El sobrenadante fue desechado y el pellet fue resuspendido con medio MEM ⁽⁵¹⁾.

Como control negativo se utilizó células blancas humanas, obtenidas mediante separación con LSM a partir de sangre total bajo procedimiento descrito anteriormente.

Tanto la línea celular SiHa (control positivo) como las células blancas humanas (control negativo), fueron sometidas a la extracción de ADN, mediante el protocolo de extracción evaluado y optimizado en una primera instancia.

E. Iniciadores consenso MY09/MY11.

Los iniciadores utilizados en este estudio para la detección de genoma de VPH fueron MY09 y MY11. Estos iniciadores permiten la amplificación de un fragmento de ADN viral de 450 pb que está presente en el gen de expresión tardía L1 en una región conservada en todos los VPH ^(44, 46, 47, 59, 61, 73, 76, 77, 81, 83).

Secuencia de los iniciadores: ^(44, 46, 47)

MY09: 5' – CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC – 3'

MY11: 5' – GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG – 3'

Dónde:

M = A o C R = A o G

W = A o T Y = C o T

F. Establecimiento del proceso de amplificación.

Para esta fase se utilizó un protocolo de amplificación propuesto por varios estudios con algunas modificaciones. La mezcla de reacción (mix PCR) fue de un volumen de 50 uL por cada tubo, los reactivos que componen la mezcla se describen en la tabla 7.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN DE USO	VOLUMEN DE USO/TUBO
Tampón de PCR (Buffer PCR Green)	5X	1X	10uL
Iniciadores MY09	91,4 X10 ³ picomolar	20 picomolar	0,5 uL
Iniciadores MY11	63,3 X10 ³ picomolar	20 picomolar	0,5 uL
dNTP's	100 mM	10 mM	1 uL
Go Taq Polimerasa	5 U/uL	2,5 U/uL	0,5 uL
MgCl₂	7,5 mM	1,5 mM	contenido en tampón PCR
H₂O Libre de Nucleásas	-----	-----	22,5 uL
Muestra de ADN	-----	-----	15 uL

Tabla 7: Protocolo de la fase de pre amplificación (mix PCR)^(46, 47, 61)

Se utilizaron 15 µL (2, 49 ug) y 5 µL (0, 83 ug) de la muestra de ADN del control positivo, en esta última concentración se completó el volumen final de mezcla con 10 uL más de H₂O libre de nucleasas, para el control negativo también se utilizó 15 uL de muestra de ADN. Se adicionó a todos los tubos PCR 30 uL de aceite mineral para evitar evaporización de la mezcla durante la amplificación en el termociclador.

La reacción se sometió a amplificación por triplicado utilizando un termociclador marca *BIORAD* poniéndose a prueba tres diferentes programas de ciclado (Tabla8).

Termociclador: BIORAD								
PROGRAMA 1			PROGRAMA 2			PROGRAMA 3		
Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	9 min	1	94 °C	9 min	1	94 °C	9 min
35	94 °C	1 min	40	94 °C	30 seg	45	94 °C	30 seg
	52 °C	90 seg		45 °C	1 min		55 °C	1 min
	72 °C	2 min		72 °C	1 min		72 °C	90 seg
1	72 °C	10 min	1	72 °C	10 min	1	72 °C	10 min
	4 °C	∞		4 °C	∞		4 °C	∞

Tabla 8: Programas de amplificación
Programa 1⁽⁴¹⁾, Programa 2⁽⁴⁷⁾, Programa 3⁽⁸³⁾

Una vez concluida cada amplificación los amplicones fueron almacenados a 4 °C hasta el momento del revelado.

G. Revelado por electroforesis en gel de agarosa.

El producto de amplificación esperado corresponde a un fragmento de 450 pb, este requiere un gel de agarosa al 1,2% preparado con tampón TBE 1X como diluyente⁽⁴⁴⁾, una vez gelificada la agarosa se procedió al cargado de los pozos con 20 uL de los productos amplificados obtenidos por PCR de los controles positivos y negativos. Para el revelado de ADN se utilizó el reactivo fluorescente EZ-Visión, en una dilución 1 en 6, es decir 4 uL

del fluorocromo con 20 uL de los amplicones. La corrida electroforética se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente.

H. Interpretación de resultados.

Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera: (Tabla 9)

Control	Presencia de banda específica de 450 pb	Interpretación
ADN-Células blancas (C-)	No	Resultado Validado
ADN/VPH-16 Células SiHa (C+) 15 uL = 2, 49 ug	Si	Resultado Validado
ADN/VPH-16 Células SiHa (C+) 5 uL = 0, 83 ug	Si	Resultado Validado

Tabla 9: Validación de controles VPH – PCR

5.11.3 Genotipificación de VPH–16 y VPH–18 mediante PCR.

Las muestras sometidas a tipificación de oncovirus incluyeron aquellas que fueron positivas para VPH y para esto se utilizó set comercial **VPH16/18** (SACACE *Biotechnologies* 44 Scalabrini str, 22100, Italia) para lo cual se siguió las instrucciones del fabricante.

Se prepararon la cantidad apropiada de tubos para las muestras incluyendo uno para el control Negativo de amplificación y otro para el control Positivo de amplificación. Se

adicionó a cada tubo 10 uL de Mezcla PCR 2 y 20 uL de aceite mineral. Luego se adicionó al tubo correspondiente 10 uL de ADN de cada una de las muestras. De igual forma se adicionó 10 uL de ADN Buffer (C-) al tubo para el control negativo y 10 uL de ADN VPH16/18 (C+) al tubo del control positivo. Los tubos fueron amplificados según programa de amplificación especificado por el fabricante (Tabla 10).

Termociclador: BIORAD			
Paso	Temperatura	Tiempos	Ciclos
1	95 °C	Pausa	
2	95 °C	5 min	1
3	95 °C	1 min	42
	65 °C	1 min	
	72 °C	1 min	
4	72 °C	1 min	1
5	4 °C	Conservación	

Tabla 10: Programa de amplificación VPH16/18

B. Revelado por electroforesis en gel de agarosa.

Los productos esperados corresponden a una banda de ADN de 425 pb para VPH-18 y una banda de 325 pb para VPH-16. El revelado se realizó con un gel de agarosa al 1,2% preparado con tampón TBE 1X como diluyente ⁽⁴⁴⁾, una vez gelificada la agarosa se procedió al cargado de los pozos con 15 uL de los productos amplificados tanto de muestras, controles positivos y negativos. Para el revelado de ADN se utilizó el reactivo fluorescente EZ-Visión, en una dilución 1 en 6, es decir 3 uL del fluorocromo con 15 uL de los amplicones. La corrida electroforética fue desarrollada bajo condiciones descritas en acápite anterior.

B. Interpretación de los resultados.

Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera: (Tabla 11)

Control	Banda específica de 425 pb	Banda específica de 325 pb	Interpretación
ADN-Buffer (C-)	No	No	Resultado Validado
ADN VPH-16 (C+)	No	Si	Resultado Validado
ADN VPAH-18 (C+)	Si	No	Resultado Validado

Tabla 11: Validación de controles PCR VPH16/18

5.12 ESTUDIO DIAGNÓSTICO.

Las 93 muestras en estudio fueron sometidas a la detección de genoma viral del Virus de Papiloma Humano (ADN/VPH). En una primera instancia las muestras fueron sometidas a la extracción de ADN utilizando el protocolo de extracción optimizado, posteriormente los extractos de ADN se sometieron al proceso de amplificación del genoma y finalmente a la tipificación de los genotipos VPH 16 y 18.

Los resultados obtenidos del diagnóstico molecular de VPH se evaluaron según diferentes datos reproductivos, sexuales y diagnóstico cito-histopatológico. A su vez la tipificación de VPH-16 y VPH-18 se correlacionó con el diagnóstico cito-histopatológico de las pacientes.

5.13 ANALISIS ESTADISTICO.

El análisis descriptivo de distribución de la frecuencia de VPH en función a las diferentes variantes estudiadas se estableció a través de frecuencias porcentuales, debido a que las variables son cualitativas y su nivel de medición es nominal u ordinal. Para evaluar si dos proporciones diferían entre sí de manera significativa estadísticamente, se aplicó la prueba

de **Distancia Tipificada o Reducida (ϵ)**, siendo el nivel de confianza elegido 95% y riesgo del 5%, es decir valores de ϵ mayores a 1, 96 fueron considerados como estadísticamente significativos. Para la evaluación de más de dos proporciones se aplicó la prueba estadística de **Chi Cuadrado** de igual manera con un nivel de confianza del 95% y riesgo de 5%, donde sí se determinaba $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

V. RESULTADOS.

6.1 ESTUDIO EXPERIMENTAL:

6.1.1 Evaluación de protocolos de extracción de genoma viral mediante espectrofotometría.

Se evaluaron cinco protocolos de extracción, en las mismas condiciones al mismo tiempo y con muestras idénticas (células blancas a la misma concentración). Seguido a la obtención de las células, la concentración utilizada en la evaluación por cada protocolo fue de: 1×10^5 células/mL. Los resultados de la evaluación de los protocolos de extracción se midieron en referencia a los valores de la relación de absorbancia o densidad óptica (DO) a 260/280 nm para determinar la pureza de los extractos de ADN y la cantidad de ADN obtenida se determinó mediante el valor de referencia: 50 ug/mL equivalente a 1.00 de absorbancia a 260nm de longitud de onda (tabla 12).

MUESTRA EVALUADA POR CADA PROTOCOLO: Células blancas totales $1,26 \times 10^5$ células/mL					
Protocolo Absorbancia	PROTOCOLO 1	PROTOCOLO 2	PROTOCOLO 3	PROTOCOLO 4	PROTOCOLO 5
DO 260	0,780	0,510	0,550	0,190	0,032
DO 280	0,450	0,300	0,430	0,170	0,030
DO 260/280	1,73	1,70	1,27	1,11	1,06
Cantidad ug/mL	39	25,5	27,5	9,5	1,6

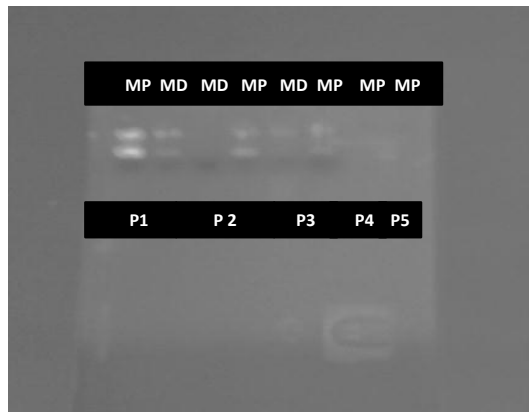
Tabla 12: Valores de relación de densidad óptica 260/280 nm y valores de cantidad (ug/mL) de ácidos nucleicos obtenidos de los cinco protocolos de extracción.

La determinación de la pureza de los extraídos de ADN obtenidos de cada protocolo de extracción se determinaron evaluando la relación de absorbancia de ácidos nucleicos a 260/280 nm de longitud de onda. Tomando en cuenta que la relación aceptable como óptima está entre 1,65 a 1,85, se determinó mediante los resultados obtenidos, que de los cinco protocolos evaluados, solo con los protocolos 1 y 2 se obtuvo una relación de absorbancia dentro del rango esperado (1,73 del protocolo 1 y 1,70 del protocolo 2). Los protocolos 3, 4 y 5 mostraron resultados por debajo del límite inferior de lo esperado, lo cual supone alta contaminación por proteínas.

Los protocolos con los que se obtuvo mayor cantidad de ADN fueron el número 1 con 39 ug/mL y el protocolo 3 con 27,5 ug/mL de ADN extraído, de acuerdo con esto para los siguientes estudios se utilizó el protocolo número 1.

