

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD
LABORATORIO DE VIROLOGÍA, INMUNIDAD E INFECCIÓN



**IDENTIFICACION MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y
BIOMARCADORES INMUNITARIOS EN POBLACION FEMENINA: ESTUDIO
PILOTO DE FACTORES BIOLOGICOS ASOCIADOS AL CANCER CERVICAL**

**Trabajo de post grado presentado para la obtención del Grado de
Especialidad en Diagnostico de Laboratorio en Salud, Mención Microbiología**

Elaborado por : Lic. Edith Cumaly Serrudo

Tutor : Dra. Katty Terrazas Aranda

**La Paz- Bolivia
2016**

	DEDICATORIA	
--	--------------------	--

	A Diosito por todo lo que ha brindado en esta vida	
--	---	--

	A mi familia, especialmente a mami que es el pilar fundamental en mi existencia, gracias por su apoyo incondicional y eterno amor	
--	---	--

	<p style="text-align: center;">AGRADECIMIENTO</p> <p style="text-align: center;">Este trabajo no se llevaría a cabo sin el apoyo, orientación, formación y amistad que me dio mi tutor, Dra Katty Terrazas A. quien me enseñó lo fascinante que es la Virología, gracias por todo su tiempo y enseñanza que ha ido enriqueciéndome como persona y profesional.</p>	
--	---	--

INDICE

I. Introducción	1
II. Marco teórico	4
A. El Virus del Papiloma Humano	4
B. Genoma del Virus del Papiloma Humano	4
C. Estructura de Virus del Papiloma Humano	5
D. Replicación y Patogenia del VPH	9
E. Clasificación de los Virus del Papiloma Humano	11
F. Sistema Inmune en el Cáncer Cervical	12
G. Respuesta Inmune contra el Virus del papiloma humano	16
1. Respuesta inmune innata contra VPH	17
a. Citoquinas	19
2. Respuesta inmune celular contra VPH	21
3. Respuesta inmune humoral contra VPH	22
H. Sistema Inmune – Nutrición- Infección	23
I. El retinol en el Sistema Inmune	25
1. Retinol en la respuesta inmune celular	27
2. El retinol en la respuesta celular de los linfocitos T	27
3. Activación de las células de estirpe T por retinoides	28
4. El Retinol en la respuesta celular de los linfocitos B	29
5. El Retinol en las células Natural Killer	31
6. El Retinol y las interleucinas	31
7. Los Retinoides en la apoptosis	33
8. El Retinol en la respuesta inmune humoral	33
9. El Retinol y respuesta inespecífica	34
10. La Inflamación y Retinol	34
J. Hierro en el Sistema Inmune	34
1. Ferritina	35
2. Transferrina	37
3. Deficiencia de Hierro e inmunidad celular y humoral	37
4. Sobrecarga de Hierro, inmunidad e infección	39

5. Relación Hierro, inmunidad y neoplasia	39
6. Respuesta inmunitaria y metabolismo del hierro	40
K. Epidemiología	40
1. Epidemiología del Cáncer cervical	40
2. Epidemiología de la nutrición en Bolivia	42
L. Técnicas de detección de VPH	43
1. Estudio colposcópico	43
2. Estudio citológico	43
3. Estudio molecular	44
4. Hibridación in situ	44
5. Southern Blot	44
6. Dot Blot	45
7. Northern Blot	45
8. Captura de híbridos	45
9. Amplicor	46
10. Linear array	46
11. p16	46
12. Reacción en cadena de la polimerasa	47
a. Etapas reacción en cadena de la polimerasa	48
13. PCR para la detección de VPH	51
14. Ensayo inmunoenzimático	51
a. El ensayo inmunoenzimático tipo sándwich	53
III. Antecedentes	55
IV. Justificación y planteamiento del problema	59
V. Objetivos	61
A. Objetivo general	61
B. Objetivos específicos	61
VI. Material y métodos	62
A. Población	62
B. Criterios de inclusión y exclusión de las participantes	62
1. Criterios de inclusión	62

2. Criterios de exclusión	62
C. Aspectos éticos	62
D. Tipo de estudio	63
E. Flujograma de actividades	63
F. Muestras biológicas para el estudio de VPH - biomarcadores inmunitaria	64
1. Toma de muestra genital VPH screening y VPH alto riesgo	64
a. Identificación de VPH screening	64
b. Identificación de VPH alto riesgo	66
2. Toma de muestra sanguínea capilar	67
a. Detección de los niveles de Retinol	68
b. Detección de los niveles de Hierro	68
G. Análisis de datos	68
VII. Resultados	70
VIII. Discusión	86
IX. Conclusión	92
X. Bibliografía	94

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	Genoma del VPH	5
Figura N° 2	Mecanismo de ingreso del Virus del Papiloma Humano	10
Figura N° 3	Respuesta inmune antitumoral	13
Figura N° 4	Desarrollo tumoral	14
Figura N° 5	Evolución oncogénica	15
Figura N° 6	Respuesta inmune en la infección por VPH	17
Figura N° 7	Nutrición e inmunidad	22
Figura N° 8	Nutrición inmunidad y patógeno	23
Figura N° 9	Puntos clave de la modulación nutricional	25
Figura N° 10	Metabolismo del hierro	35
Figura N° 11	Acción del hierro en la respuesta inmune	38
Figura N° 12	Tasas de incidencia altas de Cáncer de Cuello Uterino	41
Figura N° 13	Etapas del PCR	50
Figura N° 14	Ensayo inmunoenzimático tipo sándwich	54
Figura N° 15	Frecuencia de infección por VPH en muestras genitales	73
Figura N° 16	Frecuencia de infección por VPH de alto riesgo oncogénico	74
Figura N° 17	Tipificación de oncotipos VPH tipo 16, 18 y otros	75
Figura N° 18	Frecuencia de infección por VPH alto/bajo riesgo	76
Figura N° 19	Asociación Retinol y VPH en la población	78
Figura N° 20	Asociación ferritina y VPH en la población	78
Figura N° 21	Asociación receptor soluble de transferrina y VPH en la población	80
Figura N° 22	Frecuencia de uso de métodos anticonceptivos en la población en estudio (VPH alto/bajo riesgo positivas y negativas)	82
Figura N° 23	Frecuencia de la concepción en la población en estudio (VPH alto/bajo riesgo positivas y negativas)	82
Figura N° 24	Frecuencia del estado civil en la población en estudio (VPH alto/bajo riesgo positivas y negativas)	83

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1 Diversidad de Virus del Papiloma Humano y su asociación clínica	12
Tabla N°2 Relación de vitaminas y nutrientes cuya vinculación con el sistema	24
Tabla N°3 Técnicas de diagnóstico de VPH	47
Tabla N°4 Programa de ciclado VPH screening	66
Tabla N°5 Preparación de MIX PCR VPH – AR	67
Tabla N°6 Temperatura, tiempos y numero de ciclos PCR – AR	67
Tabla N°7 Interpretación de resultados PCR – AR	68
Tabla N°8 Preparación de MIX PCR VPH – 16/18	68
Tabla N°9 Tiempos de elución de la muestra y valores de las DO obtenidas	72
Tabla N°10 Relación de los ensayos realizados para determinar el factor de correlación de los niveles de Retinol	73
Tabla N°11 Relación de los ensayos realizados para determinar el factor de correlación de los niveles de Ferritina	73
Tabla N°12 Relación de los ensayos realizados para determinar el factor de correlación de los niveles de Transferrina	74
Tabla N°13 Características sociodemográficas de la población en estudio	75
Tabla N°14 Detección de los niveles de Retinol en la población clasificados en los distintos grupo de VPH (alto/ bajo riesgo positivos y negativos)	79
Tabla N°15 Detección de los niveles de Ferritina en los distintos grupo de VPH (alto/ bajo riesgo positivos y negativos)	81
Tabla N°16 Detección de los niveles de Transferrina en los distintos grupo de VPH (alto/ bajo riesgo positivos y negativos)	82
Tabla N°17 Relación VPH con el uso de anticonceptivos	84
Tabla N°18 Relación VPH con los antecedente ginecoobstetricos	85
Tabla N°19 Relación VPH alto/bajo riesgo con el estado civil	86
Tabla N°20 Relación VPH alto/bajo riesgo con el consumo de tabaco	87
Tabla N°21 Relación de los casos de VPH alto/bajo riesgo con el consumo de alcohol	84

ABREVIACIONES

1.- Cancer Cervical	CC
2.- Virus del Papiloma Humano	HPV
3.- Células Escamosas Atípicas de importancia no determinada	ASCUS
4.- Neoplasia Cervical Intraepitelial	NIC
5.- Respuesta Inmune Adaptativa	RIA
6.- Respuesta Inmune Inespecífica	RII
7.- Célula Presentadora de Antígeno	CPA
8.- Virus Papiloma Humano de Alto Riesgo	HPV AR
9.- Células Natural Killer	NK
10.- Células Langerhans	LC
11.- Factor de Crecimiento Transformante	TGF
12.- Células Dendríticas	DC
13.- Factor de Necrosis Tumoral	FNT
14.- Infecciones de Transmisión Sexual	ITS
15.- Receptor de Células T	TCR
16.- Interleucinas	IL
17.- Linfocitos B procedentes de Sangre de Cordón	CBMC
18.- Células mononucleares de sangre periférica	PBMC
19.- Receptor Soluble de Transferrina	RsTf
20.- Captura de Híbridos	CH
21.- Unidad Relativa de Luz	URL

RESUMEN

Datos mundiales nos indican que cada año se producen en el mundo alrededor de 500.000 nuevos casos de Cáncer Cervical (CC), nuestro país no se queda al margen de esta situación y actualmente se conoce que alrededor de cinco mujeres fallecen al día por esta causa. La razón de esta alta tasa de incidencia de CC se debe a la falta de un programa eficaz de detección temprana y de seguimiento, es por esta razón que este trabajo pretende abordar la patología desde un punto de vista integral.

El principal factor relacionado con el desarrollo de CC es la infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH), que debido a su estructura presenta proteínas que modulan el ciclo celular, provocando una desregulación e inmortalización celular, que incrementa el riesgo de desarrollar lesiones escamosas intraepiteliales de alto riesgo y finalmente cáncer. Aunque este sea un factor primordial, no es la única causa para el desarrollo de CC, ya que si logramos eliminar la infección no se establecería esta patología, a su vez esta es una enfermedad multifactorial, en la que intervienen factores como las coinfecciones, el medio ambiente y el huésped a través de su estado inmunitario que está directamente relacionado con el estado nutricional.

Siendo Bolivia un país subdesarrollado, la población presenta índices de desnutrición elevados tanto en mujeres en edad fértil y en niños, este es un factor predominante a la hora de controlar la infección por VPH, ya que se conoce que las mujeres pasan por la infección una vez en su vida, pero la mayoría de ellas logra eliminar/resolver la infección, si presentan un sistema inmune competente, esta competencia se logra con un óptimo estado nutricional, ya que los alimentos son predominantes a la hora de formar los diferentes componentes del sistema inmunitario, como células de sistema inmune, citoquinas y otros.

Varios estudios han establecido que existe una estrecha relación entre la nutrición y el sistema inmune y que esta asociación repercutiría sobre la prevalencia del virus en los queratinocitos. Los micronutrientes directamente relacionados con una buena respuesta antiviral son el Hierro, Retinol y Zinc, en el presente trabajo se realizó la detección de hierro a través de sus marcadores: ferritina y receptor soluble de transferrina; y retinol a través de la proteína fijadora de retinol, estos dos biomarcadores actúan sobre las células

del sistema inmune optimizando la producción/calidad de estas células especialmente de los linfocitos, además de optimizar la respuesta tipo T herper 1 (esencial para la eliminación viral) y sobre los mediadores celulares (interleucinas), actuando como factores necesarios para que lleven a cabo su actividad.

De acuerdo con esto, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar al Virus de Papiloma Humano y biomarcadores inmunitarios, para determinar su probable asociación en la población en estudio, se realizó la detección de VPH screening (todos los genotipos), VPH Alto riesgo (detección de 14 genotipos de alto riesgo) y VPH 16/18 (detección de los genotipos 16 y 18). Todas estas detecciones a través de la técnica de Reaccion en Cadena de la Polimerasa en punto final. En cuanto a los biomarcadores inmunitarios el estudio realizo la detección de hierro (ferritina y receptor soluble de transferrina) y de retinol (proteína fijadora de retinol) como nutrientes inmunomoduladores de la respuesta inmunitaria antiviral a través de técnicas inmunoenzimáticas.

Para la detección de los niveles de los biomarcadores (hierro y retinol), se realizó la obtención de la muestra mediante la técnica DBS, técnica que utiliza sangre capilar en papel para la detección de cualquier analíto, no es invasiva y requiere una mínima cantidad de sangre del dedo anular.

El estudio, conto con 70 participantes de 15 a 49 años de edad (promedio 34 años), con los siguientes estados civiles: solteras 37/70 (53%), casadas 32/70 (46%) y divorciadas 1/70 (1%), demás según los datos obtenidos, el 84% de las participantes refiere no usar ningún método anticonceptivo o usan métodos que no las protegen de contraer la infección (por ejemplo: uso de pastillas anticonceptivas, ritmo y dispositivos intrauterinos). También se puede indicar que 63% de las participantes tiene en promedio 2 hijos, es decir que la mayoría ha tenido al menos 1 embarazo a lo largo de su vida.

Los resultados del diagnóstico molecular de VPH screening en las 70 muestras genitales, mostro que el 57% (n=40/70) de las participantes fueron positivas a la infección. Toda vez que el ensayo de screninng utiliza primer de consenso (MY09 y MY11) dirigidos a amplificar la región conservada del genoma VPH y por lo tanto identifica todos los

genotipos de VPH tanto alto como de bajo riesgo. A las 40 muestras positivas se procedió a realizar la detección de VPH alto riesgo (prueba que identifica 14 genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66 y 70), siendo el 63% de la participantes positivas para esta detección (25/40), estas muestras positivas fueron analizadas para tipificar VPH 16 y 18 que son considerados los más virulentos en el CC, por lo que es importante su identificación, de esta manera se tiene que el oncotipo con mayor frecuencia es el tipo 16 (n=14/25) que corresponde al 56% de la población, el 16% de la población presenta infección con el oncotipo 18 (n=4/25), solo el 8% de la población presenta coinfección con ambos oncotipos 16 y 18 (n=2/25). El 20% de las participantes fue negativa para estos oncotipos, por lo que prevé que las otras variedades de VPH oncogénicos pueden estar presentes entre esta población (31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 59, y 70).