6.1.2 Evaluación de protocolos de extracción de genoma viral mediante corrida electroforética en gel de agarosa.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los extractos de ADN de cada protocolo se muestran en la figura 17.



MP= Muestra pura; MD= Muestra diluida 1/2; P1= Protocolo 1; P2= Protocolo 2; P3= Protocolo 3;
P4= Protocolo 4; P5= Protocolo 5.

Figura 17: Corrida electroforética en gel de agarosa de los extractos de ADN obtenidos de cada protocolo de extracción evaluado.

La cantidad aproximada de ADN en cada extracto fue evaluada mediante observación directa en base a parámetros cualitativos de leve o baja cantidad como (+), moderada cantidad como (++), alta cantidad como (+++) o como ausencia de ADN en caso de no observarse nada. Se ha podido evidenciar que la cantidad de ADN obtenida por el protocolo 1 corresponde a (+++) tanto en muestra pura como en diluida; la cantidad de ADN obtenida por el protocolo 2 a (+) en muestra pura y en muestra diluida no se observó presencia de ADN; la cantidad de ADN obtenida por el protocolo 3 corresponde a (++) en muestra pura y diluida, los resultados obtenidos de los protocolos 4 y 5 evidencian resultados de ausencia de ADN al no observarse nada.

Los resultados de cuantificación de ADN tanto por espectrofotometría como por corrida electroforética, muestran que el protocolo 1 de extracción, fue el que mejores resultados permitió obtener o contrariamente los protocolos 4 y 5 fueron los menos eficientes, donde la cuantificación por espectrofotometría mostró bajas cantidades de ADN a diferencia de

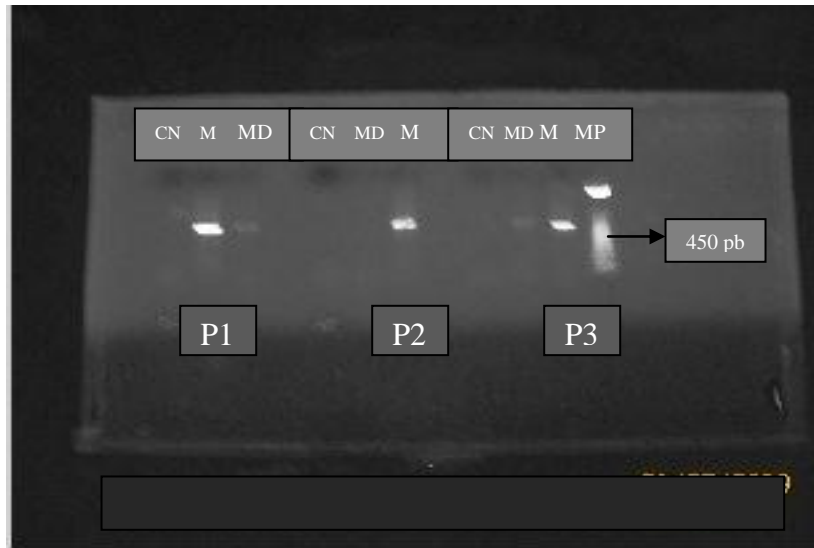
los demás protocolos y la evaluación de estos protocolos por corrida electroforética mostró ausencia de ADN.

En cuanto a los resultados del nivel de pureza de los extractos, que es el parámetro más importante para que una muestra de ADN sea óptima para ser sometida a un proceso de PCR; se ha podido evidenciar que solo los protocolos 1 y 2 mostraron un nivel de pureza dentro del rango aceptable.

De este modo se determinó que de los 5 protocolos evaluados el número 1, fue el que mostró mejores resultados tanto en cantidad y grado de pureza de ADN, por lo que fue el protocolo de elección para la aplicación en todas las muestras en estudio.

6.1.3 Valoración del proceso de amplificación del genoma viral para la identificación de VPH.

Los iniciadores utilizados MY09/MY11 permitieron obtener un fragmento de ADN viral de 450 pb del gen de expresión tardía L1 del genoma de VPH después del proceso de amplificación. Como se esperaba el control negativo (ADN/células blancas) no replicó, mientras que el control positivo (ADN/células SiHa) permitió validar el resultado utilizando diferentes concentraciones: 5 μ L (0, 83 ug) y 15 μ L (2, 49 ug). Este protocolo fue probado por triplicado bajo 3 diferentes programas de ciclado en el equipo de termociclador. Estos programas diferían en número de ciclos, temperaturas y tiempos. Los resultados obtenidos para la identificación del genoma de VPH mediante revelado por corrida electroforética en gel de agarosa se muestran en la figura 18.



CN = Control Negativo; M= Muestra 15 μ L (2, 49 ug); MD= Muestra diluida 5 μ L (0, 83 ug); P1= Programa 1; P2= Programa 2; P3= Programa 3; MP=Marcador de peso molecular.

Figura 18: Desarrollo de VPH – PCR mediante revelado por electroforesis en gel de agarosa de bandas de 450 pb correspondiente al fragmento amplificado del genoma viral.

Los protocolos de amplificación fueron evaluados por revelado en gel de agarosa. El protocolo de amplificación probado por triplicado con 3 programas de ciclado permitió la identificación del fragmento de 450 pb del VPH en el control positivo; sin evidencia de banda de amplificación en el control negativo. De acuerdo con los resultados fueron validados en función a la interpretación esperada.

Como se esperaba a la mayor concentración del control positivo se observó presencia de la banda de 450 pb en los 3 ensayos estudiados mientras que a la menor concentración con el programa 2 de amplificación no se evidencio presencia de la banda de VPH.

De acuerdo con esto, el programa de ciclado número 1 permitió obtener amplicones de 450 pb, en las dos concentraciones del control positivo evaluados y con mayor intensidad de las mismas. Es así que el ensayo de PCR desarrollado fue establecido con el programa de ciclado 1 para la amplificación.

6.3 ESTUDIO DIAGNOSTICO

6.2.1 Población en estudio.

El estudio contó con 93 casos de los cuales: 21 presentaban diagnóstico cito-histopatológico de normalidad, 47 presentaban diagnóstico cito-histopatológico de lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIE-BG o L-SIL), 20 de alto grado (LIE-AG o H-SIL) y 5 de cáncer invasor (Tabla 13).

DIAGNOSTICO CITO – HISTOPATOLOGICO	Nº DE CASOS
Negativo para lesión intraepitelial o malignidad: Tejido normal, inflamación crónica, cervicitis crónica y metaplasia epidermoide.	21
Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIE-BG o L-SIL)	47
Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE-AG o H-SIL)	20
Cáncer invasor	5
TOTAL	93

Tabla 13: Número de casos en estudio clasificados según diagnóstico cito-histopatológico

6.2.2 Diagnóstico de infección por VPH en las muestras en estudio.

Las 93 muestras cervicales en estudio fueron sometidas al diagnóstico de infección por VPH, utilizando la técnica PCR establecida, bajo el protocolo de extracción y amplificación desarrollado.

Los resultados obtenidos del diagnóstico de infección por VPH, muestran que de 93 muestras en estudio, los casos positivos a la detección de genoma viral (ADN/VPH) fue de 49% (n=46) y el 51% (n=47) de muestras negativas a la detección de genoma viral (figura 19).

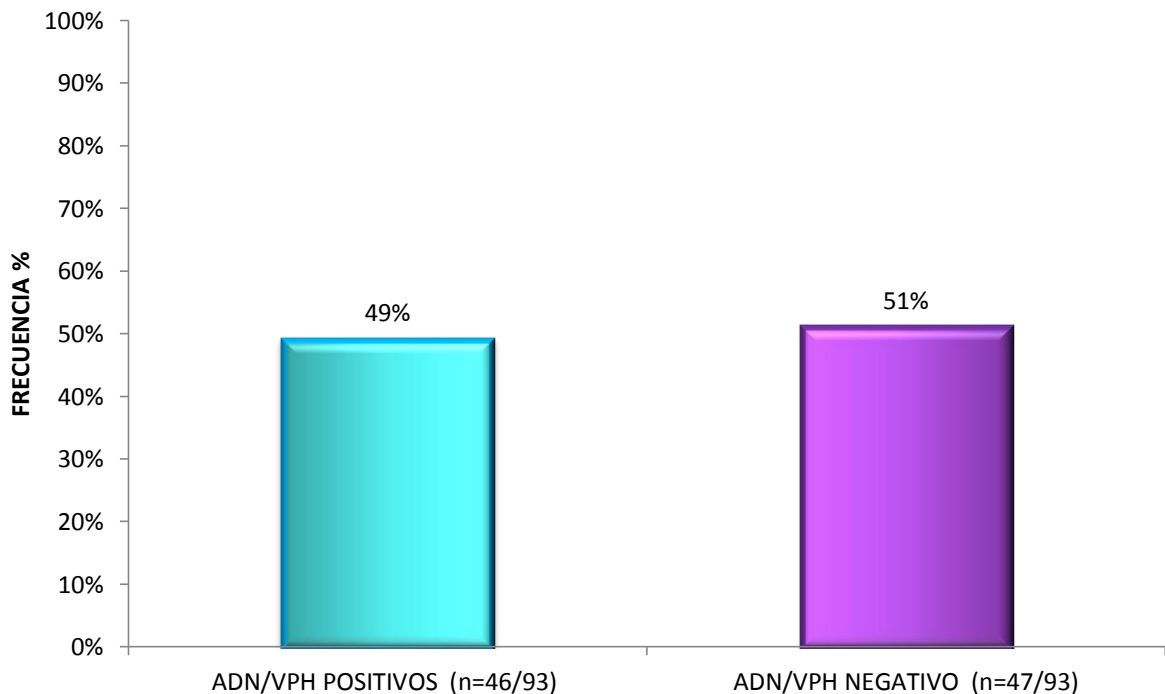


Figura 19: Frecuencia porcentual de infección por VPH. Muestras cervicales fueron sometidas a PCR para la identificación de ADN de VPH utilizando iniciadores de consenso. Se muestra que el 49% (n=46) de las muestras son positivas a la detección molecular de ADN viral.

6.2.3 Presencia de infección por VPH en relación al número de parejas sexuales.

De las 93 muestras analizadas 46 fueron positivas a la detección de ADN/VPH. De estas 8 corresponden a pacientes que solo tuvieron 1 pareja sexual durante su vida, 23 que tuvieron más de 1 pareja sexual y 15 que no dieron ningún dato de referencia. Se puede observar una mayor frecuencia porcentual de casos positivos de infección por VPH en el grupo de pacientes que tuvieron más de 1 parejas sexual. (Figura 20).