En nuestro estudio, los niveles de Retinol que se obtuvieron tanto en las participantes positivas y negativas para la infección con VPH estaban en parámetros de normalidad en un 74% (media de 16 mg/dL) y no se estableció asociación estadísticamente significativa. Similares datos fueron encontrados en el estudio prospectivo de Erin et.al., en Brasil que indica que no existiría asociación significativa entre esta proteína y el VPH, y postula que no existirían fuertes nexos entre estos nutrientes antioxidantes y la persistencia del VPH. Sin embargo existe mucha discrepancia entre los resultados hallados en diferentes estudios, De modo similar, este marcador en nuestro estudio no sería un factor causal para que se dé el desarrollo de CC, además podemos percibir que aunque nuestra población no tenga buenos hábitos de alimentación, varios alimentos que se expenden vienen reforzados de contenido de vitamina A, y este aporte tal vez puede ser suficiente para cubrir las necesidades del nutriente en situaciones de infección activa.

La detección de Hierro se realizó a través de los marcadores Ferritina/receptor soluble Transferrina, detectando que los niveles de este marcador se encuentran dentro de la normalidad en un 74% y 77%, respectivamente. Se eligieron estos marcadores porque valoran los depósitos de hierro en el organismo (Ferritina), y la capacidad de captar al hierro (receptor soluble de Transferrina "RsTf") sin que se vea alterado su nivel por las

infecciones que pueda estar cursando el huésped (Stella Coy y cols). Dado que la Ferritina también es un marcador de fase aguda, se puede encontrar elevada en las participantes por otro tipo de infecciones, es por esta razón que para una mejor correlación se realizó la detección de hierro a través RsTf que no se ve afectado por esta situación, en nuestro caso ambas variables se correlacionaron en el estudio observando que no existió diferencias entre ambos marcadores; es decir, que en las participantes que tenían déficit de hierro, ambos marcadores se encontraban disminuidos. (Cascante, Quintana y Cols). Nuestro estudio determinó que el hierro no se encuentra asociado con la infección por VPH en nuestra población, pero es importante ampliar la población en estudio estratificándola por niveles de alteración celular y observando si existe o no depuración viral.

Los otros factores de riesgo como la multiparidad, hábitos de fumar y consumo de alcohol cuales no presentan asociación con la presencia o ausencia VPH a diferencia del uso de métodos anticonceptivos que estarían directamente relacionados con la posibilidad de contraer la infección por VPH.

Finalmente el diagnóstico de cáncer cervical debe realizarse de manera integral tomando en cuenta al agente patológico, ambiente y huésped, de esta manera se lograra realizar un tratamiento dirigido para cada caso en particular.

I. INTRODUCCIÓN

Las últimas recopilaciones de los datos mundiales, indican que cada año se producen en el mundo alrededor de 500.000 nuevos casos de Cáncer Cervical (CC); de estos el 80% corresponde a los países en desarrollo. Se estima que anualmente mueren 275.000 mujeres por esta causa. En Europa el CC es la tercera causa de muerte por cáncer en la mujer, en Latinoamérica el CC es la causa de muerte más frecuente en la población femenina, con aproximadamente 30.000 defunciones por año ⁽¹⁾.

Nuestro país no queda al margen de estos datos, se conoce que ocupamos el segundo lugar de mortalidad por CC en Sudamérica. Según la fundación Boliviana Contra el Cáncer en nuestro país fallecen a diario cinco mujeres a causa del CC y de cada 100,000 mujeres 60 presentan CC ⁽²⁾. Un informe publicado por la OMS revela que en Bolivia el 90% de los fallecimientos por Cáncer Cervical antes de los 60 años, corresponde a personas con ingresos medio-bajos ⁽³⁾. Sin embargo estudios de caracterización del CC en nuestra población que expliquen las causas del desarrollo de la patología son muy limitados.

La razón más importante, que explica esta alta incidencia de CC, es la falta de un programa eficaz de detección temprana y seguimiento, esencialmente en los países en desarrollo. Además, el diagnóstico que se realiza en este programa es enfocado a identificar alteraciones celulares y no aborda el problema de forma integral considerando al agente infeccioso y al huésped ⁽⁴⁾.

Es conocido que la infección persistente por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es la causa principal de desarrollo de CC, representando un problema de salud importante en la población femenina. La infección persistente por VPH y sus genotipos oncogénicos están íntimamente asociados con un subgrupo de cánceres cervicales, vulvares, anales, penianos, de cuello y cabeza.

Aunque se han descrito más de 100 genotipos circulantes de VPH, se han identificado como oncogénicos los VPH tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82,

siendo el VPH tipo 16 el que se ha reportado en más del 90% de los cánceres cervicales en diferentes contextos geográficos ⁽⁶⁾.

A la fecha no existe terapia antiviral anti-VPH, y el 85% de las infecciones producidas por el VPH son controladas o eliminadas naturalmente por el sistema inmunitario competente (la duración media de la infección para los virus de alto riesgo es variable de 8 a 18 meses). Sin embargo algunas de estas infecciones no son eliminadas/controladas, lo que conduce a establecer una infección persistente, incrementando el riesgo de desarrollar lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y finalmente desencadenar en transformación oncogénica o cáncer ⁽⁵⁾. El sistema inmune en condiciones normales, es capaz de controlar y eliminar la infección por VPH debido a la acción de la inmunidad innata, la activación de mecanismos efectores antivirales de una respuesta tipo celular y la síntesis de anticuerpos dirigidos principalmente a las proteínas de la cápside del virión (L1 y L2)⁽⁷⁾.

De lo anterior se entiende que el funcionamiento del sistema inmune es vital para resolver la infección y, por consiguiente, el aporte nutricional influye positivamente en la inmunocompetencia y la resistencia a las enfermedades. El status inmunitario y el status nutritivo son interdependientes y pueden deteriorarse simultáneamente dando lugar a una mayor probabilidad de contraer infecciones y una baja actividad biológica ⁽⁸⁾, lo que conduciría a que el VPH se establezca como infección persistente desencadenando finalmente el CC.

Una óptima nutrición conlleva a que exista una óptima respuesta inmunitaria contra la infección por VPH, y por ende el control/eliminación de la infección. Toda vez que las mujeres con bajo ingreso económico podrían ser las más afectadas ⁽³⁾, en este contexto es importante evaluar el status nutritivo como marcador del status inmunitario y de esta manera coadyuvar a que la población femenina combata de forma efectiva/eficiente esta infección ⁽⁹⁾.

Se ha reportado que entre los factores predisponentes para el desarrollo de CC se incluye el hábito de fumar, el número de embarazos, el número de parejas sexuales, inmunodeficiencias y deficiencias de las vitaminas A, E y C, β -carotenos y otros nutrientes

que modulan la competencia inmunitaria anti-infecciosa ⁽¹¹⁾. Dado que cualquier desequilibrio nutricional afectará en alguna medida la competencia del sistema inmune, las vitaminas tienen un papel esencial en el mantenimiento de la función inmunitaria ⁽¹⁰⁾.

En nuestro país, dadas las condiciones sociales y económicas bajas la población presenta índices de desnutrición elevados ⁽³⁾, lo que podría explicar el hecho de la alta incidencia de infección por VPH y su persistencia ya que no existen procesos inmunológicos eficientes que puedan controlar/eliminar la infección. En este marco, el presente trabajo plantea un estudio piloto con enfoque integral del proceso infeccioso identificando factores biológicos asociados al CC en nuestra población. Para esto, plantea la identificación de infección activa por el Virus Papiloma Humano; la frecuencia de infecciones por oncotipos VPH 16 y 18, y la detección con biomarcadores nutricionales asociados con la inmunidad tales como la vitamina A y el Hierro que actuarían en mecanismos de inmunidad innata y adaptativa relacionados con la persistencia de la infección por VPH.

II. MARCO TEÓRICO

A. El Virus del Papiloma Humano

Los virus del papiloma humano (VPH o HPV del inglés *human papillomavirus*) mide entre 52 a 55nm, pertenece a la familia de los Papillomaviridae. Es un virus de estructura icosaédrica de 72 capsómeras, sin cápsula, posee un DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8 kb ^(6,27).

El VPH es relativamente estable y aunque carece de envoltura, puede permanecer infeccioso en ambientes húmedos durante meses ⁽⁶⁾. Como todos los virus de esta familia, los VPH sólo establecen infecciones productivas en el epitelio estratificado de la piel y mucosas de humanos, así como de una variedad de animales ⁽²⁷⁾.

B. Genoma del Virus del Papiloma Humano

Si se toma como modelo el VPH 16, es posible esquematizar el mapa genómico (Figura N°1). El VPH presenta una estructura de aproximadamente 8000 pb destacando una región temprana (E) que codifica 7 proteínas, una región tardía (L) que codifica 2 proteínas, una región de control largo (LCR).

La LCR está compuesta por 800 a 1000 pb, contribuye una región de control de la regulación genética de VPH, dentro de esta región se encuentra en núcleo 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 el 40% del genoma) contiene dos marcos de lecturas que codifican dos proteínas estructurales L1 mayor y L2 menor relacionados con el ensamblaje de las partículas virales (proteínas de la cápside). Estos genes se expresan en fases finales de la infección y su transcripción está mediada por reguladores celulares de la transcripción, producidos solo cuando la célula escamosa se diferencia ^(6, 7, 32, 34, 35, 36).

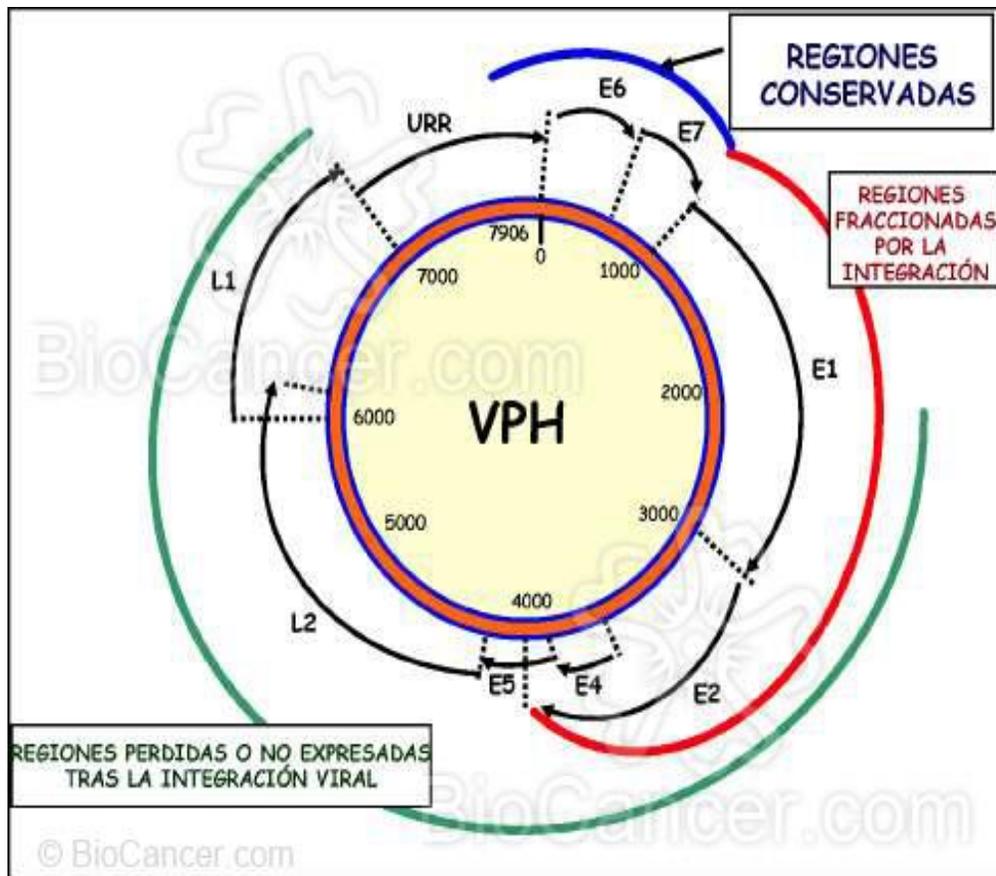


Figura N° 1 Genoma del VPH (Revista Bio-Cancer. com 2012)

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 ^(6, 7, 32, 34, 35, 36).

C. Estructura de Virus del Papiloma Humano

1. Proteína E1

El gen E1 es el más grande y conservado del VPH encargado de codificar la proteína E1, una helicasa hexámerica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral. Estas funciones helicasa y ATPasa hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática ^(3,5,7,32,35).

2. Proteína E2

El producto del gen E es la proteína nuclear 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 ^(3,5,7,32) .

Estas son esenciales en el proceso de replicación celular, controlando el número de copias del virus, al unirse aumentan su afinidad por el DNA; su función depende en gran medida del estado de diferenciación celular y por esto sus mecanismos de función y transcripción no han sido claramente elucidados.

3. Proteína E4

El gen E4, está dentro del marco de lectura de E2 y codifica la proteína E4, esta se expresa a partir de un ARNm procesado de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación del ADN.

4. Proteína E5

El gen E5, codifica la proteína E5 de 84 aminoácidos, hidrofóbica y de membrana, que se encuentra principalmente en el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la membrana citoplasmática; tiene la capacidad de transformar células de mamíferos. 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 epidermal (EGFR) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) al unirse a una subunidad formadora de poros de la ATPasa vacuolar, cuya subunidad forma el poro por el 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 ^(3,6,7,15) .

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 endoplasmático rugoso 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 ^(6,7).

La proteína E5 aumenta la vida de las células, además juega un papel importante en el proceso de immortalización por parte de las proteínas E6 y E7; (cuando se altera la proteína E5 del VPH 16 se disminuye la capacidad de immortalización de este hasta un 10%).

5. Proteína E6

El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb codifica la proteína E6 de 151 aminoácidos, esta coopera con la proteína E7 en la immortalización 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 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).

La proteína p53 tiene por función controlar la progresión del ciclo celular monitoreando la integridad del ADN, normalmente su concentración en 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 aro 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 Mdm 2, que en células normales no infectadas es quien degrada a p53. Este cambio reduce drásticamente la vida media de p53 desde 20 minutos a 3 horas. De tal manera que la célula no detiene su ciclo ante cualquier daño de 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).

6. Proteína 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 en gran manera a la progresión carcinogénica, actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRb (proteínas supresoras del retinoblastoma) involucrado en el control de la replicación celular ^(3,6,7,35).

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), E2F-1 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 acumula el mecanismo de freno, que asociado a la activación de los complejos quinasas dependientes de ciclínas (cdk/ciclínas), llevan a la desregulación del ciclo. E7 también se asocia a otras proteínas supresoras de tumores como p107 y p130. Estas interacciones son las que desregulan el ciclo celular, potencializan la proliferación, la immortalización y finalmente provocan la transformación de la célula ^(3, 6, 7, 35).

7. Proteínas L

Los genes tardíos L1 y L2 codifican proteínas del cápside viral usadas en la producción de los nuevos virus. Las diferencias genotípicas entre los tipos de papiloma virus vienen marcadas por los diferentes aminoácidos que constituyen la proteína L1 (proteína estructural del virus que posee además efecto antigénico).