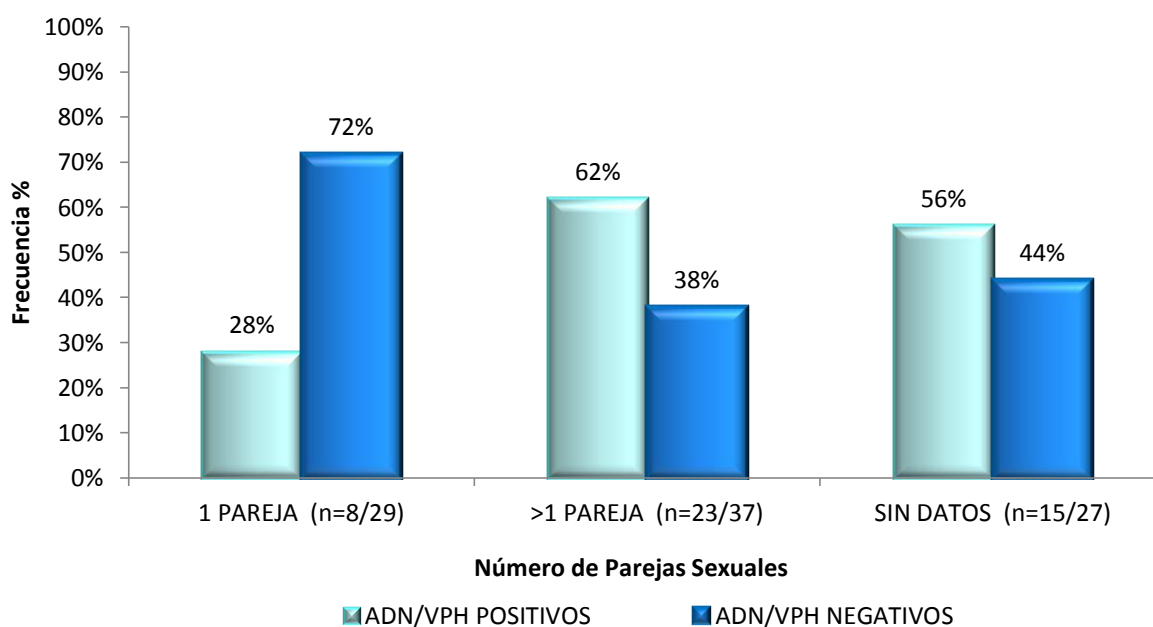


Figura 20: Frecuencia porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH según número de parejas sexuales de las pacientes en estudio. Se muestra más casos positivos de infección en pacientes con más de 1 pareja sexual.

La distribución de frecuencia de infección por VPH entre el primer grupo (1 pareja) y segundo grupo (más de 1 pareja) fue significativamente diferente con un valor de $\chi^2 = 2,74 > 1,96$.

6.2.4 Presencia de infección por VPH según número de partos.

De las 93 muestras analizadas 46 fueron positivas a la detección de ADN/VPH. De estas 2 corresponden al grupo de pacientes que no tuvieron ningún parto (nulíparas), 39 a pacientes que tuvieron 1 o más partos (primíparas, secundíparas, multíparas y gran multíparas) y 5 casos a pacientes que no dieron ningún dato de referencia. Se puede observar un incremento del porcentaje de casos positivos de infección por VPH en grupo de pacientes que tuvieron partos. (Figura 21).

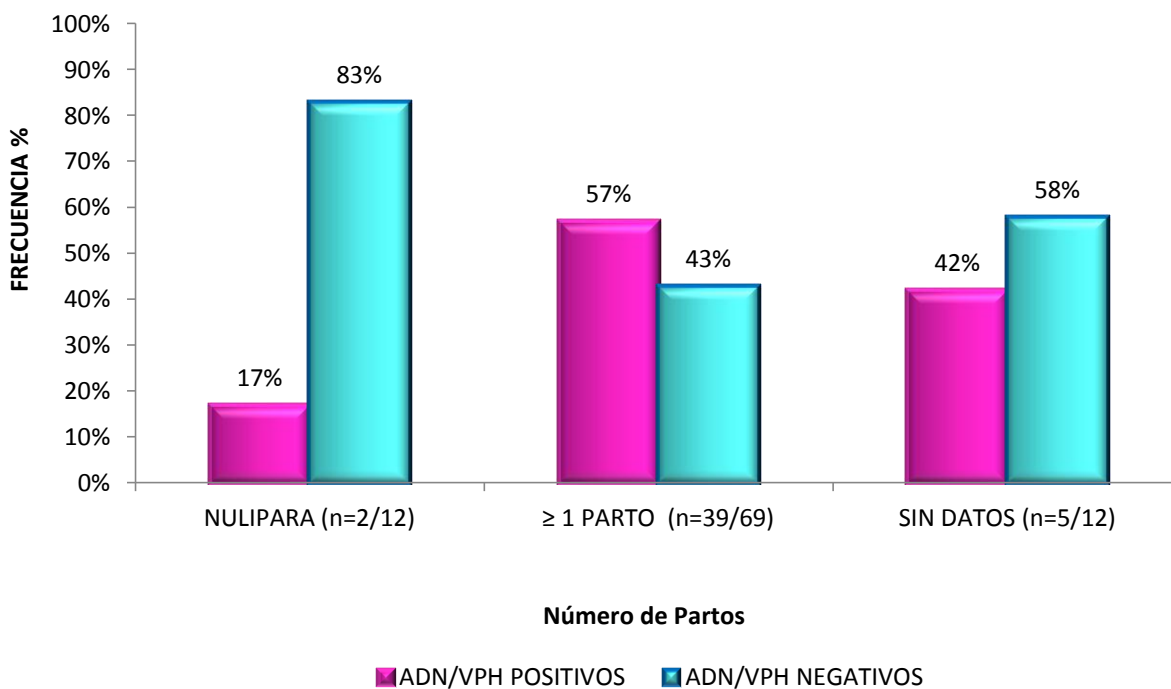


Figura 21: Frecuencia porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH según número de partos de las pacientes en estudio.

La distribución de frecuencia de infección por VPH entre el primer grupo (0 partos) y segundo grupo (1 o más partos) fue significativamente diferentes con un valor de $\chi = 2,55 > 1,96$.

6.2.5 Infección por VPH según presencia de abortos.

De las 46muestras positivas a la detección de ADN/VPH; 19 corresponden al grupo de pacientes que no tuvieron ningún aborto, 22 casos a pacientes que tuvieron algún aborto y 5 casos que no dieron ningún dato de referencia, se puede evidenciar una relativa mayor frecuencia porcentual de casos positivos en el grupo de pacientes que tuvieron abortos. (Figura 22).

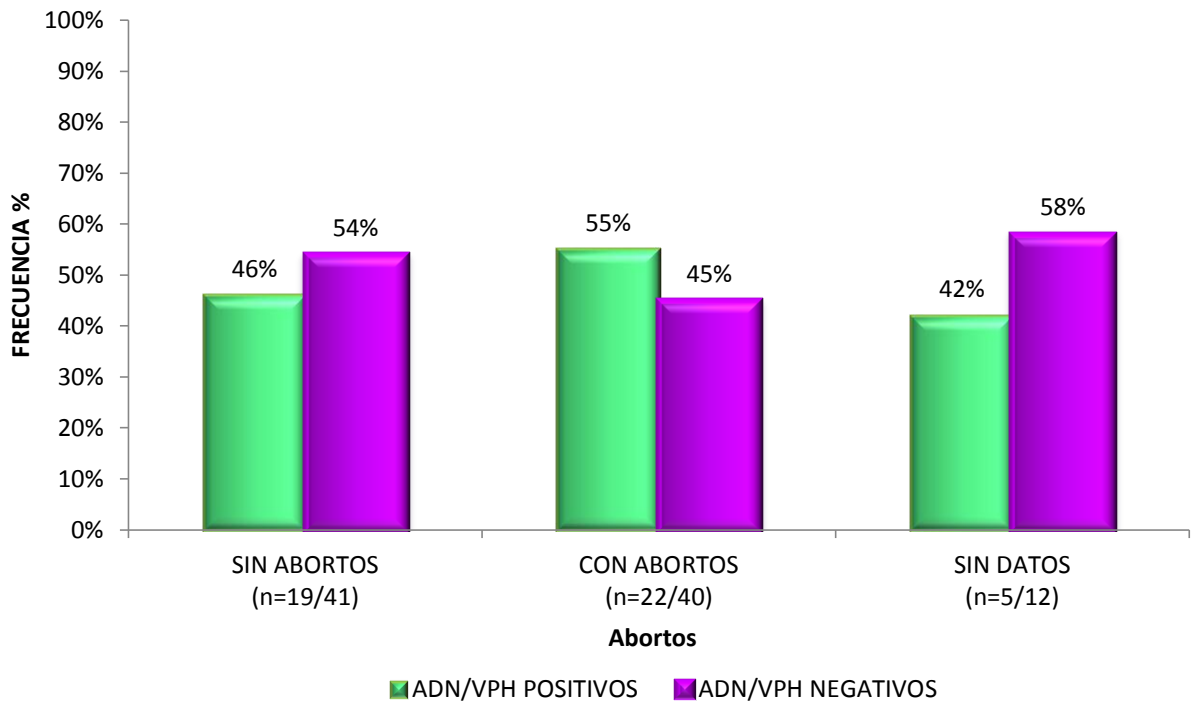


Figura 22: Frecuencia porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH según presencia de abortos de las pacientes en estudio.

La distribución de frecuencia de infección por VPH entre el primer grupo (sin abortos) y segundo grupo (con abortos) no fue significativamente diferente con un valor de $\mathcal{E} = 0,81 < 1, 96$.

6.2.6 Infección por VPH según presencia de cesarías.

De las 46 muestras positivas a la detección de ADN/VPH; 39 corresponden al grupo de pacientes que no tuvieron ninguna cesaría, 2 casos a pacientes que tuvieron alguna cesaría y 5 casos que no dieron ningún dato de referencia. Se puede observar un pequeño incremento de la frecuencia porcentual de casos positivos de infección en el grupo de pacientes que no se sometieron nunca a cesarías (Figura 23).

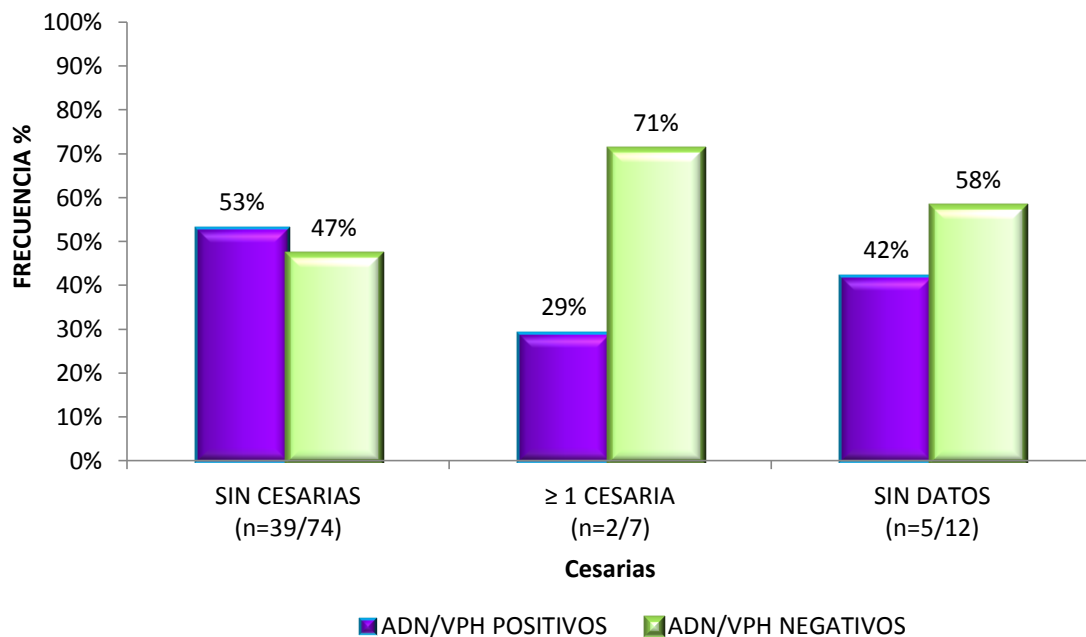


Figura 23: Frecuencia porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH según presencia de cesarías en las pacientes en estudio.

La distribución de frecuencia de infección por VPH entre el primer grupo (sin cesarías) y segundo grupo (con cesarías) no fue significativamente diferente con un valor de $\epsilon = 1,2 < 1,96$.

6.2.7 Presencia de infección por VPH según diagnóstico cito-histopatológico.

En este análisis las 46 de 93 muestras que resultaron positivas a la detección de ADN/VPH se agruparon de la siguiente manera: 9 muestras positivas de 21 con diagnóstico de citologías normales, 16 de 47 con lesiones de bajo grado, 16 de 20 con lesiones de alto grado y 5 de 5 casos positivos con diagnóstico de cáncer invasor. Los porcentajes de esta distribución evidencian en los 4 grupos de muestras estudiadas una clara tendencia de mayor positividad al VPH según avanza el grado de lesión de la enfermedad. El grupo de cáncer invasor presenta 100% de positividad, en el grupo de mujeres con lesión de alto grado se encontró 80% de positividad; en los casos de lesiones de bajo grado 34% de positividad y en el grupo de mujeres con diagnóstico normal 43% (figura 24).

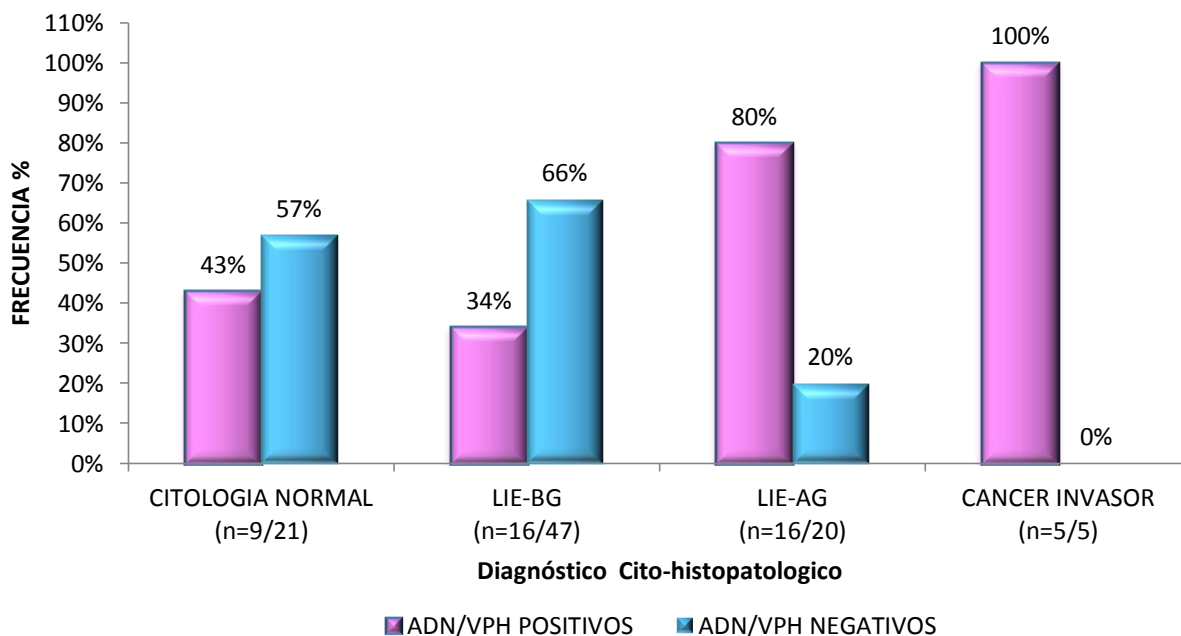


Figura 24: Distribución porcentual de casos positivos y negativos al diagnóstico de ADN/VPH en las 93 muestras estudiadas, agrupados de acuerdo al grado de lesión presentado.

La distribución de frecuencia de infección por VPH en función al diagnóstico cito-histopatológico fue estadísticamente diferente con un valor de *chi cuadrado* de 17, 31 ($p < 0,05$).

6.2.8 Frecuencia de oncovirus VPH en lesiones cervicales.

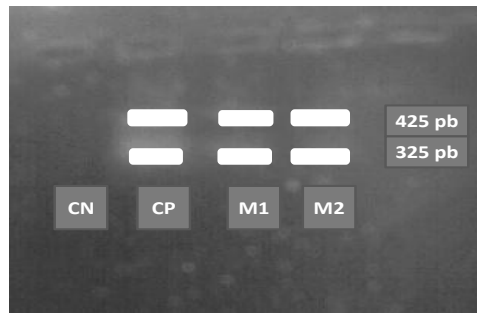
De los 46 casos que presentaron resultados positivos a la detección de genoma de VPH se seleccionaron 17 casos de lesiones cervicales en relación con el diagnóstico cito-histopatológico para la tipificación de VPH de mayor importancia oncogénica VPH-16 y VPH-18 genotipos de alto riesgo.

De estas 17 muestras 2 presentaban diagnóstico cito-histopatológico de metaplasia epidermoide, 10 de lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG) y 5 diagnóstico de cáncer invasor (Tabla 14).

DIAGNOSTICO CITO – HISTOPATOLOGICO	Nº DE CASOS
Metaplásia epidermoide.	2
Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE-AG o H-SIL), se incluyen casos de cáncer in situ (CIS)	10
Cáncer invasor	5
TOTAL	17

Tabla 14: Muestras cervicales sometidas a tipificación de VPH según diagnóstico cito-histopatológico

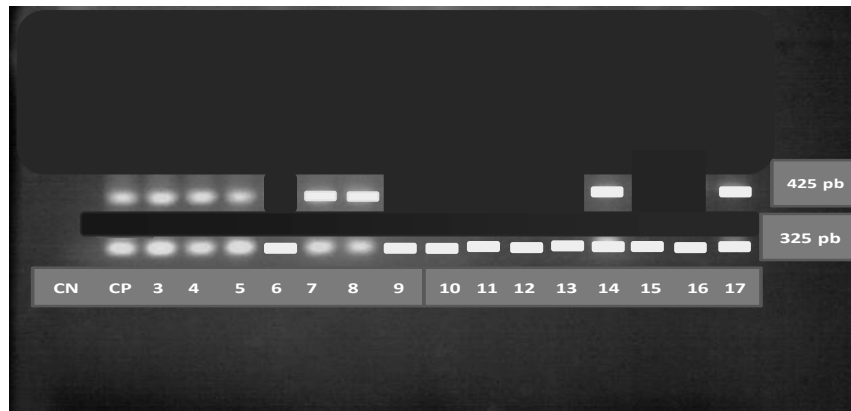
La tipificación molecular de los genotipos de alto riesgo oncogénico fue realizada según instrucción de reactivos comerciales (SACACE *Biotechnologies*) para la detección de los genotipos VPH-16 y VPH-18. Los resultados se muestran en las figuras 25.



CN= Control negativo; CP= Control positivo; M1= Muestra 1; M2= Muestra 2;
pb= Pares de bases.

Figura 25: Detección molecular de VPH de alto riesgo oncogénico VPH-16 y VPH-18; revelado de banda de 425 pb correspondiente a fragmento amplificado del genoma de VPH-18 y banda de 325 correspondiente a VPH-16.

La figura 25 muestra resultados representativos de una corrida electroforética. La corrida muestra el control negativo (CN) en el que se evidencia, como se esperaba, que no existe amplificación inespecífica, el control positivo (CP) que evidencia la presencia de las dos bandas, una de 325 pb de VPH-16 y de 425 pb para VPH-18. También muestra resultados de dos muestras positivas para VPH-16 y VPH-18. Los resultados obtenidos fueron los adecuados para la validación de la prueba.



CN= Control negativo; CP= Control positivo; M1= Muestra 1; M2= Muestra 2;
Pb= Pares de bases.

Figura 26: Resultados de la detección molecular de VPH-16 y VPH-18 de las muestras en estudio.

En figura 26 puede observarse el resultado del diagnóstico de oncovirus de todas las muestras seleccionadas para la tipificación. De igual manera tanto CN como CP son validados.

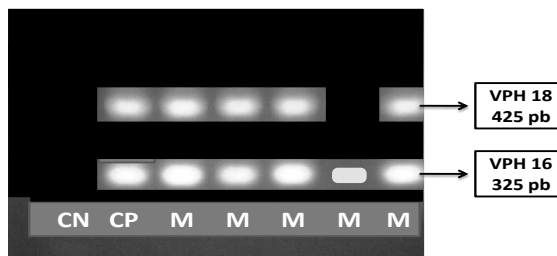


Figura 27: Resultados de la detección molecular de VPH-16 y VPH-18 de las muestras en estudio. Acercamiento de la imagen de la figura 26

En la figura 26 y 27; podemos observar los resultados de la tipificación de los genotipos VPH-16 y VPH=18 de todas las muestras seleccionadas, mediante la presencia de bandas de amplificación de 325 pb y 425 pb respectivamente, según se indica las muestras que se sometieron a tipificación incluyen casos de muestras cervicales con metaplasia epidermoide, lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG) y cáncer invasor.

De acuerdo con esto de las 17 muestras tipificadas, los casos positivos a la detección de genoma viral de VPH-16 fue de 100% (n=17), los casos positivos para VPH-18 fue de 53% (n=9) y se evidencio a su vez 53% (n=9) de coinfección VPH-16/VPH-18 (figura 28).

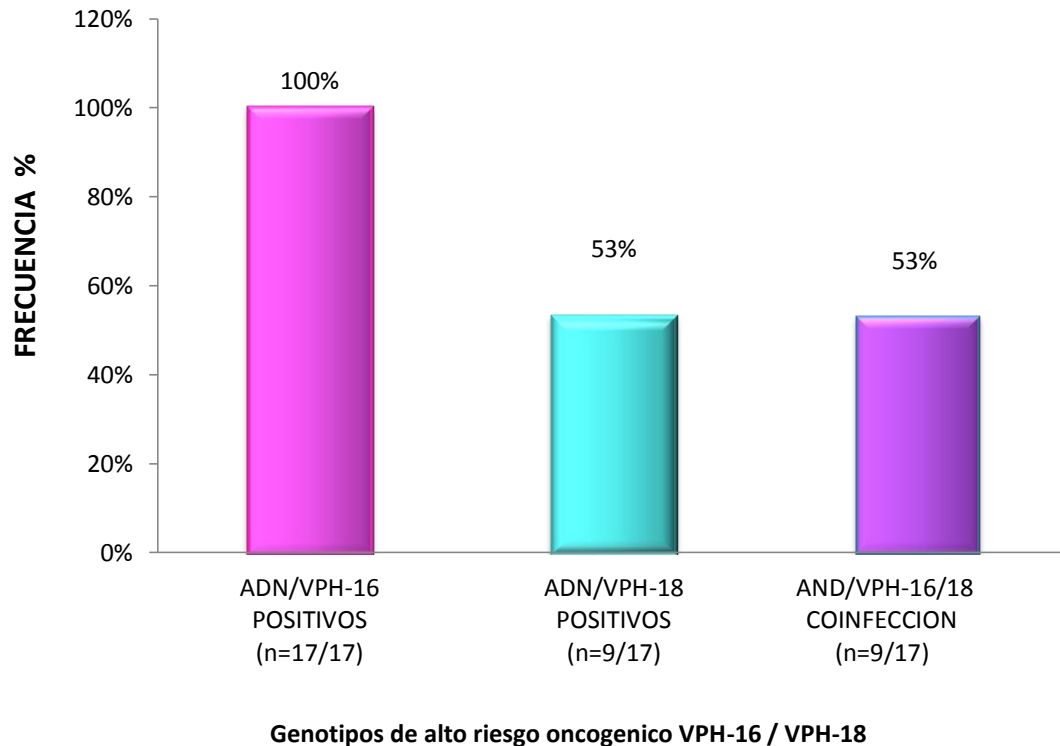


Figura 28: Frecuencia porcentual de casos positivos a la determinación de infección por VPH-16; VPH-18 y coinfecciones VPH-16/VPH-18.