8. Proteínas L1 y L2

La proteína L1 está compuesta por 504 aminoácidos. El extremo amino lo componen los primeros 19 aminoácidos que son altamente conservados entre los diferentes genotipos sugiriendo que cumplen un papel fundamental en el ensamblaje. L1 es la proteína mayoritaria que conforma la cápside, se expresa después 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 partículas virales maduras ^(3,6,7).

D. Replicación y Patogenia del VPH

El ciclo de los VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas (Figura N°2). El VPH inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones, micro-heridas y abrasiones del tejido.

El virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula 6-Integrina. Una vez ocurrida la infección el virus se establece dentro del núcleo de las células basales. El DNA viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular ⁽³⁰⁾.

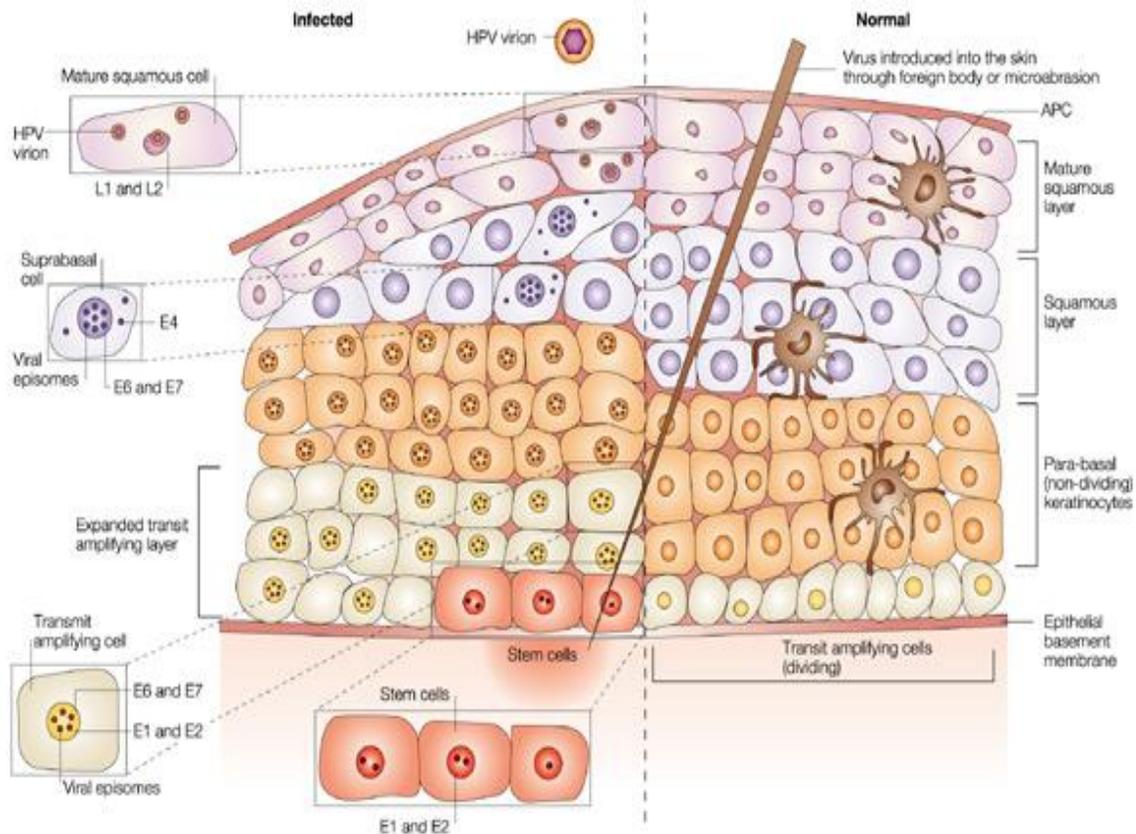


Figura N° 2 Mecanismo de ingreso del Virus del Papiloma Humano

(José Sanabria Revisión bibliografía VPH 2009)

www.google.com.bo/url?sa=l&rct=j&lesrc=s&source=imagenes=&cad=rjd=&doad=ZRURM

Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. El análisis de las moléculas de ARN mensajero viral durante las diferentes etapas de diferenciación de las células infectadas demuestra que la expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos más superficiales, donde también ocurre el ensamblado de las cápsidas virales que dan lugar a la formación de viriones, que al parecer siguen fases bien definidas pero variables en la infección transitoria y en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino que se han determinado por medio de marcadores celulares ⁽³¹⁾.

Los VPH no presentan una fase lítica, por lo tanto se valen de las características propias de las células que los albergan para propagar su progenie, la cual es liberada cuando las células terminales del estrato corneo sufren un proceso de descamación ⁽³⁰⁾.

Cuando se estudian las lesiones histológicas y los marcadores moleculares, en un mismo tipo de lesión histológica puede mostrar diferentes marcadores, y en dentro de una misma biopsia pueden haber diferentes expresiones. Estas anomalías tempranas en el ciclo viral pueden desencadenar el desarrollo de lesiones NIC o del CC. Es decir, los marcadores moleculares pueden constituir técnicas adecuadas para mejor predecir el futuro de las lesiones ^(31, 32).

E. Clasificación de los Virus del Papiloma Humano

Se han identificado alrededor de 100 tipos diferentes de VPH, la mayoría de los cuales no causan ningún síntoma en la mayor parte de la gente. Algunos tipos de VPH pueden causar verrugas o condilomas, mientras otros pueden generar infecciones subclínicas, que pueden (en una minoría de casos) dar lugar a cáncer cervical, cáncer de vulva, vagina en mujeres, o cáncer de ano y pene en varones ^(27,28).

Desde la 6ta década del siglo XX cuando ZurHausen ⁽²⁸⁾ estableció la posible relación en el VPH y el cáncer del cuello uterino se han identificado más de 100 tipos virales y 85 se han caracterizado hasta la fecha, pero solamente 15 se han relacionado con el cáncer el cuello uterino y las lesiones premalignas de esta localización y de otras zonas mucosas. Son los denominados virus del alto riesgo, que tienen alto potencial oncogénico. Un tipo se diferencia de otro en que los aminoácidos estructurales de la proteína mayor L1 de su cápside, presentan una diferencia secuencial superior al 10% ⁽³⁰⁾.

Los VPHs se clasifican en cutáneos y mucosos (Tabla N°1). Los tipos de VPH mucosos asociados con lesiones benignas (tipos 6 y 11 principalmente) son conocidos como tipos de "**bajo riesgo**" y se encuentra preferentemente en los condilomas acuminados, mientras que aquellos tipos asociados a lesiones malignas (tipos 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 y 52, principalmente) son conocidos como virus de "**alto riesgo**".

Entre ellos, los VPH 16 y 18 son los oncogénicos más comunes, que causan aproximadamente el 70 % de los cánceres cervicales en todo el mundo. Otras clasificaciones menos estrictas incluyen a los tipos 56, 58 y 59, 68, 73 y 82, y los tipos 26, 53 y 66 como probablemente carcinogénicos ⁽²⁹⁾.

Tabla N° 1 Diversidad de Virus del Papiloma Humano y su asociación clínica.

HPV	GENOTIPOS	LESION ASOCIADA
Cutáneos	1,2,3,4,10,26,27,28,29,50.	Verrugas comunes de la piel.
Cutáneos	5,8,9,12,14,15,17,19,20,21,22,23,24,25,36,47.	Lesiones cutáneas benignas y malignas en pacientes inmunodeprimidos.
Cutáneos	6,65.	Lesiones cutáneas benignas verrugas pigmentadas.
Cutáneos	7,40,43,48.	Lesiones cutáneas de bajo riesgo, neoplasia intraepitelial de pene.
Mucosos	26,53,69.	Lesiones benignas en mucosas.
Mucosos	18, 39, 45, 57, 59, 68, 16, 30, 31, 33, 34, 35, 51, 52, 56, 58, 62, 64, 66, 67.	Lesiones malignas de alto riesgo en mucosas
Mucosos	6, 11, 13, 32, 42, 44, 54, 55, 70, 74.	Lesiones benignas en mucosas genitales, condilomas, papilomas faríngeos.

Revista médica 2005, Cuba.

F. Sistema Inmune en el Cáncer Cervical

La respuesta inmune está considerada como un mecanismo efector en la resistencia a los tumores y está relacionada desde la fase de iniciación hasta el crecimiento y progresión de éstos ⁽³³⁾ (Figura N°3). Importantes evidencias sugieren que el sistema participa en la eliminación de las células malignas que aparecen en el huésped, probablemente, como resultado de mutaciones espontáneas, exposición a carcinógenos del medio ambiente y activación viral.

Además, tiene una crucial implicación en la progresión de tumores ya establecidos, son más agresivos, generalmente, en aquellos pacientes que sufren inmunodepresión ⁽³⁴⁾. Numerosos reportes establecen que en la respuesta del huésped a la infección causada por VPH (Infección que progresa a cáncer) intervienen tanto los componentes celulares como humorales del sistema inmune ^(35, 40, 41, 42, 43,44).

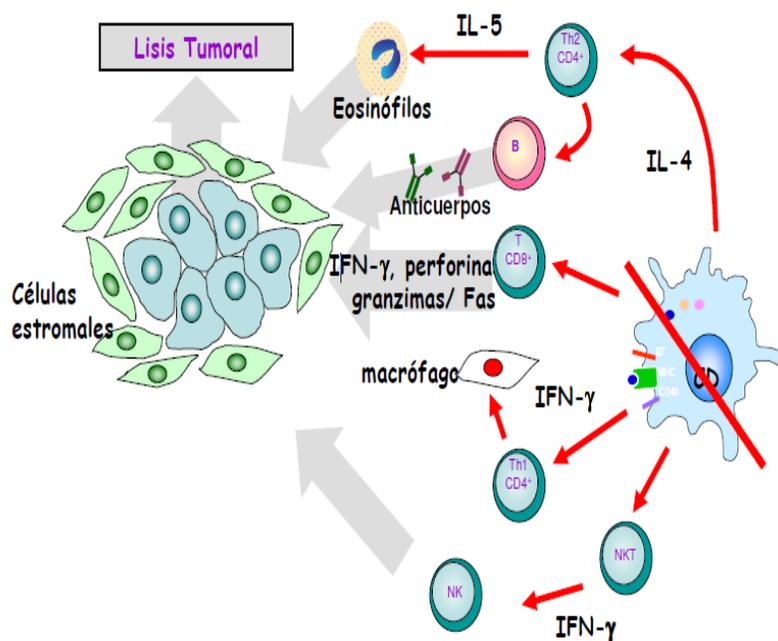


Figura N° 3 Respuesta inmune antitumoral

(Inmunología clínica 2010) exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Tumores.

Las células malignas derivan de tejidos normales que han sufrido transformaciones que conllevan a la célula a una proliferación incontrolada asociada a cambios en el metabolismo y la diferenciación celular, dichas células transformadas invaden tejidos vecinos y con frecuencia colonizan sitios distantes al tejido de origen, fenómeno conocido por metástasis.

La respuesta inmune celular local detectada en estas lesiones se caracteriza por un moderado infiltrado y una invertida y disminuida relación Th/Tc (CD4/CD8), con capacidad de proliferación disminuida ⁽⁴³⁾. Actualmente se ha detectado un desbalance en el patrón de interleuquinas Th1/Th2, dado por un aumento en las interleuquinas (IL) tipo II (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10), supresoras de la respuesta inmune celular y una concomitante reducción en las interleuquinas tipo I (IL-2, INF- γ) en muestras VPH positivo. Diversos estudios muestran un incremento en la concentración de IL-10 y una disminución del IFN-gamma, tanto al nivel transcripcional como proteico. Estas alteraciones traen como consecuencia una pérdida del control sobre determinados genes del VPH 16 y VPH 18 y una desregulación en los mecanismos de presentación antigénica, la expresión de los

antígenos leucocitarios humanos (HLA) se muestra reducida o ausente. En esta entidad existe una ausencia parcial o total de células de Langerhans, consideradas como las presentadoras de antígenos fundamentales en la respuesta inmune contra el tumor ^(43, 44, 45, 46).

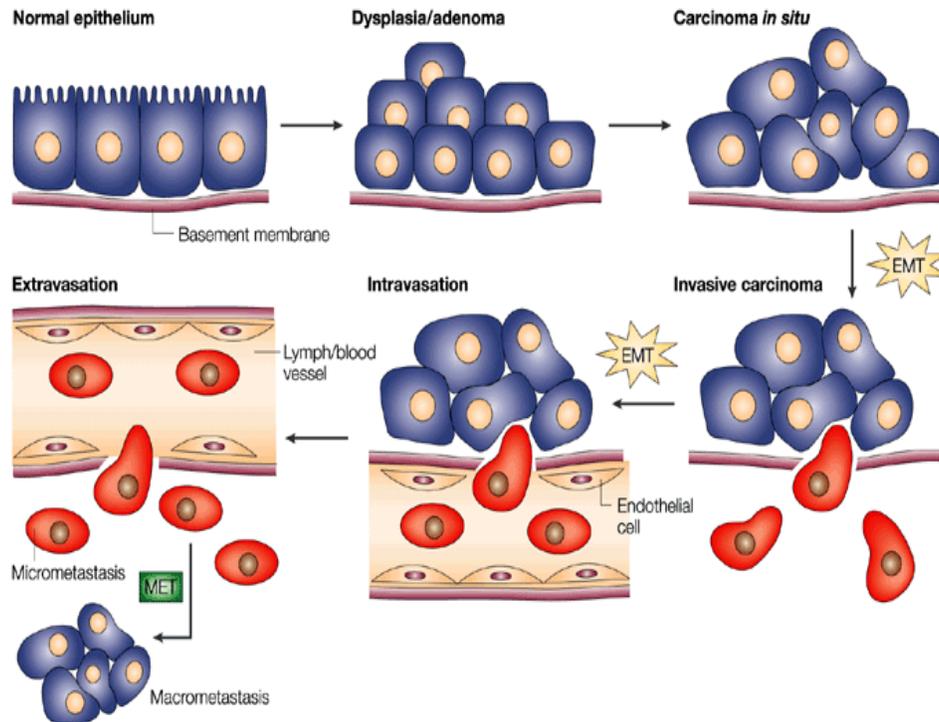


Figura N° 4 Desarrollo tumoral

(Inmunología clínica 2010) exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Tumores.

El infiltrado inflamatorio tumoral relacionado con el carcinoma cervical está formado por linfocitos, macrófagos y eosinófilos, estos últimos ocupan el 40 % del infiltrado. Ciertas interleuquinas como la IL5, e indirectamente la IL4, tienen efecto en la quimiotaxis de los eosinófilos. Además de la producción de interleuquinas por las células tumorales, los linfocitos T y los macrófagos producen estas interleuquinas lo que induce a pensar que el infiltrado de eosinófilos refleja una respuesta Th2 ^(45, 46). (Figura N°4)

El IFN- γ y la IL-2, propios del patrón Th1, son esenciales en la respuesta antitumoral. La IL-2 es el elemento fundamental en la cascada de interleuquinas liberadas durante la respuesta inmune. Aunque muchos linfocitos la producen, son los Th las células

productoras por excelencia, en este sentido, la reducción de las células CD4 es significativo, de lo cual resulta una disminución de la respuesta citotóxica⁽⁴⁶⁾.

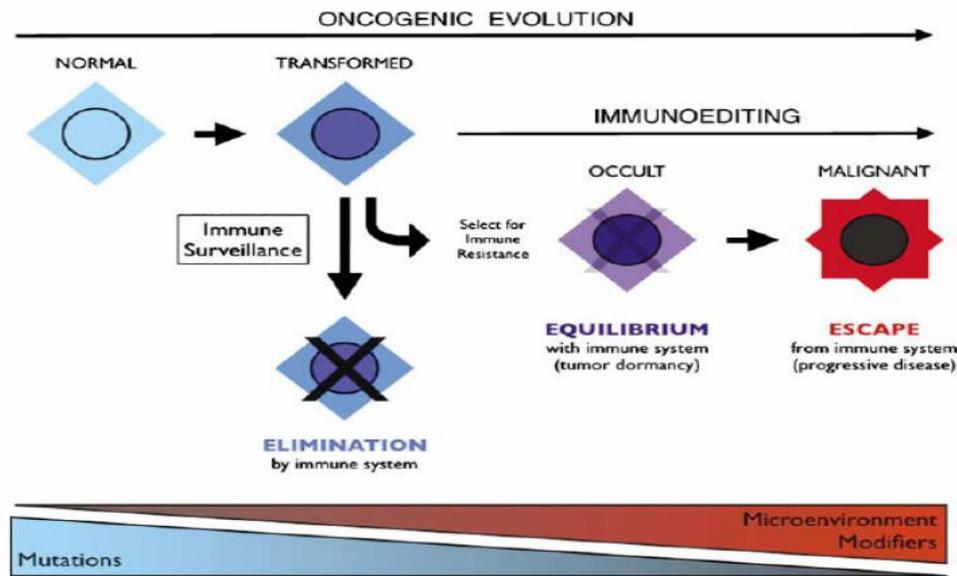


Figura N° 5 Evolución oncogénica

(Inmunología clínica 2010) exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Tumores.

El reconocimiento antigénico de las células con capacidad citotóxica está mediado por receptores. En los linfocitos T este receptor recibe el nombre de "TCR", el cual está formado por un heterodímero de cadenas α/δ y por 4 cadenas ($\epsilon, \delta, \gamma, \epsilon$), que en su conjunto son reconocidos como "CD3". Estos receptores se encuentran asociados, a su vez, con 2 cadenas "zetas", que son las responsables de la transmisión de las señales de activación al interior de la célula. Estas cadenas zetas también se encuentran presentes en el receptor para antígenos de las células asesinas naturales (NK)⁽⁴⁴⁾.

Recientes estudios moleculares han evidenciado una disminuida expresión del dímero formado por la cadena zeta, tanto de linfocitos T como células NK, lo que contribuye a la ineficiencia de los mecanismos efectores del infiltrado linfocitario presente en las lesiones de esta localización. Estos procesos son regulados por factores locales derivados de las células tumorales. Al existir un desbalance de interleuquinas en el microambiente de estas lesiones, pueden detectarse ciertas afectaciones al nivel transcripcional^(44, 45). El infiltrado

linfocitario presente en las lesiones de cuello uterino refleja una respuesta inmune ineficiente.

Aunque se acepta generalmente que los linfocitos T desempeñan una función principal en la inmunidad específica contra el tumor, existen evidencias que las NK proporcionan una resistencia temprana contra las infecciones virales, el crecimiento de tumores y de metástasis. Los estudios en pacientes con cáncer de cervical muestran que las funciones NK están deterioradas en todos los estadios y que, una vez infectadas las células por el VPH, se vuelven resistentes a la lisis por las NK.

G. Respuesta Inmune contra el Virus del Papiloma Humano

En condiciones normales, el sistema inmune es capaz de controlar y/o eliminar más del 90% de la infección por acción de la inmunidad innata, la activación de una respuesta tipo celular y la creación de anticuerpos dirigidos principalmente a las proteínas de la cápside del virión (L1 y L2). A pesar de toda la maquinaria de protección inmune del hospedero, el virus posee estrategias de evasión, conservando un número reducido de copias en las células basales proliferantes y aprovechando la corta vida natural del queratinocito. La respuesta inmune que gatilla el VPH en el organismo es pobre, si se la compara con la que provocan otros tipos de virus. El ciclo de la infección por VPH se relaciona estrechamente con el ciclo de su célula huésped, el queratinocito; el VPH penetra las células suprabasales del epitelio del cuello uterino y mantiene un programa de transcripción viral reprimido en sus genes tardíos, L1 y L2, que son los inmunógenos más potentes del VPH ^(44, 45).

Esta represión permite al virus escapar de la vigilancia y respuesta inmune del huésped. Esto es diferente a lo que ocurre en algunos modelos animales, en los que la infección por VPH es rápidamente erradicada, debido a la expresión de L1 y L2 en todas las capas del epitelio infectado, lo que provoca la llegada de múltiples efectores de la respuesta inmune, como células presentadoras de antígenos y linfocitos T, a la zona de la infección ⁽⁴⁶⁾. La respuesta inmune contra los virus está dada tanto por la respuesta inmune celular como por la humoral.

1. Respuesta inmune innata contra VPH

La primera línea de defensa en las mucosas contra la infección por VPH es la repuesta inmune innata (RII) en la que se desencadena una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células asesinas naturales (NK), citocinas, anticuerpos naturales, e incluso del sistema del complemento, que formarán una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica. Poco después, la RII interactúa con la respuesta inmune adaptativa (RIA) e inicia la respuesta específica con linfocitos T y B. Un gran eslabón para ambos tipos de respuesta es la participación de las células presentadoras de antígenos (CPA).

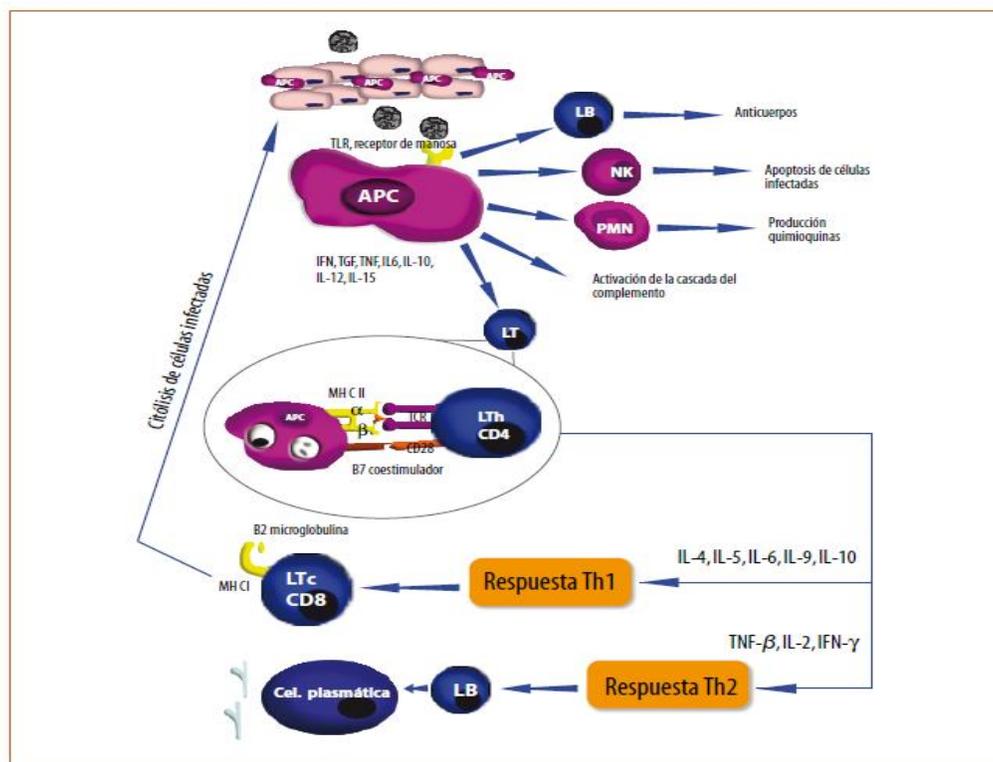


Figura N° 6 Respuesta inmune en la infección por VPH

(Olga Rincon, Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja)

Las células reticulares de Langerhans (LC), y algunos queratinocitos funcionan como células presentadoras de antígenos (CPA). Estas células fagocitan las partículas virales para digerirlas en endosomas y comenzar un proceso de activación, que incluye la presentación

en superficie de cadenas polipeptídicas del antígeno junto con HLA clase II, CD40 y B7, así como la migración a los ganglios linfáticos locales ^(45, 48, 50).(Figura N°6)

Las LC junto con el HLA, moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40), y citoquinas como IL-12 o IL-10, activan los LT nativos y dirigen su diferenciación hacia células efectoras ⁽⁴⁶⁾. La información adquirida por las células dendríticas (DC) dirige la inmunidad mediada por LT ayudadores o citotóxicos, Th1 o Th2. ⁽⁴⁵⁾

Las células NK inducen la apoptosis de las células infectadas por el virus y de las células tumorales, gracias a los activadores e inhibidores de los receptores killer (KIR). Así se da la unión entre KIR y el alelo específico de HLA clase I, complejo que es reconocido y que regula la inmunidad mediada por las NK. Las células normales que expresan abundantes moléculas de HLA clase I son reconocidas por KIR e inhiben la activación de las NK; en células infectadas por virus y células tumorales la expresión del HLA disminuye, llevando a la activación de las células NK y a la citólisis^(47, 48). Las LC son células dendríticas inmaduras de origen mieloide que residen en el epitelio escamoso, incluyendo piel y mucosa genital. Las LC reconocen agentes patógenos, capturan antígenos por micropinocitosis o receptores de manosa, procesan las proteínas capturadas y las transforman en péptidos inmunogénicos, migran del tejido a los nódulos linfáticos y presentan los péptidos en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad a los linfocitos T, iniciando así la respuesta inmune antígeno específica.

a. Citoquinas

Cuando se produce daño en el tejido, el sistema inmune innato envían señales que, junto con las células dendríticas (DC), inician la coordinación de: células efectoras del sistema inmune como monocitos, macrófagos, polimorfonucleares (PMN) y células NK para la protección del tejido mucoso. Su activación induce la producción de moléculas coestimuladoras como las defensinas, interleuquinas (IL), interferones (IFN), factor de

crecimiento transformante (TGF) y factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales ejercen un control directo sobre las células infectadas ^(45, 46, 47).

Cuando se activan, los linfocitos CD4⁺ se especializan, diferenciándose a su vez en linfocitos efectores, que se distinguen por el tipo de citoquinas que producen, de modo que si predomina la IL-12, se promoverá la diferenciación hacia una vía Th1 que inducirá la activación y proliferación de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, la producción de IL-2, e interferón- γ ; por el contrario, si en el contexto local no se expresa IL-12, se promoverá la vía Th 2 que inducirá la activación y expansión de linfocitos B, los cuales evolucionarán, diferenciándose, hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos (Ac) frente a las proteínas virales; por otra parte, se inducirá expresión de interleucinas del tipo IL4, IL5, IL6, IL10. La IL-10, tiene efecto supresor en la inmunidad mediada por células ^(45, 48).

Por otra parte el TGF- β , FNT, y los IFN tipo I (interferón α y β), son productos de varios tipos de células epiteliales y tienen capacidad para inhibir la proliferación de los queratinocitos normales e infectados con VPH, así como también tienen la capacidad de inhibir la expresión de los genes E6 y E7 del VPH. El TGF- β 1 puede ser un regulador autocrino de la expresión génica del VPH de las células epiteliales. FNT producido por los queratinocitos puede tener efecto antiproliferativo en las células infectadas por VPH bloqueando el crecimiento en G0 y G1 del ciclo celular. Los receptores solubles tipo I y II de FNT en suero se encuentran elevados en pacientes infectados con VPH 16 ó VPH 18 asociados a carcinoma cervical ^(48, 49).

Sin embargo, la genética de HLA puede también influir en la susceptibilidad a la infección o la capacidad de eliminar el VPH y del CC es un problema mundial entre las mujeres, y más aún en nuestro país que ocupa el segundo lugar en Sudamérica con mayor incidencia de CCU ^(49, 50). Un estudio de casos y controles realizado en Montreal muestra que el alelo B7 y haplotipos que lo contienen (B7-DQB1*0602, B7-DRB1*1501-DQB1*0602) confieren protección para el desarrollo de NIC III, aunque existe mucha discrepancia entre varios estudios realizados indicando que el alelo B7 tiene un efecto de riesgo/susceptibilidad para desarrollar CC.

Actualmente se realizan campañas de prevención en las cuales no se contempla que el 85% de las infecciones por VPH (agente causal del CC) son resueltas cuando existe una óptima inmunocompetencia, es decir que el sistema inmune es capaz de resolver de manera eficaz la infección.

2. Respuesta inmune celular contra VPH

Una vez que las CPA están activadas, son reconocidas por linfocitos T CD4+, que serán activados, únicamente si existe reconocimiento de todas y cada una de las moléculas de superficie implicadas: HLA clase II a través del propio CD4, el polipéptido viral mediante el TCR, CD40 a través de CD40 ligando y B7 mediante CD28.

Una vez activados, los linfocitos T y B deberán reconocer a las células infectadas, de esta manera los LT lo harán en el contexto del HLA clase I, de lo contrario, no se producirá el proceso de expansión clonal necesario para la elaboración de una respuesta inmunológica eficaz. Los LT CD8 tendrán la capacidad de actuar frente a la infección viral establecida, mientras que las células B plasmáticas producirán anticuerpos contra las sucesivas infecciones por VPH ^(45, 46, 47, 48 ,50).

La mayor parte de linfocitos T (LT) en el epitelio cervical pertenecen al subgrupo de supresor/citotóxico CD8 y, en menor cantidad, al subgrupo de ayudante/inductor CD4, ambos se pueden encontrar en las capas básicas del epitelio escamoso y también pueden estar en grandes números en la zona de transformación ecto-cervical. La expresión de la molécula CD25 (receptor de IL-2) es un signo conocido de activación celular.⁽⁴⁸⁾

En mujeres sanas, el estímulo de los linfocitos periféricos es dado por los fragmentos de los antígenos tempranos E6, E7, y por los antígenos tardíos L1 del VPH que inducen la proliferación de células específicas, sobre todo células de memoria. Una infiltración celular, dada esencialmente por CD4 a la porción C terminal de E2 y macrófagos, con frecuencia se encuentra en condilomas bajo la regresión espontánea, mientras en pacientes con inmunodeficiencia celular adquirida o iatrogénica se observa un mayor predominio de

lesiones relacionadas con VPH, así como una mayor progresión hacia lesiones preinvasivas.^(48,49)

A nivel de cérvix un infiltrado leucocitario a expensas de CD4 favorece la regresión. Pero el predominio es de CD8 puede significar persistencia y la progresión de la infección viral (46, 46, 50, 51).