Los resultados fueron analizados según diagnóstico cito-histopatológico de la siguiente manera: 2 muestras con metaplasia epidermoide, 10 con lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG) y 5 casos de cáncer invasor. Los resultados muestran que del total de casos tipificados con diferente diagnóstico cito-histopatológico el 100% (n=17) presento infección por el genotipo VPH-16; por otro lado en cuanto a la presencia de VPH-18, se identificó 100 % (n=2) de infección en los casos con metaplasia epidermoide, 50% (n=5) en casos de LIE-AG y 40% (n=2) de infección en casos con cáncer invasor. Se determinó coinfección por VPH-16/18 en 100% de los casos con metaplasia epidermoide, 50% en los casos con LIE- AG y 40% en los de cáncer invasor (figura 29).

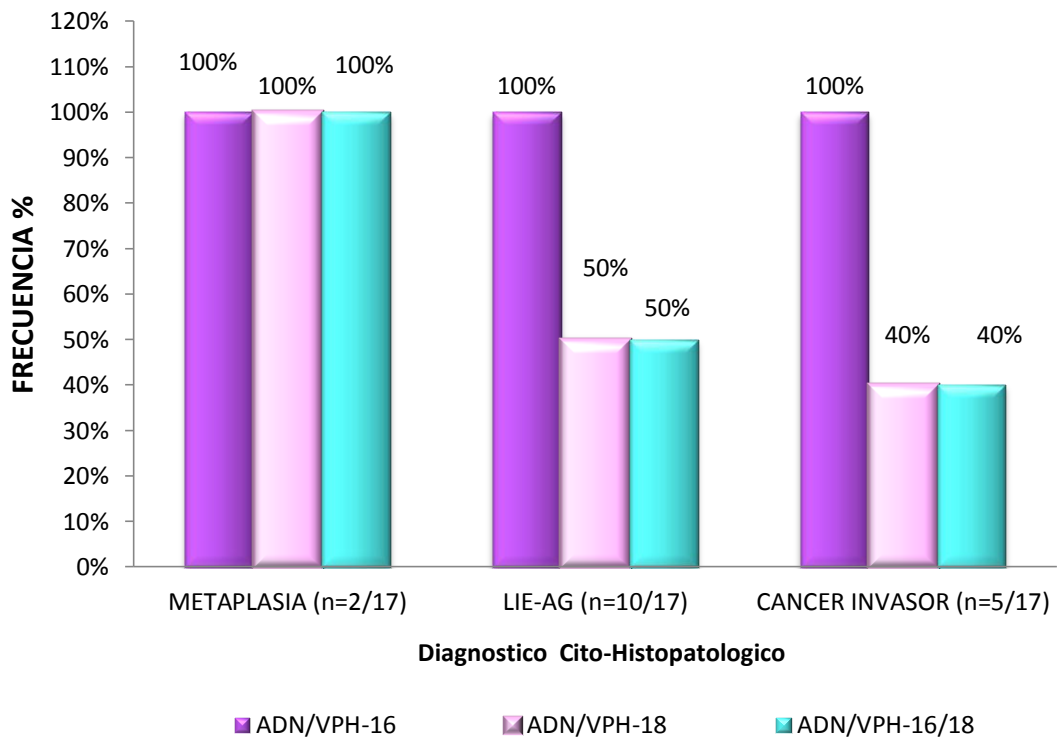


Figura 29: Frecuencia porcentual de casos POSITIVOS a la determinación de infección por VPH-16; VPH-18 y coinfecciones VPH-16/VPH-18; según diagnóstico cito-histopatológico.

W. DISCUSION.

El cáncer de cuello uterino es una enfermedad neoplásica maligna de cérvix y cuya progresión final conduce a la muerte ⁽³⁾. En el mundo entero representa el cáncer más común, después del cáncer de mama, en los países en vías de desarrollo representa el principal problema de salud pública atribuible a cáncer que afecta a la población femenina (3, 5, 6, 7, 8, 53, 54, 59). En Bolivia, el cáncer cervical es responsable de la muerte de 2 a 4 mujeres cada día y aunque el sistema de información y evaluación nacional son limitados, se estima al igual que en otros países latinoamericanos, reporte de una de las mayores tasas de incidencia y mortalidad por esta enfermedad ⁽²³⁾.

Las lesiones precursoras que dan origen a cáncer cervical pueden ser irreversibles o mantenerse in situ por varios años antes del establecimiento del cáncer invasor ⁽³⁾. Está demostrado que la infección persistente con genotipos de alto riesgo oncogénico de VPH es factor etiológico central, aunque no el único suficiente, en el desarrollo del cáncer de cuello uterino y de sus lesiones precursoras. ^(3, 44, 46, 47), sin embargo no existe cáncer cervical sin la presencia persistente de ADN/VPH ⁽³⁾.

Implementación y evaluación de un procedimiento molecular para detección de VPH en células epiteliales cervicales.

El método convencional para la pesquisa de cáncer cérvicouterino ha sido el test de Papanicolaou o citología cervicovaginal. La aplicación de la citología cervical en programas sistemáticos de cribado, ha mostrado ser efectiva en la reducción de las tasas de incidencia y de mortalidad del cáncer de cérvix sobre todo en países desarrollados. Una evaluación anual de manera óptima permitiría prevenir hasta un 70% de las neoplasias cervicales cuando va acompañada de la colposcopia e histopatología. Sin embargo, este método tiene limitaciones importantes entre las cuales se encuentra el impedimento de una automatización completa de la técnica, variaciones constantes para mejorar su sensibilidad, elevada presencia de falsos negativos o sobre valoración de los hallazgos citológicos en las evaluaciones de los cambios morfológicos, sumado a que la citología únicamente permite

‘sugerir’ la presencia de una infección por VPH, no indica si hay infección mixta viral ni los genotipos que están presentes ⁽⁸⁵⁾. Esto conlleva al diagnóstico de cambios atípicos ambiguos que no pueden ser confirmados; tratamientos excesivos por citologías dudosas y manejo inadecuado de pacientes con lesiones cervicales cuyo Papanicolaou fue negativo ^(82,85).

La utilización de herramientas de biología molecular ha modificado radicalmente la perspectiva del diagnóstico de procesos virales. En muestras cervicales los procedimientos moleculares permiten detectar la presencia del genoma viral en material de citología o biopsias aun si la infección no es evidente o el número de partículas virales es bajo ⁽⁸⁵⁾; por lo que son herramienta útil en el diagnóstico precoz de infecciones persistentes y potencialmente oncogénicas. Sin embargo son procedimientos muy caros y esto limita su uso y acceso a la población.

En el presente trabajo se planteó implementar, desarrollar y evaluar el uso de métodos moleculares para la detección de VPH mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa convencional.

La primera etapa del desarrollo de la PCR, incluyó la optimización de un protocolo de extracción de genoma viral que permita la obtención de ADN con grado de pureza óptimo para ser sometido al proceso de amplificación. Se evaluó un total de 5 protocolos (tabla 5, 6) obtenidos por referencia de diferentes estudios realizados en el mismo tema ^(41, 44, 46, 47, 48, 49, 59), los protocolos se basaron en la técnica de extracción con fenol-cloroformo y purificación con etanol, técnica descrita por Sambrook ^(88, 21). En lo que diferían básicamente los protocolos fue en los reactivos, concentraciones, tiempos y temperaturas utilizados en la primera etapa de lisis o desnaturalización del proceso de extracción. La evaluación de punto final fue la pureza y cantidad de ADN que fueron determinados por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. Solo los protocolos 1 y 2 ofrecieron resultados de pureza dentro del rango establecido como aceptable (1,6 a 1,8 de relación de absorbancia a 260/280). El resultado de pureza del protocolo 1 fue de 1,73 y del segundo protocolo 1,70. Las mayores cantidades de ADN fueron obtenidos por el protocolo 1 con

39 ug/mL y el protocolo 3 con 27, 5 ug/mL de ADN, resultados que concordaron con los determinados por electroforesis en gel de agarosa donde también el protocolo 1 y 3 evidenciaron mejores resultados.

Evaluando simultáneamente pureza y cantidad, el primer protocolo fue con el que mejores resultados se obtuvieron. Por esto se definió que sería el protocolo más óptimo a ser utilizado y aplicado para la obtención de ADN a partir muestras celulares cervicouterinas, en el estudio.

La segunda etapa incluyó el desarrollo del proceso de amplificación, para lo cual se utilizó una mezcla PCR (mix PCR) conformado por los reactivos necesarios y a concentraciones adecuadas requeridas para la amplificación (tabla 7), mezcla que fue probada en referencia con otros estudios^(46, 47, 61). La evaluación fue realizada por triplicado y con 3 diferentes programas de ciclado (tabla 8) también reportados en otros ensayos^(41, 47, 83). Se utilizaron los iniciadores de consenso MY09/MY11, que permiten la amplificación de un fragmento de ADN viral de 450 pb presente en una región conservada del gen de expresión tardía L1 presente en todos los VPH^(44, 46, 47, 59, 61, 73, 76, 77, 81, 83). Para la validación del ensayo se utilizó como control positivo ADN extraído de la línea celular SiHa que lleva incorporado en su genoma 1 copia de genoma VPH-16 por célula y como control negativo ADN extraído de células blancas (tabla 9). Los resultados obtenidos fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa (figura 18), donde se pudo determinar que la mezcla PCR evaluada permitió la amplificación de una banda de 450 pb del control positivo (controlado con el marcador de peso molecular), no se observó banda de amplificación en el control negativo (células blancas).

La sensibilidad analítica del ensayo nos permite detectar hasta una copia de genoma de VPH por célula medida mediante la utilización de la línea celular SiHa como control positivo; la especificidad analítica evaluada con el control negativo de ADN de células blancas, determinó que el ensayo es específico para la detección de genoma de VPH, puesto que no se evidenció ningún tipo de amplificación a partir del ADN del control negativo.

Para determinar la eficiencia de amplificación de los 3 protocolos, el control positivo fue probado a dos concentraciones, a la mayor concentración se observó presencia de la banda de 450 pb en los 3 protocolos; pero a la menor concentración con el programa 2 de amplificación utilizado no se evidenció presencia de la banda buscada, a su vez con el programa 3 se evidenció presencia de bandas con menor intensidad a comparación del programa 1. De acuerdo con esto el ensayo de amplificación fue establecido con la mezcla de reactivos probada y con el programa de ciclado número 1.

La reproducibilidad del ensayo fue evaluada repetidas veces, para lo cual se seleccionaron al azar muestras procesadas con resultados positivos y negativos a la detección de ADN/VPH, las cuales fueron sometidas al ensayo de amplificación por segunda y hasta tercera vez en diferentes días y en las mismas condiciones, se pudo evidenciar que en diferentes días de evaluación los resultados obtenidos en una primera instancia se reprodujeron todas las veces.

Determinación de VPH en muestras cervicales por PCR.

Establecido el diagnóstico molecular del VPH mediante PCR, se llevó a cabo la detección de infección en muestras cervicales. Se trabajó con muestras celulares cervicouterinas de un total de 93 pacientes participantes clasificadas en cuatro grupos en función a su diagnóstico histopatológico: 21 pacientes con citología normal, 47 con LIE-BG, 20 con LIE-AG y 5 con cáncer invasor, según nomenclatura Bethesda.

Para el estudio las diferentes clasificaciones cito-histopatológicas fueron armonizadas con la nueva clasificación del Sistema Bethesda, debido a que la clasificación de Richart y especialmente la tradicional clasificación Papanicolaou no comunican de manera confiable la información de relevancia clínica, además muchas veces no corresponden con los puntos de vista actuales de las lesiones preinvasoras, la distribución de VPH ni las pautas vigentes del manejo clínico^(3, 85). La clasificación Bethesda incluye dos subgrupos designados como lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIE-BG) y lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG) para clasificar las lesiones escamosas preinvasoras⁽⁸⁵⁾.