Las respuestas generadas por la célula T, después de la infección, podrían desempeñar un papel de protección contra la progresión de la infección y lesiones tempranas. Debería entonces considerarse el desarrollo de inmunoterapias que vayan dirigidas a la estimulación de los linfocitos T CD4+ para el manejo de la enfermedad preinvasiva. Las células T activadas inicialmente al contacto con el Ag pueden controlar el reto inicial del virus, pero estas mueren y hay una diferenciación de subclases (memoria), las cuales conforman la respuesta inmune tardía.⁽⁵⁰⁾

Los LT frente a los oncogenes de VPH en neoplasia cervical, se ha centrado en gran parte en la actividad de los LT en sangre periférica. Así, LTh, LT citotóxicos (CTL), interferón y el HLA demuestran actividad de E7 en bajos niveles en pacientes con lesiones o cánceres VPH-persistentes. Los LTC son más abundantes en el sitio de la exposición al Ag y tienen un papel crítico en la respuesta y evolución.

3. Respuesta inmune humoral contra VPH

En seres humanos se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos contra VPH. Entre 50% y 60% de las mujeres infectadas por VPH tienen anticuerpos contra VPH 16. En pacientes portadoras de NIC III asociados a VPH 16 positivo se detectan anticuerpos contra proteínas de la cápside, sin embargo en cánceres invasores VPH 16 positivo, en los que se están expresando proteínas tempranas y no viriones, no siempre se detectan anticuerpos contra VPH.

Estudios de sero-reactividad sugieren que los anticuerpos contra la cápside son inducidos durante infecciones graves o persistentes de VPH y se pierden levemente una vez terminada la infección productiva. Los anticuerpos contra la cápside, por lo tanto, no son marcadores confiables de infecciones por VPH 16, recientes o pasadas, en un individuo. En cuanto a anticuerpos contra proteínas tempranas, las proteínas tempranas de VPH comprenden seis de las proteínas codificadas por estos virus, éstas se expresan en forma coordinada y no se expresan en los viriones maduros ^(45, 46, 48, 50).

H. La interacción Sistema Inmune – Nutrición- Infección

La interacción entre nutrición e inmunidad es un fenómeno apasionante, complejo y bidireccional; los alimentos en general y los nutrientes en particular, ejercen un papel importante en el desarrollo y preservación del sistema inmune, por ello cualquier desequilibrio nutricional afectará en alguna medida la competencia del sistema inmune. ⁽⁵²⁾ (Figura N°7). El primer efecto, y quizá el más significativo, de la nutrición sobre la inmunidad tiene lugar durante el desarrollo de las células del sistema inmune.

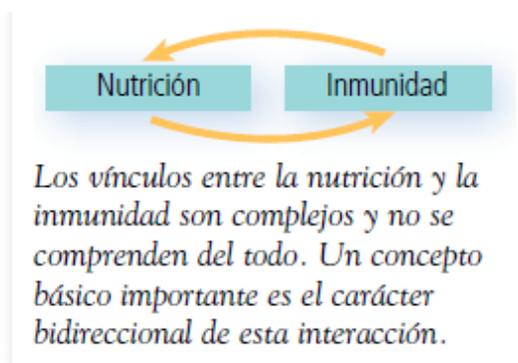


Figura N° 7 Nutrición e inmunidad

(Nicolas Chave, Nutrición e inmunidad).

Este desarrollo se produce durante la vida intrauterina, pero va seguido de un importante período de maduración poco después del nacimiento, que continúa a lo largo de toda la vida. El zinc, las proteínas, los aminoácidos esenciales, la vitamina A y el cobre son algunos ejemplos de nutrientes que pueden comprometer el desarrollo del sistema inmune en caso de una carencia nutricional. Estudios han permitido comprobar que ciertas

vitaminas, minerales poseen un papel esencial en el mantenimiento de la función inmunitaria. Se conoce que las deficiencias por los micronutrientes como el hierro, el zinc y la vitamina A debilitan la respuesta inmunitaria y por ende llega a ser poco eficaz contra las infecciones y respuesta antitumoral. ^(45, 46, 52).



Figura N° 8 Nutrición inmunidad y patógeno

(Nicolas Chave, Nutrición e inmunidad)

Son muchos los estudios que demuestran que una dieta equilibrada refuerza el sistema inmunológico. A continuación se indican cuáles son los nutrientes que afectan directamente al sistema inmunitario.

El aporte de energía debe ser el correcto: ni por encima ni por debajo de las recomendaciones. El aporte excesivo de energía afecta a la capacidad del sistema inmunológico de combatir infecciones, puesto que la obesidad está ligada a una mayor incidencia de este tipo de enfermedades. Se sabe que las personas obesas tienen mayor incidencia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y éstas se hallan vinculadas a trastornos inmunitarios. ⁽⁴⁸⁾

La función inmunológica también se ve alterada en personas que ingieren dietas por debajo de las 1.200 kcal o dietas más ricas en aporte de energía pero desequilibradas. Por lo que respecta a las grasas, una dieta baja en grasas también favorece la salud del sistema inmunitario. Pero no sólo es importante la cantidad, sino también la calidad de estas grasas. Conviene incluir en la dieta pescado azul, frutos secos, aceite de oliva, girasol, soja o linaza para asegurar un aporte equilibrado de diferentes grasas esenciales para la salud. (Tabla N°9)

Tabla N° 2 Relación de vitaminas y nutrientes cuya vinculación con el sistema inmunitario ha sido científicamente demostrada.

(Montse Vilaplana I Batalla, Nutrición y sistema inmunitario)

NUTRIENTE	FUNCION INMUNITARIA	FUENTE ALIMENTARIA
VITAMINA C	Aumenta la producción de Interferon especialmente con actividad antiviral. Necesaria para formar colágeno (contribuye al mantenimiento de las barreras naturales contra las infecciones)	Guayava, kiwi, mango, piña, melón, fresas, cítricos, verduras de la familia de la col, hortalizas.
VITAMINA E	Aumenta la respuesta inmunológica (en pacientes inmunodeprimidos se demostró que tras su administración aumentaba la respuesta inmunológica)	Aceite de germen de trigo, aceite de soya, cereales de grano entero (pan, arroz), aceite de oliva
VITAMINA A	Desempeña un papel esencial en las infecciones y en el mantenimiento de la integridad de la superficie de las mucosas	Hígado, mantequilla, nata, verduras de color verde o de coloración rojo anaranjado.
COMPLEJO B-ACIDO FOLICO	La carencia de vitamina B/Ac. Fólico suprime la respuesta de algunos linfocitos, lo que a su vez acompaña de una disminución de anticuerpos.	Vitaminas del complejo B (alimentos de origen vegetal: verduras, frutas, legumbres). Ácido fólico (Verduras de hojas verdes, legumbres).
FLAVONOIDES	Antioxidantes presentes en numerosos vegetales, algunos potencian la acción de la vitamina C.	Verduras de la familia de la col, verduras de color verde, frutos rojos, moradas, cítricos.
HIERRO	El déficit de hierro es relativamente frecuente y afecta a mujeres jóvenes y embarazadas; disminuye la proliferación (multiplicación y crecimiento) celular y respuesta inmunológica.	Hígado, pescado, huevos
ZINC	Su carencia afecta primordialmente a órganos linfoides.	Mariscos, hígado, semillas de calabaza, quesos curados, legumbres y frutos secos.
SELENIO	El déficit de selenio afecta a la inmunidad reduciendo la actividad bactericida, la respuesta de anticuerpos frente a diversos tóxicos y el desarrollo de linfocitos.	Carne, pescado, mariscos, cereales, huevos, frutas y verduras.

I. El Retinol en el Sistema Inmune

La Retinol desde los días de su descubrimiento fue conocido popularmente como una vitamina antiinfectiosa, teniendo en cuenta que su hipovitaminosis provoca una inmunocompetencia deficiente y un incremento de la susceptibilidad duración y gravedad de las infecciones. Números estudios experimentales y clínicos han reportado la relación sinérgica entre la Retinol y la infección, basándose en dos mecanismos fundamentales:

- Afectaciones en las barreras epiteliales que provocan alteraciones en la diferenciación celular y permiten la entrada de agentes infecciosos.
- Afectaciones del sistema inmune que producen una respuesta ineficiente a la infección.

Muchas infecciones inician con la invasión local de la superficie epitelial como en el caso del VPH, estudios recientes han indicado que la suplementación con vitamina A deben realizarse con precaución pues puede estar asociada con una activación viral que puede conducir a efectos inmunológicos adversos (aspectos que aún se estudian) ⁽⁵³⁾.

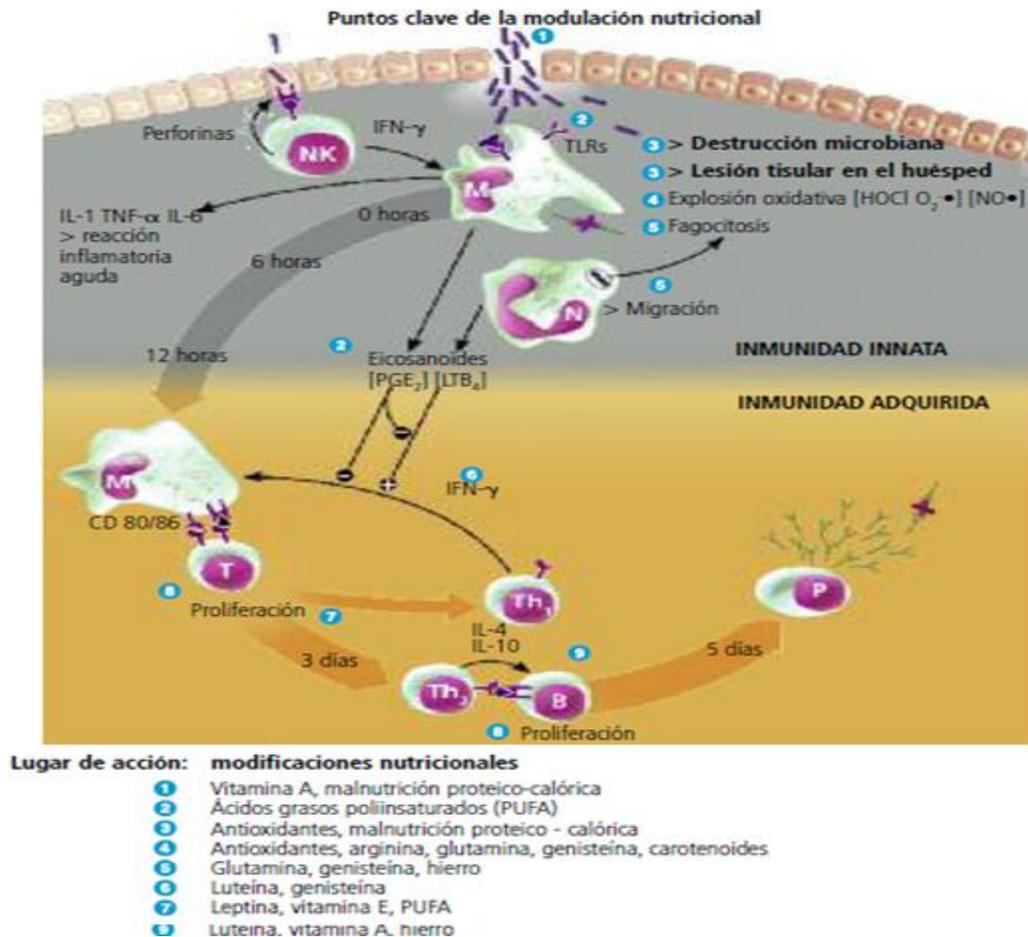


Figura N° 9 Puntos clave de la modulación nutricional

(Nicolas Chave, Nutrición e inmunidad)

También se ha visto que los retinoides están relacionados con la expresión génica y la síntesis de glicoproteínas estructurales de las células epiteliales, como las mucinas y queratinas, aspectos que pueden justificar las afectaciones que se producen en las mucosas por la deficiencia de vitamina A ^(54,55).

1. Retinol en la respuesta inmune celular

La respuesta linfoproliferativa de células frente a mitógenos ha sido estudiada en hipovitaminosis donde la deficiencia en la síntesis de ácidos nucleicos y la respuesta a mitógenos se ha asociado con defectos en la síntesis de glicoproteínas de membrana que forman parte de la membrana de los linfocitos, lo cual incide desfavorablemente en la respuesta mediada por células ⁽⁵⁶⁾.

En sangre periférica, la afectación de respuesta mitógena de células T no se convierte en aparente hasta que exista una deficiencia de vitamina A bien establecida. La deficiencia de Retinol reduce la actividad de las células NK, disminuye la producción de interferón, reduce la efectividad de la actividad de los macrófagos que fijan grasa y disminuye la respuesta de linfocitos estimulados por mitógenos. Provoca defectos en la barrera cutánea (metaplasia escamosa), linfopenia, disminución de la producción de anticuerpos, disminución de las respuestas Th2, disminución de la maduración de los neutrófilos y de los macrófagos, todo esto conllevaría a que se produzca un aumento a la sensibilidad a las infecciones ⁽⁵⁴⁾.

2. El Retinol en la respuesta celular de los linfocitos T

El ácido retinoico controla la diferenciación de varios tipos celulares, aunque los mecanismos implicados en el desarrollo de la célula T todavía no se han dilucidado plenamente.

Las múltiples etapas del desarrollo de los timocitos a linfocitos T maduros están marcadas por: la adquisición de un fenotipo de célula madura, su proliferación y el rescate selectivo

de determinados timocitos de la muerte celular. Se ha comprobado como el ácido retinoico inhibe la maduración tímica, manteniendo a los timocitos en un estadio de inmadurez caracterizado por el fenotipo CD3(-) CD4 (-). Es decir, la supervivencia selectiva, la muerte celular y la conversión fenotípica son eventos que pueden estar regulados muy finamente por estímulos extracelulares como el ácido retinoico ^(48,49).

A pesar de la influencia teratogénica del ácido retinoico sobre el desarrollo tímico en humanos y en roedores “in vivo”, su papel en la diferenciación de la línea linfocítica T aún no ha sido suficientemente establecido, aunque cada vez se están encontrando más evidencias del papel del ácido retinoico en el desarrollo tímico. Se ha demostrado la expresión de los genes RAR en células estromales del timo, y en células linfocíticas (precursores tímicos doble negativos CD4(-) CD8(-))^(48,49)..

La adición de ácido retinoico a células estromales estímulas doble negativas, produce una reducción significativa de los timocitos doble positivos (CD4+CD8+). Esta reducción en la maduración de las células doble positivas causada por el ácido retinoico puede también reflejarse en su capacidad de reducir una fuente de células en expansión “in vivo” y proporcionar así un mecanismo de regulación del número de células viables para la subsiguiente selección. El proceso de maduración tímica también puede ser regulado por ácido retinoico debido a una inhibición de la apoptosis tímica inducida a través de CD3 así, el control fisiológico del balance proliferación/apoptosis por el ácido retinoico minimizaría la expansión clonal aberrante sin comprometer la eficacia de la misma. La desregulación de estos procesos sería responsable de los efectos teratogénicos de los retinoides resultando en hipoplasia tímica asociada con depleción tímica y deterioro del desarrollo, funcionalismo celular de la línea T. ^(48,49, 52).

3. Activación de las células de estirpe T por retinoides

Se ha demostrado que los retinoides pueden ser cofactores importantes en la activación de células de linaje T. Sobre timocitos humanos se ha visto que el ácido retinoico mejora la respuesta proliferativa mediante un incremento de la expresión del receptor de la IL-2, que

aumentaría la proliferación celular vía IL-2/IL-2R. Aparentemente, el ácido retinoico incrementara la expresión del receptor de la IL-2 sobre timoblastos pero no sobre blastos de linfocitos periféricos. Estas diferencias, junto con la observación que los timoblastos han reducido generalmente su respuesta proliferativa a IL-2 cuando se comparan con blastos de linfocitos periféricos, indican una diferencia fundamental en la regulación de los receptores de IL-2 y la utilización de la IL-2 por los linfoblastos derivados de los dos compartimentos. En ambos casos las células que proliferaron fueron predominantemente CD8(-), CD4(-), lo que concuerda con los datos que demuestran que son las células CD4 las que producen principalmente la IL-2 durante la estimulación inmune, pierden rápidamente la capacidad de responder a IL-2, quizás para limitar su propio crecimiento ^(48,49, 52) ..

Se ha demostrado que el ácido retinoico aumenta la expresión de las dos cadenas inducibles del receptor de la IL-2: IL-2R alfa e IL-2R beta. En la cadena IL-2R alfa se observa que el aumento de su expresión se asocia al mantenimiento normal de su estabilidad. También se ha confirmado el aumento de expresión de proteína y de transcritos de mRNA de la otra cadena inducible del receptor de la IL-2 (IL-2R beta). Por el contrario, en linfocitos de sangre periférica el ácido retinoico parece no mediar una respuesta proliferativa por no verse afectado el receptor de la IL-2. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que una población de linfoblastos generados de linfocitos T periféricos purificados pueden llegar a ser tan respondedores como los timoblastos cuando se coestimulan con ácido retinoico. Se cree que la pérdida de respuesta de los linfocitos de sangre periférica podría estar mediada por una serie de linfocinas secretadas por las células accesorias que acompañan a las células T, lo que sugiere que la alteración en la expresión de los receptores de interleucinas (no sólo por aumento de expresión del receptor de la IL-2), podría ser el mecanismo principal por el cual el ácido retinoico influye en la respuesta inmune ⁽⁵²⁾

4. El Retinol en la respuesta celular de los linfocitos B

La mayoría de los estudios realizados “in vivo” en linfocitos de sangre periférica muestran al ácido retinoico como un factor estimulador del sistema inmune. En cambio, en experimentos “in vitro” empleando linfocitos aislados los resultados pueden, ser equívocos.

Los retinoides pueden o no tener un papel estimulador, o inhibidor sobre los linfocitos B. Estas discordancias pueden deberse a los distintos modelos celulares empleados y a las distintas concentraciones de retinoides utilizadas^(48,49, 52).

Las isoformas de ácido retinoico inhiben la síntesis de precursores de células B a pesar de la estimulación con potentes activadores de la proliferación de las células B como son la ionomicina. Hay estudios donde el efecto inhibidor de los retinoides parece estar mediado por el TGF, bloqueando la acción del TGF con anticuerpos monoclonales, se comprobó que la adición de ácido retinoico tenía efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las pre-B, lo que indica una acción directa de los retinoides^(48,49, 52).

Durante estos últimos años se sabe que la apoptosis juega un papel importante en el desarrollo funcional del sistema inmune en el compartimento de LB y LT. Descubrimientos recientes demuestran la existencia de procesos apoptóticos espontáneos en los linfocitos B humanos en reposo, que pueden ser inhibidos por dosis fisiológicas de ácido retinoico.

Tanto los precursores de las células B como los linfocitos B de sangre periférica responden a dosis fisiológicas de ácido retinoico, por lo que el efecto de los retinoides en la inmunidad mediada por linfocitos B puede alterar el balance crecimiento/apoptosis. Diferentes estudios han demostrado los efectos del ácido retinoico en la inmunidad mediada por anticuerpos. En pacientes con inmunodeficiencia variable común se ha comprobado que el tratamiento con ácido retinoico induce en sus células B la expresión de un fenotipo mucho más diferenciado e incluso una corrección parcial en sus niveles de inmunoglobulinas⁽⁴⁸⁾.

Cultivando células B inmortalizadas con el virus de Epstein Barr (EBV) en presencia y ausencia de ácido retinoico durante 6 días, se observó al final del cultivo una disminución de la proliferación en ausencia de ácido retinoico del 43% respecto a las células crecidas con ácido retinoico. El número de linfoblastos B no es el responsable del aumento en la síntesis de inmunoglobulinas en los sobrenadantes de cultivo. Buscando un factor soluble se encontró que la IL-6 estaba aumentada (unas 40 veces) en los sobrenadantes de las líneas EBV que se habían cultivado con ácido retinoico respecto a las líneas control⁽⁶⁰⁾.

Utilizando linfocitos B procedentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que fueron estimuladas con SAC (*Staphylococcus aureus* de la cepa Cowan 1, que es un mitógeno de las células B) se observó un aumento en la producción de IgG de unas 16 veces al añadir diferentes retinoides (Retinol y ácido retinoico) a una dosis óptima, no observándose ningún efecto en la producción de otras inmunoglobulinas (IgA e IgM). Por el contrario, utilizando linfocitos B procedentes de sangre de cordón (CBMC) estimulados igualmente con SAC se observa un aumento en la síntesis de IgM de unas 6 veces al añadir retinoides respecto al cultivo control ^(48,59).

Estos resultados concuerdan con otros donde se muestra que las CBMC producen sólo pequeñas cantidades de IgM (y nada de IgG o IgA) en respuesta a activadores policlonales de células B. Por tanto, es coherente que el ácido retinoico aumente solamente la síntesis de IgM; por el contrario, en PBMC de individuos adultos (que son principalmente células B productoras de IgG), los retinoides incrementan la producción de IgG. ⁽⁶⁰⁾

5. El Retinol en las células Natural Killer

Se ha comprobado un aumento de la funcionalidad celular MC (citotoxicidad NK) en mujeres afectadas de cáncer de mama que fueron tratadas con el retinoide sintético N-(4-hidroxifenil) retinamida (4-HPR), respecto a las no tratadas. El efecto producido fue nuevamente sobre la funcionalidad NK no viéndose afectado el número de células NK circulantes ⁽⁵⁹⁾.

6. El Retinol y las interleucinas

La función inmune es regulada en parte por la acción de citocinas. Se han establecido 2 patrones de secreción de citocinas que corresponden con dos tipos funcionales de células T cooperadoras (Th). Los linfocitos Th1 secretan linfocinas que son importantes en la respuesta inmune celular mientras que los linfocitos Th2 secretan linfocinas importantes en la respuesta inmune humoral. Cada tipo celular regula el crecimiento y la actividad del otro. Así, las células TIC producen IL-10 (la cual inhibe la producción de IFN- γ por células

presentadoras de antígeno) e IL-4 (la cual inhibe el desarrollo de las células Th1). Igualmente, las células Th1 producen IFN- γ el cual inhibe la proliferación celular de las células TIC ^(48, 49 59, 60).

Se sabe que el ácido retinoico puede llegar a regular a nivel transcripcional la producción de interleucinas en algunos casos debido a la existencia en los promotores de sus genes de elementos de respuesta a ácido retinoico (RAIREs). Según las circunstancias (el sistema celular empleado, el estado de activación, la concentración de retinoides utilizada) los retinoides podrían estimular la inflamación local, o bien podrían tener efectos anti-inflamatorios. Podrían suprimir las reacciones de hipersensibilidad retardada inhibir la migración de neutrófilos y eosinófilos y disminuir la capacidad presentadora de antígenos por células epiteliales. Todos esos efectos resultarían, al menos en parte, de la capacidad de los 3,2 retinoides de inhibir la producción de interleucinas como IL-2 e IFN- γ . ^(48,61)

En estados de hipovitaminosis A hay un desplazamiento del equilibrio de las poblaciones celulares Th1-Th2 hacia un exceso de Th1 que conlleva a una funcionalidad insuficiente de la población TIC. Estudios realizados en humanos y otros animales han correlacionado el déficit de vitamina A con el incremento en la susceptibilidad a infecciones ^(59,60).

Para determinar las bases celulares del defecto funcional asociado a la deficiencia de vitamina A se estudió la alteración en la producción de IFN- γ , observándose que a todas las concentraciones de antígeno testadas, las células T deficientes en vitamina A secretan mayor cantidad de IFN y que los controles normales, no viéndose alterado el patrón de secreción de IL-2 e IL-4. Un mecanismo potencial para la regulación transcripcional del IFN- γ vía vitamina A sería a través de los receptores nucleares del ácido retinoico ^(48,61).

7. Los Retinoides en la apoptosis

En este proceso la apoptosis o muerte celular programada está implicada en numerosos procesos biológicos del desarrollo, de la homeostasis y en diversas patologías. La apoptosis se puede producir en los linfocitos tras la estimulación a través del receptor antigénico. Esta

estimulación es una señal que normalmente va asociada a la activación linfocítica y a la proliferación celular; sin embargo, en ciertos casos conduce a apoptosis; la apoptosis es uno de los mecanismos implicados en la selección negativa de los timocitos deleción periférica de células T maduras y pérdida de células T no infectadas en la patología del SIDA ^(48,49,59).

La apoptosis en células T ocurre mediante la inducción de la expresión de dos moléculas, Fas (CD95) y FasL (Ligando del Fas) los cuales deben de interaccionar para que se traduzca la señal apoptótica al interior celular. Se ha encontrado que ambas moléculas se inducen en las 4 primeras horas tras la activación celular y que la apoptosis puede llegar a ser bloqueada por inhibición competitiva de FasL. El mecanismo molecular por el cual se inhibe la apoptosis implica al *9-cis* RA que es capaz de inhibir la expresión de FasL tras su activación, sin embargo, los retinoides no parecen tener ningún efecto significativo sobre la expresión de Fas. Aunque el ácido *9-cis* retinoico inhibe la expresión de FasL a nivel de mRNA y de proteína no se ha probado que esto ocurra a nivel de la transcripción ^(48,49,59) ..

8. El Retinol en la respuesta inmune humoral

Los efectos de la deficiencia de vitamina A sobre la inmunidad humoral han sido evaluados y se han obtenido resultados contradictorios, aunque se considera que la vitamina A y sus compuestos relacionados tienen efectos moduladores sobre la función de las células B ⁽⁵⁷⁾.

Estudios obtenidos *in vitro* con linfocitos humanos describen la posible función del ácido retinoico en la regulación de la transcripción del gen de la IL-2, lo que presupone su relación con la respuesta mediada con esta citocina, fundamental en la inmunidad mediada por las células T, la respuesta de anticuerpos y la activación de linfocitos asesinos “NK” ⁽⁵⁸⁾. Aunque investigaciones recientes han mostrado que la vitamina A inhibe sólo la secreción de citocinas tipo 1 (IFN- γ , IL-2) por medio de la inhibición de la actividad de la proteinkinasa C. Estudios *in vivo* han indicado que las células de ratones deficientes de vitamina A sintetizan menos IL-4 e IL-5, lo que influye en la disminución de la respuesta humoral ⁽⁵⁹⁾.

9. El Retinol y la respuesta inespecífica

Se describe que la deficiencia de vitamina A tiende a reducir la fagocitosis por parte de los macrófagos, su participación se da en diferentes etapas del proceso, pero con mayor intensidad en los mecanismos oxígeno dependientes ⁽⁶⁰⁾. Este proceso se ha verificado en estudios que describen afectaciones marcadas en los mecanismos de respuestas innatas en modelos experimentales ocasionados por la deficiencia de vitamina A, estos estudios confirman que a pesar que hubo un incremento en la actividad fagocítica y microbicida fue significativamente disminuida en comparación con el grupo control ⁽⁶¹⁾.

10. La Inflamación y Retinol

En los casos de infección con una ingestión inadecuada de vitamina A se bloquea la síntesis de proteínas transportadoras de Retinol, disminuyendo la disponibilidad de esta vitamina en los tejidos ^(48, 61) y se incrementa la excreción de Retinol en la respuesta aguda propia del proceso inflamatorio. Como consecuencia de la estimulación inflamatoria, el sistema inmune produce moléculas oxidantes que se liberan con el objetivo de eliminar el agente causal ^(48,49,59) ..

J. Hierro en el Sistema Inmune

El hierro (Fe) se clasifica químicamente como un metal de transición: su estructura orbital (electrónica) le permite cambiar fácilmente su estado de oxidación mediante la pérdida o ganancia de un electrón, por lo que se encuentra bajo la forma de dos formas iónicas: la ferrosa (Fe +2) y la férrica (Fe +3). Esta característica le confiere excelentes propiedades para participar en procesos biológicos de óxido-reducción, de gran importancia para el metabolismo celular

En los sistemas biológicos el hierro suele encontrarse unido a proteínas llamadas metaloproteínas férricas, las cuales pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- a) Aquellas que forman complejos reversibles con Fe (Ferritina, Transferrina y lactoferrina).
- b) Las que tienen capacidad de combinarse reversiblemente con el oxígeno (hemoglobina, mioglobina).
- c) Las que tienen función enzimática, especialmente las que participan en funciones de óxido-reducción (citocromos, ribonucleótido reductasa).

El Hierro en la inmunidad manifiesta tres aspectos fundamentales. En primer lugar, dentro de los procesos de inmunidad innata, parte de los mecanismos microbicidas dependen del funcionamiento de moléculas férricas, en segundo lugar, es un elemento necesario para la proliferación y maduración de las células inmunitarias (células Natural killer) y el tercer aspecto es la capacidad que tiene el organismo, a través de proteínas tales como la Transferrina y la lactoferrina de reducir la disponibilidad de hierro para consumo por elementos infecciosos ^(65, 69).