En base a estudios clínicos, patológicos y moleculares se conoce que la infección viral se relaciona con una ruta de cambios morfológicos que incluye: LIE-BG (NIC I) donde se presume infección activa por cualquier genotipo de VPH asociado al tracto genital femenino, seguidamente pueden presentarse LIE-AG (NIC II o NIC III) las cuales si están asociadas a la infección persistente con genotipos de alto riesgo oncogénico del VPH, generalmente VPH-16 y VPH-18. Usualmente las LIE-BG hacen regresión, mientras que la mayoría de las LIE-AG progresa a neoplasia cervical ⁽⁸⁵⁾.

Es por esto que el sistema Bethesda sumado a técnicas de biología molecular permite un mejor análisis de los aspectos morfológicos de las lesiones preinvasoras y los conocimientos actuales de la infección por VPH, esto le permite al clínico sospechar el potencial oncogénico de los mismos.

En Bolivia la información sobre la prevalencia de infección cervical por el VPH es escasa. En nuestro estudio en población de consulta colposcópica, determinamos una frecuencia de 49% (n=46/93) de casos positivos de infección por VPH mediante detección de ADN/VPH (figura 19). Trabajos publicados en otros países sobre la prevalencia de VPH genital informan frecuencias diferentes de positividad, según la técnica empleada en la detección y según la población en estudio. Un estudio realizado en México encontró una frecuencia de 37.6% (58 de 154) de casos positivos a la detección de VPH mediante a la amplificación con el uso de los iniciadores MY09/MY11 en pacientes con distinto grado de lesión ⁽⁵⁹⁾.

En nuestro estudio encontramos una distribución de las muestras positivas en los diferentes estadios clínicos de la siguiente manera: 9/21 de citologías normales (43%); 16/47 lesiones de bajo grado (34%); 16/20 lesiones de alto grado (80%) y 5/5 cáncer invasor (100%). Los porcentajes de esta distribución en los cuatro grupos se muestran en la figura 24, observándose una clara tendencia de mayor positividad a infección por VPH según avanza el grado de lesión, lo que apoya la participación de este virus en el desarrollo de cáncer cervical. Esta misma tendencia fue encontrada en otro estudio Mexicano que reporta prevalencias de infección con el uso de la misma técnica de 23,1% en los casos con citología normal, 66,6% en casos con lesiones de bajo grado, 91,6% en lesiones de alto

grado y 95.5% en grupos con cáncer invasor ⁽⁵⁹⁾. En general los datos obtenidos de nuestro trabajo concuerdan con los encontrados en otros países donde la detección regular de ADN de VPH en células cancerosas evidencia un 99,7% de positividad y más de 90% en lesiones precursoras ^(6, 7, 10, 14, 33, 35).

El hecho de encontrar en nuestros datos una mayor frecuencia de positividad en los casos con citología normal en relación a la frecuencia de los casos con lesiones de bajo grado, puede deberse a que el primer grupo de pacientes con diagnóstico cito-histopatológico de normalidad (negativo para cualquier cambio morfológico), está conformado también por pacientes con diagnóstico de procesos inflamatorios, cervicitis crónica o metaplasia epidermoide, que si bien no corresponden a una clasificación que evidencia lesiones premalignas es muy probable que están encubriendo probables lesiones precursoras y también confirmaría una alta frecuencia de infección asintomática.

Por otro lado es importante considerar que los porcentajes de frecuencia de casos VPH positivos del estudio podrían incrementarse si se incluyera otros juegos de iniciadores universales y específicos para VPH. Algunos estudios reportan que muestras previamente negativas con el uso de los iniciadores MY09/MY11 fueron positivas para los iniciadores GP5/GP6 y L1C1/L1C2, que amplifican diferentes fragmentos de la región L1 de VPH. Por ejemplo en un estudio en México donde se utilizó tres pares de iniciadores universales los resultados mostraron un incremento de prevalencia de 37,6% obtenida con un solo par a 60,4% con el uso de los dos restantes ⁽⁵⁹⁾. Esto puede deberse a que los iniciadores GP5/GP6 y L1C1/L1C2 podrían ser más eficientes que los iniciadores MY09/MY11 en los casos donde se trabaja con muestras de ADN que no se encuentran con un estado de pureza idóneo o en otro caso fragmentado, sabiendo que en esos casos se amplifican mejor fragmentos pequeños que grandes, MY09/MY11 amplifica un fragmento de 450 pb mientras que L1C1/L1C2 un fragmento de 250 pb y GP5/GP6 uno de 150 pb lo que determinaría mejor eficiencia en esas condiciones ⁽⁵⁹⁾. Si bien en el estudio se evaluó el ADN antes de su amplificación, será importante hacer un estudio retrospectivo de las muestras incluyendo otro juego de iniciadores para confirmar las frecuencias encontradas, evaluar costo beneficio y establecer el grado de incremento de la sensibilidad bajo

condiciones del laboratorio en el que previo a la amplificación de genoma la evaluación del ADN extraído es un paso obligatorio previo. Sin embargo es importante considerar que varios estudios reportan a los iniciadores MY09/MY11 como los de mayor sensibilidad.

También se evaluó los casos de infección por VPH en relación a datos sexuales y reproductivos. Se pudo evidenciar una tendencia de mayor número de casos positivos de infección por VPH en pacientes que tuvieron más de 1 pareja sexual (figura 20), lo que concuerda con diversos estudios epidemiológicos que indican que el riesgo de cáncer cervical está fuertemente influenciado por factores relacionados con ciertas conductas sexuales como el número de parejas sexuales, edad de inicio de vida sexual activa y la conducta sexual de la pareja. Sin embargo una vez establecida la relación que existe entre infección por el VPH y cáncer cervical, dichos factores en general se convierten más específicamente en parámetros que miden el riesgo de exposición al virus ^(6, 7, 13).

Al evaluar la frecuencia de casos positivos de VPH en relación al número de partos se puede evidenciar que existe una relación proporcional donde los casos positivos se incrementan en las mujeres con más de 1 parto (figura 21). Esto puede deberse 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 del epitelio. Las hipótesis a través de las cuales se ha tratado de explicar la relación entre multiparidad y cáncer cervical están relacionadas principalmente con traumas obstétricos repetidos, cambios hormonales e inmunosupresión durante el embarazo que pueden ser responsables de alteraciones en la unión escamocolumnar (zona de transformación) produciendo ectopia cervical y manteniendo la zona de transformación sobre el exocervix por muchos años en las mujeres con gran número de embarazos, facilitando con esto la directa exposición de células blanco al VPH ^(3, 7, 13).

La evaluación de la presencia de VPH en relación con la existencia de antecedentes de abortos en las pacientes ha podido evidenciar mayor número de casos positivos en pacientes que estuvieron expuestas a algún aborto (figura 22). Esto puede deberse de igual manera a que estas mujeres también están expuestas a traumas, alteraciones hormonales e

inmunosupresión que favorecen la infección por VPH. Se pudo evidenciar diferencia de un menor número de casos positivos de VPH en las pacientes que evitaron todo trauma obstétrico que genera un parto y que favorece la infección de VPH al someterse a cesáreas (figura 23), si bien en ambos casos no se evidencio datos con diferencias estadísticamente significativas, esto podría cambiar al trabajar con un mayor número de muestras.

Frecuencia de oncotipos VPH-16 y VPH-18 en lesiones cervicales.

Una tercera etapa del estudio incluyó la tipificación de dos genotipos de alto riesgo oncogénico muy frecuentes a nivel mundial y responsables de la mayoría de las neoplasias cervicales: VPH-16 y VPH-18^(7, 10, 32, 33, 75). Se procedió a la tipificación de 17 muestras que en un principio resultaron positivas al diagnóstico de VPH, estas muestras se seleccionaron según diagnóstico cito-histopatológico de la siguiente manera: 2 con metaplasia epidermoide, 10 casos con lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG) y 5 con diagnóstico de cáncer invasor. Para el análisis de tipificación se usó el set comercial “VPH16/18 de SACACE *Biotechnologies*”, utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los iniciadores utilizados permitieron la amplificación de un fragmento de 325 pb para la detección de VPH-16 y de 425 para VPH-18 correspondientes a la región del gen E6.

Los resultados obtenidos mostraron una frecuencia de infección por VPH-16 en el 100% (n=17) de las muestras tipificadas, 53% (n=9) de infección por VPH-18, por lo tanto con estos valores 53% de coinfecciones VPH16/VPH18 (figura 28). De este modo se comprobó una elevada frecuencia de estos dos genotipos en lesiones de alto grado y cáncer invasor en nuestra población, lo que concuerda con datos reportados en otras poblaciones.

Si se analiza la frecuencia de infección de estos genotipos de alto riesgo oncogénico en función al diagnóstico cito-histopatológico de las pacientes (figura 29), se observa una frecuencia de 100% de infección por VPH-16 en los tres grupos con diferente estadio clínico, es decir que este genotipo se hizo presente en las 17 muestras analizadas. Por otro lado VPH-18 fue encontrado en menor frecuencia en casos de lesión más avanzada, pero

en los pacientes con metaplasia epidermoide se evidencio una coinfección por estos dos genotipos en el total de muestras. Estudios respecto al tema muestran resultados similares de infección por estos dos genotipos de alto riesgo oncogénico, con frecuencias encontradas de 87,5% en lesiones de alto grado y de 90,9% en pacientes con cáncer⁽⁵⁹⁾.

La metaplasia epidermoide es el cambio en el tipo de células adultas de la capa más externa del epitelio cervical hacia una forma que no es normal generalmente en la zona de transición lugar de alta actividad celular en la que se asientan la mayoría de las lesiones preinvasoras e invasoras. Los fenómenos de metaplasia escamosa ocurren continuamente y pueden estar influenciados por cambios hormonales locales, edad y cambios en el pH vaginal⁽⁴⁰⁾, lo cual no significa necesariamente que se trate de casos sospechosos de transformación maligna, pero si a esto se suma la presencia de infección por VPH y aún más coinfección por genotipos de alto riesgo oncogénico; estos casos se convierten en sospechosos y de mayor interés para la aplicación de otras medidas de seguimiento.

Es así que al observar en nuestros resultados la infección por alguno de estos dos genotipos en el total de muestras con lesiones de alto grado o cáncer invasor y más de la mitad del total de casos con coinfección por ambos genotipos, no cabe duda que un factor importante para el desarrollo de esta patología y de sus lesiones precursoras, no depende de la infección por cualquier genotipo de VPH, sino del potencial oncogénico que presentan ciertos genotipos de alto riesgo oncogénico de este agente viral.

Finalmente es necesario remarcar las ventajas que pueden lograrse con la utilización de técnicas moleculares para la detección del VPH y de distintos genotipos virales de alto riesgo oncogénico. En la actualidad son tres áreas de indiscutible interés como ser: el manejo de pacientes con ASCUS y lesiones de bajo grado, la vigilancia y seguimiento de pacientes tratados por displasias de alto grado y carcinoma microinvasor e invasor y su relación con los programas de detección precoz del cáncer cervical. Este último apartado ha suscitado un debate todavía abierto en lo que se refiere a las mejoras que la inclusión de estas técnicas supondría en la sensibilidad y rendimiento de los programas de cribado, así como la utilidad de reemplazar el estudio citológico convencional⁽⁸²⁾.

Por otro lado actualmente, el conocimiento de los tipos de VPH asociados con cáncer cervical 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 el VPH, evite la reinfección o induzca la regresión de lesiones ya establecidas. Nuevas estrategias para el control del cáncer de cérvix 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 ⁽⁵⁹⁾.

X. CONCLUSIONES.

8.1. CONCLUSIÓN GENERAL.

- En el presente trabajo se logró el desarrollo de la técnica molecular PCR para el diagnóstico de VPH en muestras cervicales de cáncer cérvicouterino y lesiones intraepiteliales precursoras.