1. Ferritina

La Ferritina es la principal proteína almacenadora de hierro en los vertebrados. Se encuentra principalmente en el hígado, bazo, mucosa intestinal y médula ósea. Está constituida por una capa externa de proteína soluble, la apoFerritina, y un interior compuesto por hidroxifosfato férrico.

La molécula de Ferritina consiste de 24 subunidades proteicas, cada una con un peso molecular de 20000 D. La principal función de la Ferritina consiste en acumular hierro intracelular, protegiendo así a las células de los efectos tóxicos del hierro no conjugado; también representa un reservorio de hierro fácilmente liberado ^(65, 69).

La Ferritina en el organismo se encuentra más abundantemente en los hepatocitos y en el sistema retículo endotelial del hígado, del bazo y de la médula ósea. Pequeñas cantidades de Ferritina también se encuentran en el corazón, en el páncreas y en los riñones. Pequeñas pero significativas cantidades se encuentran en el suero humano. El papel exacto de la

Ferritina sérica no se conoce, sin embargo existe una estrecha correlación entre las concentraciones séricas de esta proteína y el estado de las reservas corporales de hierro. El medir los niveles séricos de Ferritina es por lo tanto un método simple y no invasivo de evaluar el metabolismo del hierro^(65, 69).

La tendencia de la concentración sérica de Ferritina refleja las variaciones en el balance de hierro debidas a la edad y al sexo. En sujetos normales los niveles promedio son ligeramente mayores al momento del nacimiento. Posteriormente disminuyen durante toda la infancia hasta que se alcanza la pubertad. Subsecuentemente se observa un incremento progresivo en las reservas de hierro en el cuerpo del varón, con el consecuente aumento de los niveles de Ferritina^(65, 67, 69).

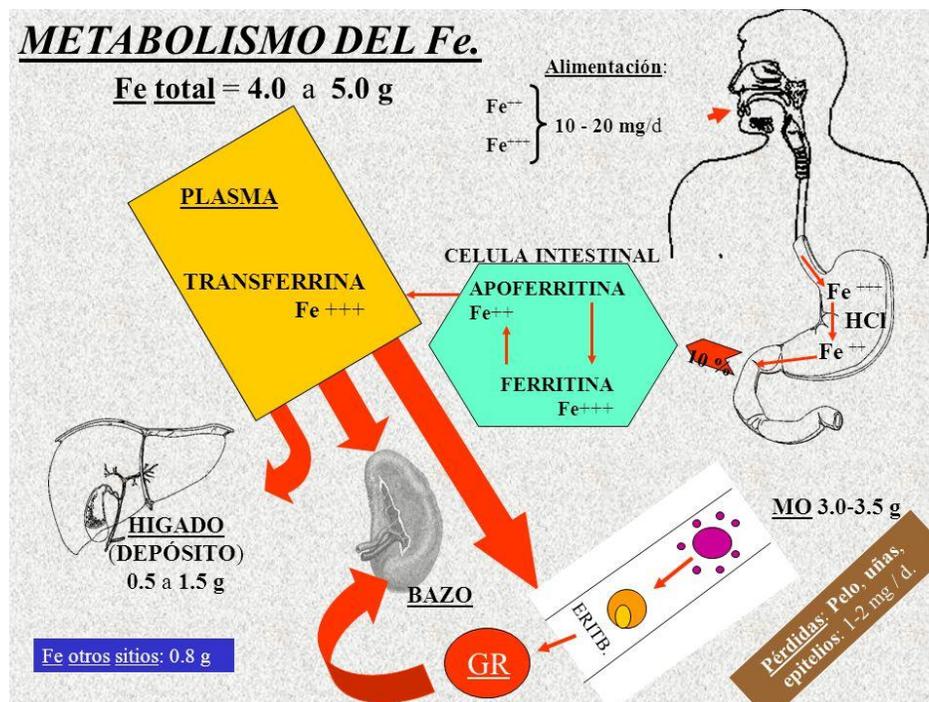


Figura N° 10 Metabolismo del hierro
Dr. Mario Gutierrez Hosp. de Mexico

En mujeres en edad reproductiva se observan valores más estables hasta la menopausia, cuando la ferritinemia tiende a aumentar. Los niveles de Ferritina por debajo del rango normal claramente indican deficiencia de hierro, por lo que permiten el diagnóstico diferencial entre anemia por deficiencia de hierro y sin deficiencia de hierro.

La sobrecarga de hierro, ya sea por aumento de la ingestión del mismo (como en la hemocromatosis idiopática) o por transfusiones múltiples, da lugar a un incremento en los niveles de Ferritina en el suero, los cuales con frecuencia son mucho mayores que los rangos normales. Niveles elevados de Ferritina también se pueden encontrar en diversas condiciones clínicas como: enfermedades del hígado, procesos infecciosos así como inflamatorios, leucemia, enfermedad de Hodgkin y otras neoplasias ^(65, 67, 69) ..

2. Receptor Soluble de Transferrina

El receptor soluble de Transferrina está presente en los reticulocitos y es liberado de la membrana cuando el reticulocito madura. En la deficiencia de hierro se produce un aumento proporcional del número de receptores de Transferrina siendo un marcador precoz de deficiencia de hierro que permite diferenciar, además, anemia ferropénica de la anemia de enfermedad crónica. El receptor soluble de Transferrina ofrece la ventaja, para evaluar el estado de hierro celular, de no alterarse en situaciones de enfermedad aguda o crónica ^(65, 67, 69) ..

Está constituido por dos cadenas de aminoácidos de 95 KD. Ambas permanecen unidas por dos puentes disulfuro que están situados en el dominio extracelular pero cercano a la membrana. Cada cadena tiene un dominio citoplasmático de 61 aminoácidos que corresponde a la diferencia de la mayoría de los receptores de membrana, al segmento N-terminal, un dominio trans-membrana de 28 aminoácidos, y un dominio extracelular de 671 aminoácidos que corresponde al segmento C-terminal. El dominio intracelular está íntimamente implicado en el proceso de internalización del complejo hierro-Transferrina receptor y formación de vesículas. El dominio extracelular está implicado en la unión específica del receptor a la Transferrina y en la afinidad por la misma ^(65, 67, 69) ..

El gen que codifica al receptor de la Transferrina se encuentra en el cromosoma 3, en la misma región donde se localiza al gen de la Transferrina. La síntesis completa de la proteína implica también modificaciones postranscripcionales. Como consecuencia la estructura final, el receptor de la Transferrina presenta tres cadenas de oligosacáridos,

acilaciones que favorecen la unión covalente a ácidos grasos, y fosforilaciones. Los hidratos de carbono representan el 5% del peso molecular de la Transferrina^(65, 67, 69).

3. Deficiencia de Hierro e inmunidad celular y humoral

La importancia de la deficiencia de hierro en la inmunidad se pone en manifiesto cuando existe una deficiencia del metal. Es ampliamente conocido que la deficiencia de hierro afecta de manera notable a la eritropoyesis, reflejando de esta manera, el mayor requerimiento de este proceso, puesto que alrededor del 70% del hierro es utilizado en la formación de hemoglobina. Pero además, también afecta a otros sistemas, notablemente al sistema nervioso, el sistema inmunitario y las mucosas^(66, 68, 70).

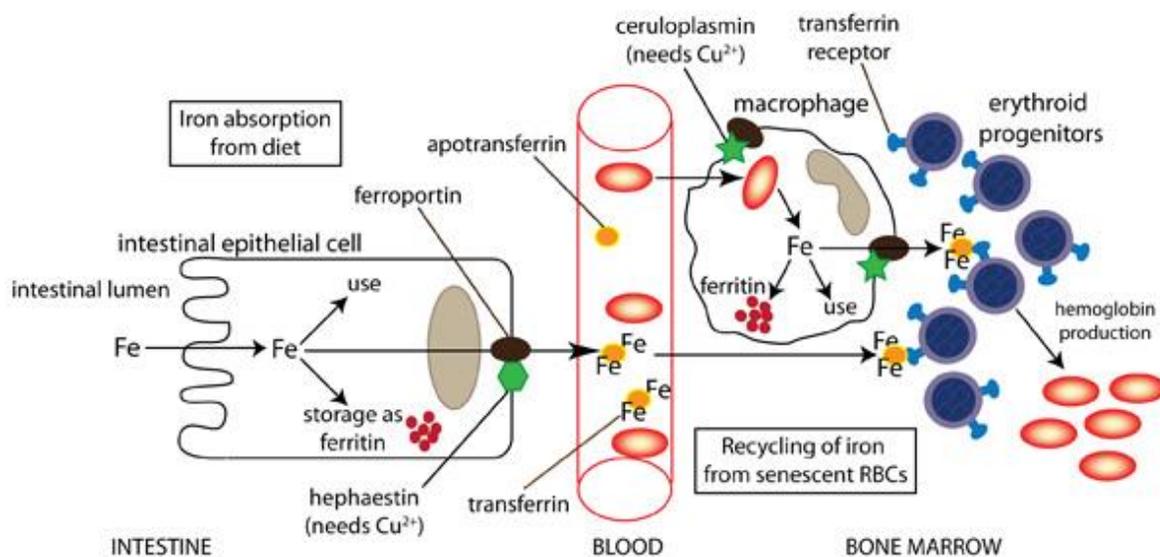
Las alteraciones inmunitarias celulares asociadas con la deficiencia de hierro en estudios clínicos son variadas: reducción de la reacción de hipersensibilidad tardía frente a diversos antígenos disminución de la capacidad proliferativa de linfocitos en respuesta a antígenos^(66, 68) y reducción del número de linfocitos naturales. Estas observaciones han sido confirmadas en modelos experimentales en ratas, ratones y cobayos, en donde además se ha observado una disminución en la celularidad de órganos linfoides, tales como bazo, timo y ganglios linfáticos.

Es posible que todas estas observaciones puedan explicarse por una disminución de la capacidad proliferativa de las células linfoides debido a la reducción de la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa, cuya consecuencia es la reducción en la síntesis de ADN. Con respecto a la inmunidad natural mediada por células NK (asesinas), en ratas y ratones que han desarrollado tumores malignos y a la vez son deficientes de hierro, se ha demostrado una reducción en la actividad citolítica de estas células. Igualmente la función secretoria de los macrófagos con relación a ciertas citoquinas, tales como MIF (Factor Inhibitorio de Migración de Macrófagos) y el interferón se ven afectados. El interferón es un potente activador de la actividad de los linfocitos NK, no solo contra células tumorales, sino también, contra células infectadas por VIRUS. El MIF es importante en el proceso de generación de la hipersensibilidad tardía⁽²⁵⁾. Por su parte, el componente humoral de la

respuesta inmunitaria parece afectarse menos por la deficiencia de hierro. Varios estudios sobre el nivel de inmunoglobulinas totales o anticuerpos específicos en suero no han podido demostrar un efecto consistente en pacientes deficientes ^(66, 68, 70).

Con relación a la inmunidad innata, algunos autores han reportado una disminución del número de fagocitos circulantes y una reducción de la capacidad bactericida de los neutrófilos.

Estudios experimentales *in vitro* han demostrado claramente que el hierro es captado por linfocitos a partir del medio de cultivo durante el proceso de proliferación estimulado por antígenos ^(17, 19). A su vez, tal efecto queda confirmado en experimentos donde se demuestra que la adición de desferrioxamina, un potente quelante de hierro, inhibe la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos del tipo de la fitohemaglutinina. ^(65, 67, 69).



**Figura N° 11 Acción del hierro en la respuesta inmune
(Diego Alexander Bonilla Ocampo, Hierro Metabolismo, Sistema Inmune)**

De hecho durante la activación linfocitaria uno de los eventos que ocurren más tempranamente es la expresión de receptores de la Transferrina, mediante los cuales los linfocitos internalizan la Transferrina, de la cual toman el Fe que requieren para sus

procesos metabólicos (la ausencia de Transferrina de medios de cultivo interfiere con la activación linfocitaria).

4. Sobrecarga de Hierro, inmunidad e infección

La sobrecarga de Fe también afecta la función inmunitaria. Por ejemplo, en pacientes con talasemia y hemosiderosis se ha demostrado una reducción en la actividad de las células NK, así como una disminución en la función fagocítica y bactericida de los neutrófilos sanguíneos en pacientes sobrecargados sometidos a diálisis. En pacientes con cáncer que reciben quimioterapia agresiva se produce una hiperferremia acompañada con aumento en la saturación de Transferrina, lo cual se asocia con un incremento en la susceptibilidad a las infecciones. ^(66, 68, 70)

5. Relación Hierro, inmunidad y neoplasia

Muchos de los conceptos establecidos hasta ahora con respecto a la relación hierro, inmunidad e infección, pueden aplicarse en el caso de neoplasia, considerada ésta como un agente o elemento invasivo o infeccioso ^(53, 55). El hierro es un nutriente esencial para células tumorales, y muchas de ellas expresan receptores de Transferrina en cantidad mayor que las células normales, además de usar Fe no unido a Transferrina para diversas funciones metabólicas ⁽⁶⁶⁾.

6. Respuesta inmunitaria y metabolismo del hierro

Así como las alteraciones en el metabolismo del hierro tienen un efecto sobre el sistema inmunitario y su capacidad de responder frente a diversos estímulos, la respuesta inmune en particular la de tipo innata, es capaz de modular el metabolismo del hierro. Es así, como en pacientes que sufren infecciones crónicas, tumores malignos y trastornos auto-inmunitarios, suele observarse la llamada anemia de enfermedad crónica, que tiene las características de una anemia deficiente de hierro, pero cuya patogénesis no está clara ^(66, 68).

En el caso de infecciones crónicas (VPH) y de tumores malignos, se cree que tal anemia resulta de una sobreestimulación del sistema inmunitario y una sostenida liberación de citoquinas, como el interferón gamma, el cual a través de la estimulación de la síntesis de NO, interfiere en el metabolismo del hierro ^(57, 61). Esto se manifiesta en una reconducción del hierro hacia sus depósitos en el sistema retículo endotelial, en un intento del sistema inmunitario de incrementar la actividad efectora de los fagocitos contra microorganismos o células tumorales ^(66,68,70,71).

K. Epidemiología

1. Epidemiología del Cáncer cervical

El cáncer cervical 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 ^(1, 3, 5, 8).

Cada año se producen en el mundo, alrededor de 500.000 nuevos casos de CC y cerca del 80% corresponden a los países en desarrollo. Mueren anualmente 272.000 mujeres por esta causa ⁽¹⁾. En el mundo existen 291 millones de mujeres infectadas por VPH de las cuales 105 millones son debidas a VPH 16 y 18.

Las edades entre los 25 a 35 años son las más afectadas, la vía de infección más frecuente para contraer la infección es la anal, vaginal, seguida de la infección oral. El 90% de las mujeres han padecido la infección por algún tipo de VPH de 34.8 % para los VPH de alto riesgo y 23.9% para VPH de bajo riesgo ^(1,2).