8.2 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.

- La evaluación de 5 protocolos de extracción de genoma viral, permitió estandarizar y optimizar un protocolo de extracción óptimo para la obtención de ADN a partir de células cervicales de cultivo y muestras biológicas.
- Se consiguió implementar y estandarizar el proceso de amplificación de la región L1 del ADN del VPH a través del ensayo PCR y su posterior identificación mediante revelado por electroforesis en gel de agarosa.
- La aplicación del ensayo molecular PCR para el diagnóstico de ADN/VPH en muestras biológicas cervicales incluidas en el estudio con diferente estadio clínico permitió evidenciar una frecuencia de infección del 49% (n=46/93), resultados similares a los reportados en otros estudios de diferentes poblaciones.
- La identificación de los genotipos de alto riesgo oncogénico VPH-16 y VPH-18, permitió determinar una frecuencia de infección por VPH-16 del 100% (n=17/17), por VPH-18 de 53% (n=9/17) y por lo tanto a su vez 53% (n=9/17) de coinfección en muestras cervicales de metaplasia epidermoide, lesiones intraepiteliales de alto grado (LIE-AG) y cáncer invasor, lo cual ratifica la presencia de estos genotipos con su potencial oncogénico del que son responsables en este tipo de muestras.
- La muerte por cáncer cervicouterino puede prevenirse con el tamizaje citológico, que puede detectar lesiones pre-neoplásicas y subclínicas de esta enfermedad. De este modo, la disminución en la mortalidad observada en varios países se ha atribuido en gran parte a la introducción de programas organizados de tamizaje.

Aunque los resultados de los métodos convencionales de diagnóstico y seguimiento del cáncer cervical presentan resultados relativamente satisfactorios, más que todo en países desarrollados donde los programas de cribado y seguimiento se encuentran bien establecidos, en la actualidad el conocimiento que se tiene sobre el rol que juega la infección por el VPH en esta patología, ha determinado que la detección molecular genérica del VPH y tipificación de genotipos de alto riesgo oncogénico represente un elemento de gran importancia en el seguimiento de la paciente con infección persistente, haciendo posible la determinación de una posible progresión o regresión de lesiones premalignas cervicales.

Y. PERSPECTIVAS.

- En cuanto a la técnica de amplificación PCR optimizada, se sugiere nuevas evaluaciones de la misma, incorporando el uso de otros dos pares de iniciadores consenso utilizados para diagnóstico de ADN-VPH, así incrementar la sensibilidad del ensayo.
- Es importante llevar a cabo estudios de prevalencia de infección por VPH tomando poblaciones con mayor número de participantes de distinta procedencia (población abierta).
- Es importante también evaluar la frecuencia de infección por otros genotipos de alto riesgo oncogénico después de VPH-16 y 18.

Z. BIBLIOGRAFIA.

1. ATSDR, Agency for toxix substances and disease resgistre. “Que es el cancer”. ATSDR’s Internet address is www.atsdr.cdc.gov.
2. Medline Plus, Información de salud para usted.”Cáncer”. Un servicio de la Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. Institutos Nacionales de la Salud.
3. Juárez Gerardo. “Diagnóstico molecular del Virus del Papiloma Humano (VPH): el uso de PCR en tiempo real y su relevancia diagnostica”. Tesis para optar el grado de maestría en ciencias en la especialidad de biomedicina molecular. Instituto Politécnico Nacional, México D.F. 2007.
4. Pearce Neil, Boffetta Paolo, Kogevinas Manolis. “Cáncer”. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo.
5. Departamento de salud y servicios humanos de los EE. UU. “Lo que usted necesita saber sobre el cáncer de cérvix”. Institutos nacionales de la salud.
6. López Saavedra, Lizano Soberón. “Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina“. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer; Instituto Nacional de Cancerología, México D.F. Cancerología 1 (2006): 31-55.
7. Castañeda Maura. “El cáncer cervical como problema de salud pública en mujeres mexicanas y su relación con el Virus del Papiloma Humano”. Tesis de doctorado en salud pública y metodología de la investigación biomédica. Universidad Autónoma de Barcelona, facultad de medicina.
8. “Perfil epidemiológico del cáncer cervicouterino en México”. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Octubre - Diciembre 2009.
9. “La prevención del cáncer cervical a nivel mundial”. Alliance for Cervical Cáncer Prevention, ACCP. 1999.
10. Lewis Merle J. “Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe”. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. OPS: 2004.
11. Picconi Maria, Alonio Lidia, Garcia Alejandro, Lizano Marcela, Cervantes Guadalupe. ”Variantes Moleculares de Virus Papiloma Humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cervix”. Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires; Medicina (Buenos Aires) 2000; 60: 889-894.

12. Hernández Torrez Fernando. “Infección genital por VPH y neoplasias anogenitales asociada en mujeres inmunodeprimidas”. Sección prevención de cáncer ginecológico, Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Granada.
13. Mabota de Costa Flora. “Comparación de la variables epidemiológicas y biológicas de pacientes con cáncer de cérvix procedentes de las ciudades de Maputo y Barcelona. Universidad Autónoma de Barcelona, facultad de medicina. Barcelona 2005.
14. Valdespino Gómez Víctor Manuel. “Vacunas preventivas y ensayos clínicos de inmunoterapia contra cáncer cervicouterino “.Academia mexicana de cirugía. Vol. 73, N° 1, 01-02 2005.
15. Felipe Serman. “Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del Virus Papiloma Humano, perspectivas en prevención y tratamiento”. Servicio de obstetricia y ginecología, hospital de Carabineros. Rev Chilr Obstet Ginecol 2002, 321; 86-73(243).
16. GHTHH CDGF Ociel Rodríguez Lundes y cols. “Estudio de la patología citológica del cérvix”. Medigraphic Artemeni Isña, Perinatol Reprod Hum 2009; 23: 12-17.
17. Laila Eugenia Woc-Colburn.” Tipificación Molecular del Virus Papiloma Humano en Hiperplasia Multifocal Epitelial y Papilomatosis respiratoria juvenil en pacientes Pediátrico – Adolescentes en Guatemala”. Unidad de Investigación Facultad de Medicina, Universidad Francisco Marroquín, Guatemala, septiembre 2001.
18. Zibelman de Gorodner, Ofelia Vallejos, Arnaldo R. Lucero, Horacio. “Tipificación del Virus del Papiloma Humano en Neoplasias Epiteliales Malignas de Cavidad Bucal“. Instituto de Medicina Regional, Chaco – Argentina, Universidad Nacional del Nordeste, 2004.
19. Irma Delgado Delgado, Maritza Barrera Valle, Norbis Rodríguez Barrero, Lilián Sánchez Miranda, Susana Mendoza Elvira.” Use of direct immunofluorescence and immunoperoxidase diagnostic kits for bovine parainfluenza 3 and bovine herpes virus 1 in Cuba” Rev. Veterinaria Mexico, Vol. 36,N 3, Septiembre 2005.
20. “Garantías explícitas en salud, guía clínica cáncer cervicouterino”. Chile está mejor reforma de la salud.ministerio de salud. Ed. Santiago: Minsal, 2005.
21. Oscar Cardozo, SEDES Chuquisaca. “Conocimientos actitudes y practicas respecto al cáncer de cuello uterino en el municipio de Sucre Bolivia, abril 2004”Marie Stopes: Bolivia.
22. Hernández Torres Fernando. “Infección genital por VPH y neoplasias anogenitales asociada en mujeres inmunodeprimidas”. Sección prevención de cáncer ginecológico, Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Granada.

23. Prensa. “Bolivia: Cada vez más mujeres contraen cáncer cervicouterino”. Observatorio de derechos sexuales y reproductivos. Miércoles 3 de septiembre de 2008. http://www.la-razon.com/versiones/20080903_006384/nota_250_663708.htm
24. Lewis Merle J. “Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe”. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. OPS: 2004.
25. “Perfil epidemiológico del cáncer cervicouterino en México”. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Octubre - Diciembre 2009.
26. Zeledón Contreras Erick. “Correlación citológica, colposcópica e histológica de las lesiones premalignas de cérvix en pacientes atendidas en el hospital materno infantil Dr. Fernando Velez Paiz”. Estudio monográfico para optar al título de especialista en ginecología y obstetricia. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAM – Managua, Octubre 2007 a Septiembre del 2008.
27. Fernández Gómez Julia. “Patología Benigna y Lesiones Premalignas de Cérvix”. Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. 2007.
28. Hilario Enrique. “Morfología del cérvix uterino”. Departamento de Biología Celular e Histología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco UPV/EHU. 48940 Leioa. Bizkaia. España.
29. Erazo Domínguez José Vicente. “Manual de patología cervical”. Universidad de Cauca, Facultad de Ciencias de la Salud, Unidad de Patología Cervical. 2007.
30. “Informe Cáncer Cervicouterino 2009”. Research education outreach. 1600 duke street, suite 500, www.preventcancer.org.
31. Hernández Torrez Fernando. “Infección genital por VPH y neoplasias anogenitales asociada en mujeres inmunodeprimidas”. Sección prevención de cáncer ginecológico, Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Granada.
32. Consuegra Mayor Claudia, Molina Diana, Egea Eduardo. “El virus del Papiloma Humano (VPH), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical”. Salud Uninorte. Barranquilla (Col.), 19: 3-13, 2004.
33. Castellsagué, FX. Bosch. “Vacunas frente al Virus del Papiloma Humano (VPH): incorporación del pediatra en la lucha contra el cáncer de cuello uterino”. Rev Pediatr Aten Primaria. 2007; Supl 3: S 21-42.
34. Arango A. María del Pilar. “El Virus del Papiloma Humano”. Facultad de Medicina - Universidad de Manizales.

35. Cortés Yépez Hernán. "Papilomavirus y cáncer de cérvix". Diciembre 10/2002.
36. Premoli Gloria, González Anajulia, Villarreal Juana, Aguilera Luís. "Virus del Papiloma Humano; visión actual en biomedicina". Asociación Dental Mexicana, AC. Derechos reservados, Copyright 2005: Vol. LXII, No. 6 Noviembre-Diciembre 2005 pp 213-224.
37. Rivera Rodríguez Patricia, Zúñiga Lara Daniel. "Infección por VPH, vacunas y nuevas tendencias". Medigraphic Artemeni Isínea. Hospital Ángeles del Pedregal. Volumen 7, No. 2, abril-junio 2009.
38. Vargas Hernández Víctor Manuel. "Virus del Papiloma Humano, Aspectos Epidemiológicos, Carcinogénicos, Diagnósticos y Terapéuticos". División de Ginecología Hospital Juárez de México. 1996; Volumen 64: 411-417.
39. Vázquez Hebe. "Vacuna del Virus del Papiloma Humano". Simposio satélite: vacuna para VPH y su rol en Latinoamérica. vacunación hoy Vol. 14 Núm. 81 Enero-febrero, 2007.
40. López Fernández José A. "Curso de Colposcopia, Cérvix normal: Colposcopia, Citología, Histología". Hospital General Universitario de Alicante. XVIII Congreso de la AEPCC - GRANADA, 22-24 de noviembre 2006.
41. Francesco Broccolo, Clementina E. Cocuzza. "Automated extraction and quantitation of oncogenic HPV genotypes from cervical samples by a real-time PCR-based system". Department of Clinical Medicine and Prevention, University of Milano-Bicocca. Journal of Virological Methods 148 (2008) 48-57.
42. Hernández Carlos, Smith Jennifer, Lorincz Attila, Arreola Emilio. "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 Publica Mex 2005; 47: 423-429.
43. Carmen Pereira, Julia Noda, Sandra Cuello. "Empleo de la inmunohistoquímica en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa de la bolsa" Rev. Cubana de Ciencia avícola, 2002, 26: 137- 40.
44. Villela Berbert ALC, De Oliveira Mantese, Goulart Filho LR, Rocha A, Machado Saraiva AC. "Detection of Human Papillomavirus in Basal Cell Carcinoma by Polymerase Chain Reaction". Med Cutan Iber Lat Am 2004; 32(5): 205 -209).
45. Delfina Rosario, Mayling Álvarez, Javier Díaz, Rodolfo Contreras, Rosmari Rodríguez, Susana Vázquez y María G. Guzmán. "Reacción en cadena de la polimerasa para la detección rápida y determinación del serotipo de virus del dengue en muestras clínicas". Centro Conmemorativo Gorgas, Ciudad de Panamá, Panamá.

46. Rodrigo Núñez Vidales, José René Escalona Múgica. “Ciclo Celular”. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Departamento de Embriología.
47. Silvia Márquez, Sergio Daniel Ifrán, Enrique Zabala. “Ciclo celular y duplicación del ADN”.
48. Jaime Berumen Campos. “Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México: su asociación a la alta incidencia del cáncer del cérvix”. *Canceres Cervico-Uterino y Prostático*, Gac Méd Méx Vol.139, Suplemento No. 4, 2003 MG.
49. Picconi Maria, Alonio Lidia, Garcia Alejandro, Lizano Marcela, Cervantes Guadalupe. ”Variantes Moleculares de Virus Papiloma Humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cervix”. Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires; *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 889-894.
50. Amezcua Selene, Figueroa Víctor, Ansaldo María, Arreygue Alejandra, Albarran Benibelks. “Tipificación de Virus del Papiloma Humano (VPH) en pacientes con cáncer cervicouterino y lesiones precursoras procedentes del centro médico de Occidente”. Centro Médico de Occidente, Guadalajara, Jalisco, México. Vol 31, marzo 2006.
51. Flores Katherine, Terrazas Katty. “Contribución al diagnóstico de infecciones respiratorias causadas por Virus Sincitial Respiratorio: Aislamiento, identificación y cultivo in vitro”. 2003. UMSA: SELADIS, La Paz-Bolivia.
52. Fernández Gómez Julia. “Patología Benigna y Lesiones Premalignas de Cérvix”. Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. 2007.
53. Isaza Mario, Pérez Gonzalo, Morales Olga, Deantonio Rodrigo, Alvarado Catherine, Trujillo Lina. “The accuracy of the HPV-DNA test for detecting highgrade disease (CIN 2+) in women with minor cytological abnormalities (ASC-US and LSIL) in patients affiliated to the social security system in Bogota, Colombia”. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* Vol. 60 No. 3 • 2009 • (213-222).
54. Martin Moberg, Inger Gustavsson, and Ulf Gyllensten. “Real-Time PCR-Based System for Simultaneous Quantification of Human Papillomavirus Types Associated with High Risk of Cervical Cancer”. Department of Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory, Uppsala University. *Journal of clinical Microbiology*, July 2003, p. 3221–3228.

55. Gutiérrez Mónica, Baltazar Margarita, Flores Mirna. “Identificación de ADN de Papillomavirus Humano en pacientes con alguna neoplasia intraepitelial cervical o cáncer Cérvico uterino mediante técnicas moleculares”. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias. Derechos reservados, Copyright © 2004: Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, Vol. 29,2004.
56. Mendoza Laura, Montero y Lagerenza. “Detection of human papillomavirus by PCR RFLP assay in a case with negative hybrid capture II result and high grade intraepithelial neoplásica Pap smear result”. Departamento de Salud Pública y Epidemiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Laboratorio de Virología, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de São Paulo São Paulo Brasil. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 3(1) Junio 2007.
57. Matthew P. Stevens, Suzanne M. Garland, Sepehr N. Tabrizi. “Development and validation of a real-time PCR assay specifically detecting human papillomavirus 52 using the Roche LightCycler”. Department of Microbiology and Infectious Diseases, The Royal Women’s Hospital, 132 Grattan Street, Carlton, Victoria 3053, Australia Department of Obstetrics, University of Melbourne, Victoria, Australia. Journal of Virological Methods 147 (2008) 290–296.
58. Mirela Mirt Dabic, Ljiljana Hlupic, Damir Babic, Stanko Jukic, and Sven Seiwerth. “Comparison of Polymerase Chain Reaction and Catalyzed Signal Amplification InSitu Hybridization Methods for Human Papillomavirus Detection in Paraffin-Embedded Cervical Preneoplastic and Neoplastic Lesions”. Department of Pathology, University Hospital Center, Zagreb, Croatia, Department of Pathology, School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia. Received for publication November 12, 2003, accepted July 2, 2004.
59. Carrillo a. Mohar, Meneses Frías Mendivil, Solorza Lizano. “Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del Papiloma Humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas”. Salud Publica Mex. 2004; 46:7-15.
60. Cerdera Noguera, V. PiuZZi, Soto de Ferrini, Acosta, P. “Virus Papiloma Humano y su Relación con Cáncer de Mama. Informe Preliminar”. Cátedra I de Histología y Embriología. Facultad de Medicina. UNNE. Sargento Cabral 2001.
61. Chouhy Diego, Benitez Gil Lisandro, Nocito Ana Lía, Cittadini Jorge, Gardiol Daniela, Giri Adriana A. “Detección y tipificación de ADN de HPV en muestras cervicales de mujeres con y sin infección de HIV en la ciudad de Rosario”. Area Virología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET) – Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR). as, UNR.
62. “Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa”. Monografias. com.

63. Leonardo Satz, Alberto Kornblihtt. La reacción en cadena de la polimerasa, el método y sus aplicaciones. Revista de divulgación científica y tecnológica de la asociación Ciencia Hoy. Volumen 4 – N 23 – Marzo/Abril 1993.
64. “Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)”. Amgen Biotecnología Para la Salud.
65. “Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)”. Wikimedia.
66. “PCR en tiempo en real”. Cultek.
67. Laura Ramírez. “Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa” <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html>.
68. Alfredo Torres Tejeda, Beatriz Eugenia Baca. “Reacción en cadena de la polimerasa”. Centro de Investigaciones Microbiológicas, Universidad Autónoma de Puebla.
69. Carlos Vilela Desposorio, Luis A. Rodríguez Delfín, Amaro Castro Poémape. “Detection of the human papillomavirus by polymerase chain reaction and its relation with the results of the conventional Pap”. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Trujillo. Departamento de Patología del Hospital Belén de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Unidadde Biología Molecular, Instituto de Medicina Tropical e Infectología, Universidad Nacional de Trujillo. Servicio de Ginecología Oncológica del Hospital Belén de Trujillo. Mosaico Cient. 3(2) 2006.
70. Lic. Yudira Soto, Lic. Mayra Muné, Dra. Adibel Goicolea, Dra. Estrella Morales, Lic. Jean Michell Santoyo, Lic. Odalys Valdés, Lic. Rosa Ramírez y Téc. Tamara Pimente. “Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirus humano”. Instituto de medicina tropical Pedro Kour. Rev cubana med trop 1998; 50(3):191-8.
71. Alcira Bermejo, Eduardo Rodroguéz. “Consejo de actualización Papiloma Virus Humano y Herpes Simplex Virus. Sociedad Argentina de dermatología, septiembre 2004.
72. Morelva Toro, Antonio llombart-Bosch “Detección inmunohistoquímica de la proteína L1 de Virus Papiloma Humano (HPV) de alto riesgo en citologías y biopsias de cuello uterino”. Departamento de patología, Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia, España. Revista española de patología, Vol. 38, n1, 2005.
73. A. Suárez Moya, J.I. Esquivias Gómez, J.A. Vidart Aragón y J.J. Picazo de la Garza. “Detection and typing by molecular biology of human papillomavirus in genital samples” Servicios de Microbiología Clínica, Dermatología y Ginecología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. Rev Esp Quimioterap, Junio 2006; Vol. 19 (Nº 2): 161-166,2006 Prous Science.

74. Jorge Cervantes, Carolina Lema, Luisa Hurtado, Ronald Andrade, Gladys Quiroga." Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Rural Villages of the Bolivian Amazon" *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 45(3):131-135, May-June, 2003.
75. "Detección molecular y genotipificación de Papilomavirus Humano". Instituto peruano de biología molecular. web: www.ipbiomol.com.
76. Maria Alejandra Picconi, Jorge Gronda, Lidia v. Alonio, Luisa I. Villartin barcena. "Virus Papiloma Humano en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de cáncer de cuello uterino tipos virales y variantes de HPV 16". Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires; *medicina (buenos aires)* 2002; 62: 209-220.
77. Elva I. Cortés Gutiérrez, Joel N. Witvrún Ávila, Glafir Sánchez Rodríguez, José A. Gaspar Belmonte, Fernando Hernández Garza, Ricardo M. Cerda Flores. "Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con condilomas cervicales tratadas con ácido tricloroacético". *Ginecol Obstet Mex* 2005;73:111-6.
78. Zulema Casariego, Susana Micinquevich, María A. Gómez." Infección por papiloma virus (HPV) en "carcinoma in situ" en un paciente con sida: a propósito de un caso clínico". *Medicina y Patología medicine and pathology*.
79. Maritza Muñoz, José A. Mendoza, Luis Téllez, María E. Noguera, Orlando Moret, Mercedes López. "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.
80. David Guerrero, Amaya Ojer Gambart, Rosa Guarch Troyas, Ana Mancha Oraá. " Tipaje del virus del papiloma humano (VPH) en relación con la metilación en cáncer de vulva". VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, Octubre de 2006.
81. Mg Scs. Militza Quintero Vega, Jhon Fredy Cruz Gómez, Marco Bastidas, Lic. Lusmary Márquez, Dr. Juan Puig Pon. "Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP". Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX), Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Los Andes. Mérida, Estado Mérida, Venezuela. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2008; 68(1):25-31.
82. M Andújar, M Pavcovich, MA Sánchez, A Torres, MD Arias, JM de Lera, L León, T Hernández. " Prevalencia de la infección cervical por el virus de papiloma humano en la población femenina de Gran Canaria. Estudio poblacional. Resultados preliminares". Servicio de Anatomía Patológica y Unidad de Apoyo a la Investigación. Hospital Universitario Materno Infantil de Canarias. Octubre 2005.

83. Alliance cáncer cervical prevention.”Factores de riesgo de cáncer cervicouterino, indicios hasta la fecha”. ACCP ficha descriptiva.
84. Dra. Elena Kasamatsu. “Cáncer de cuello uterino y virus del papiloma humano en Paraguay. Perspectivas para la prevención primaria”. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 4(2) Diciembre 2006.
85. María Eugenia Cavazza, María Correnti.” Pruebas moleculares para la detección del virus papiloma humano. Desafíos y posibilidades. Instituto de Biomedicina. Instituto de Oncología y Hematología. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
86. Luis Torres, Isabel Varela, Sonia Caballero. “Infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH): Diagnóstico y tratamiento”. Hospital Militar Cnel. Elbano Paredes. Servicio de Pediatría Caricuao. Caracas Venezuela. Rev Informe médico 2001:3 (1):031-044.
87. Nubia Muñoz, Xavier Bosch. “Relación causal entre virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino y consecuencias para la prevención”. Bol oficina sanit panam 121 (6), 1996.
88. “Human Papillomavirus and Related Cancers, BOLIVIA”. World Health Organization. Summary Report Update. January 29.2010.
89. Salvador García Jiménez, MD. Asesor Inmunizaciones OPS/OMS. “Incorporación de nuevas vacunas al calendario: Rotavirus y Papilomavirus”. Regional office of the World Health Organization. Córdoba, Arg. Oct. 2006.