Las infecciones por VPH ocurren a nivel mundial. No hay países, razas, edades o sexos que no estén atacados. A escala mundial, el VPH es responsable de un 5,2% de todos los tumores humanos, correspondiendo un 2,2% de los cánceres a los países desarrollados y un 7,7% de los cánceres a los países en vías de desarrollo. Las patologías benignas con las que

se relaciona con las verrugas en general. En cuanto a las lesiones neoplásicas, el 90% de los cánceres cervicales se relacionan con los VPH de alto riesgo.

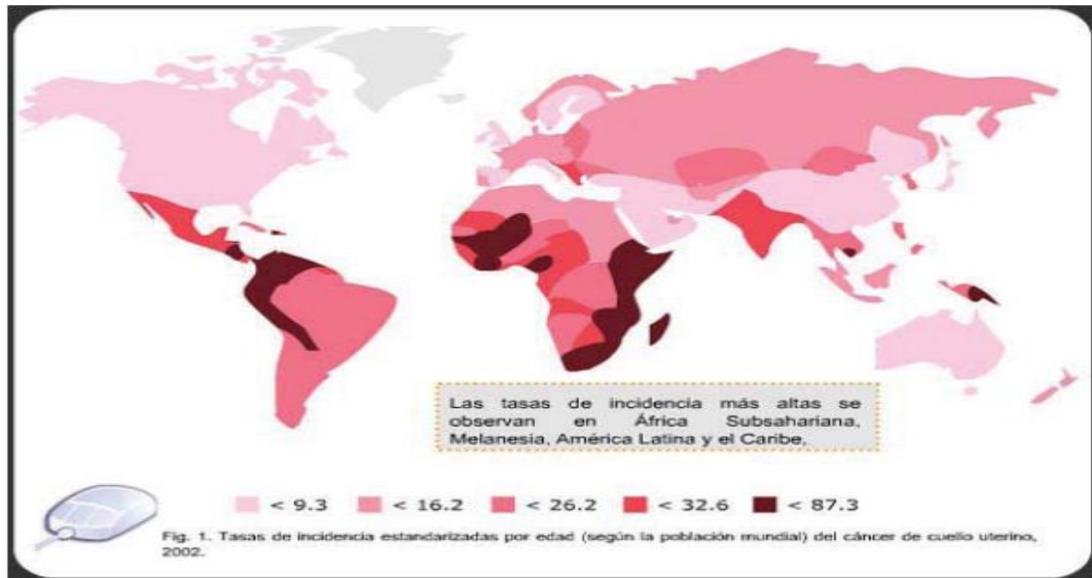


Figura N° 12 Tasas de incidencia altas de Cáncer de Cuello Uterino
(Elena de la Fuente, Las 47 preguntas sobre el virus del papiloma humano, VPH)

Estas cifras sitúan al cáncer cervical en el segundo tras el cáncer de mama en las causas de muerte oncológicas en el sexo femenino. En Europa ocupa el cuarto lugar tras los cánceres de mama, colo-rectal y endometrial, pero es el segundo más incidente en las edades entre 15 y 55 años. Entre los países con tasa menor a 90 x 100.000 mujeres/año se encuentra España, EE.UU, Canadá, Suecia ^(1,2,3).

En Bolivia, uno de los cánceres más frecuentes en la mujer es el cáncer de cuello uterino. La tasa de incidencia es de 36,4 por 100.000 mujeres y la tasa de mortalidad es de 16,7 por 100.000 mujeres de 25 a 64 años de edad, mueren 638 mujeres por año (2008). Datos de estudios internacionales indican que el año 2002 murieron más de dos mujeres por día a causa del CC; en el año 2008 la cifra subió de dos a cuatro mujeres por día, pero la mortalidad ha ido aumentando siendo que en el 2013 la cifra subió a casi cinco mujeres por día ⁽²⁾.

La prevalencia de infección por el VPH en mujeres de 20 a 59 años de Bolivia alcanza al 17,7% por cada 100 mil, mientras que en América del Sur el promedio es del 13,2%. En 2008 Bolivia tenía la sexta tasa más elevada de incidencia y mortalidad de las Américas con 36,4 y 16,6 por cada 100 mil mujeres. El estudio también destaca que Santa Cruz registra la prevalencia más alta con 19,6%; le sigue Chuquisaca con 18,1% y La Paz con 14,7%. Además se determinó que la cepa que más circula en Bolivia es la 16 (una de las de alta peligrosidad), que causa cáncer cérvicouterino ⁽⁷²⁾.

2. Epidemiología de la nutrición en Bolivia

En Bolivia, el problema de la desnutrición es crítico. La información de la ENDSA 2003, con los nuevos estándares de la OMS, muestra una prevalencia de desnutrición crónica en niños y niñas menores de cinco años del 32.2%. Esta realidad sitúa a Bolivia como uno de los países con mayor desnutrición crónica de América Latina. Por otro lado, la anemia nutricional por deficiencia de hierro, afecta a niños y niñas menores de cinco años y mujeres en edad fértil con una prevalencia de 51% y 37 % respectivamente, afectando más a los que viven en el área rural. Según los resultados del estudio de la Línea de Base a nivel nacional (llevada a cabo en el 2007), ocho de cada diez mujeres (15 a 25 años) tiene algún grado de anemia (81.9%), estos resultados no son muy diferentes de los que presenta la ENDSA 2003, que muestra una prevalencia de 78.2% ⁽²⁾.

En 1990, el 42% de los niños menores a cinco años en Bolivia tenían desnutrición crónica, mientras que en 2008 ese porcentaje se redujo al 27% y para el 2012 la reducción se aceleró hasta 18,1% ⁽³⁾.

Adicionalmente, la población boliviana sufre de otras carencias nutricionales, principalmente vitamina A, yodo, calcio y otros nutrientes. Más de la mitad de los hogares de los municipios más vulnerables consume una dieta inapropiada que no cubre las recomendaciones de energía y las necesidades de proteínas. La desnutrición en Bolivia, se constituye en la principal barrera para lograr el desarrollo social y económico esperado en un marco de inclusión, justicia y equidad. Este problema alcanza niveles elevados en

municipios con alta vulnerabilidad a la inseguridad alimentaria y con elevados niveles de pobreza.

Muchos estudios muestran que la desnutrición responde a las determinantes sociales. Entre éstas se consideran, la inseguridad alimentaria en el hogar (debido a la limitada disponibilidad y al limitado acceso físico y económico de los hogares a los alimentos), el bajo nivel de educación e información (especialmente de las madres) y la falta de acceso a agua potable y saneamiento básico, vinculados a prácticas inapropiadas de cuidado, alimentación e higiene ⁽³⁾.

L. Técnicas de detección del Virus de Papiloma Humano

Las pruebas de diagnóstico de la infección por el VPH pueden ser clasificadas en indirectas (colposcopia, citología), y directas (ensayos moleculares: PCR, hibridación, secuenciación, etc).

1. Técnicas indirectas

Si bien el VPH no observa de manera directa, las técnicas citológicas se han utilizado desde hace mucho tiempo, brindándonos un diagnóstico grosero, que nos dan una idea de la presencia del virus, debido a alteraciones que se presentan en las células cervicales ^(74, 75, 76).

1.1 Estudio colposcópico

La colposcopia es un procedimiento exploratorio instrumentado para observar la condición del epitelio, que se basan en la identificación anormal de tejido por un emblanquecimiento al aplicar ácido acético ^(74, 75, 76).

1.2 Estudio citológico

La citología exfoliativa, introducida por George Papanicolaou en 1943, ha sido el pilar en la prevención del cáncer cervical por más de 50 años. El examen de Papanicolaou es sencillo

de procesar, de bajo costo, exento de riesgo y puede ser aplicado a un gran número de mujeres; sin embargo, varios autores coinciden en que el valor de la citología, en el diagnóstico de la infección por VPH es inferior a lo que se cree.

La citología cervical no es una técnica diagnóstica, las evidencias científicas coinciden en que posee una sensibilidad y especificidad limitada 50-60% en la detección de lesión NIC II/III, debido a que únicamente reporta si hay algún cambio citopatológico en las células, pero no confirma si la anormalidad citología es provocada por la presencia de algún genotipo de VPH. Por tanto, aunque una prueba negativa de Papanicolau de alta calidad indique un riesgo bajo de cáncer, por lo general es importante repetir la prueba para poder detectar las lesiones NIC II/III ⁽⁷⁶⁾

1.3 Ensayo de p16

Actualmente, el candidato más prometedor como biomarcador, pero solo después de una prueba positiva de VPH, es el p16. El p16 es una proteína del ciclo celular que se expresa en relación con la quelación de pRb, por la acción de la oncoproteína E7. Por tanto su expresión se relaciona directamente con la infección por VPH de alto riesgo. La detección de p16 se hace por medios inmunohistoquímicos comunes. El P16 se ha mostrado muy eficiente en muestras histológicas como marcador de lesiones de alto grado en cérvix y en vulva y parece ser un buen marcador también en citología. Los estudios realizados hasta la actualidad indican que en ASCUS, el ensayo p16 muestra buena sensibilidad y especificidad para lesiones de alto grado ^(74, 75, 76).

2. Técnicas directas

Hasta la fecha las técnicas basadas en la detección del ADN del VPH son las más precisas, sensibles y específicas en la detección de lesiones pre-malignas y han demostrado su utilidad en la disminución tanto de la mortalidad como de la morbilidad por cáncer cervicouterino. Antes de la era de la tecnología actual de la PCR, los métodos moleculares de elección para la identificación del VPH en tejido crudo o fracciones de ADN fueron: el

southern blot, el dot blot y la hibridación in situ, aunque la sensibilidad entre estos métodos era muy variable.

2.1 Estudio molecular

a. Hibridación in situ

Este método usa sondas de ácidos nucleicos que son convertidos en derivados en múltiples sitios. La detección de los híbridos se logra mediante una técnica llamada sándwich la cual involucra complejos estreptavidina – cromógenos evaluando la presencia de ácido nucleico blanco o la expresión génica en un contexto histopatológico. Este procedimiento permite detectar el ADN problema en el interior de las células, las cuales son permeabilizadas para que permitan la entrada de la sonda ^(74, 75, 76).

b. Southern Blot

Esta es una técnica que fija el ADN reconocido por enzimas de restricción a un soporte y realiza en él, la hibridación con sondas específicas, se basa en la separación de ADN por migración electrónica a través de un polímero (agarosa) el cual es transferido y fijado a una membrana de nitrocelulosa. Esta técnica permite identificar la ubicación de una secuencia blanco específico ^(74, 75, 76).

c. Dot Blot

En esta técnica se utiliza la separación electroforética que permite estimar cuantitativa y cualitativamente el antígeno, los productos de PCR son hibridados con cocteles de sondas específicas para VPH, los productos de la PCR son absorbidos, desnaturalizados y fijados sobre una membrana de nylon son incubadas con sondas marcadas con enzimas que al estar incubadas con el sustrato dan una reacción colorimétrica ^(74, 75, 76).

d. Northern Blot

Esta técnica fija el RNA digerido por enzimas de restricción a un soporte solido realizado a el, la hibridación de sondas específicas, se basa en la separación del ADN por migración a través de un polímero (agarosa) luego es transferido y fijado a una membrana de

nitrocelulosa. Es importante en la regulación de la expresión génica, identificación y cuantificación de un mRNA transcrito de un gen particular y el efecto de cambios que pueden influir en la expresión, es un proceso que detecta RNA blanco utilizando una sonda marcado con RNA o DNA ^(74, 75, 76).

e. Captura de híbridos

Este ensayo se basa en la hibridación con sondas de ARN complementarias de la secuencia genómica de 13 tipos de VPH de alto riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Las células cervicales se lisan en solución para liberar el ADN, el cual es desnaturalizado, e incubado con sondas de ARN en condiciones estrictas que permiten la formación del híbrido ARN-ADN.

La estructura tridimensional específica de este híbrido la reconoce y captura un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina que está ligado a las paredes del pozo de una microplaca (CH2). Los híbridos inmovilizados son detectados mediante adición de un sustrato que reacciona con la fosfatasa alcalina y produce fotones. La luz emitida se mide en un luminómetro y se expresa como unidad relativa de luz (RLU) ^(74, 75, 76).

f. Amplikor

La prueba AMPLICOR HPV Test (CE-IVD) es una prueba cualitativa in vitro para la detección del VPH en muestras clínicas. La prueba utiliza la amplificación de ADN, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e hibridación de regiones amplificadas para la detección del ADN de 13 genotipos de VPH de alto riesgo (mismo genotipos detectados en CH2).

En varios estudios, la prueba AMPLICOR HPV Test, ha demostrado una alta sensibilidad para las anomalías NIC II/III en seguimiento a largo plazo, y demuestra índices de desempeño adecuados para su uso en tamizaje primario de cáncer cervical ^(74, 75, 76).

Tabla N°3 Técnicas de diagnóstico de VPH

(Fernanda Garnica, Utilidad de la PCR para la detección de VPH en pacientes con citología ASCUS)

TECNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
PCR	Alta sensibilidad. Amplifica fragmentos pequeños de DNA (menos de 1ug). El DNA puede estar parcialmente degradado. Se obtienen muchas copias en poco tiempo. Permite conocer el tipo específico y las infecciones múltiples.	Necesita instalaciones especiales y personal calificado. Fácil contaminación con producto amplificado.
SOUTHERN BLOT-DOT BLOT	Permite detectar y tipificar el VPH	Requiere grandes cantidades de DNA (más de 10ug). El DNA tiene que ser de alta calidad.
HIBRIDACION IN SITU	Proporciona la localización del virus en la célula. Permite identificar los tipos celulares infectados por el ADN viral. Identifica las regiones del tejido en las que la expresión del ADN es mayor.	Baja sensibilidad. Necesita una alta concentración viral en la célula (50 copias/célula)
PCR EN TIEMPO REAL	Permite cuantificar el DNA	Genera falsos positivos. Dificultad en la estandarización.
HIBRIDO DE CAPTURA 2	Sensibilidad de 95% para NIC I 92.8% -97.9% NIC II 78%-90% ASC-US No requiere instalaciones especializadas ni personal calificado. Menor riesgo de contaminación que la PCR.	Especificidad 57-89% No permite conocer el tipo específico de VPH. Solo puede identificar VPH de AR. Reacciones cruzadas.
PCR-RFLP	Alta sensibilidad y especificidad. Evidencia la infección latente ya que permite identificar el VPH antes que la célula presente cambios citopáticos. Valor predictivo negativo mayor a 95%	Necesita instalaciones especiales y personal calificado. Alto costo

g. Linear array

En la actualidad el sistema más sensible y específico para determinar infección latente, subclínica y activa por VPH, es la prueba “Linear Array Genotyping Test”. Esta técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de una secuencia específica de la región L1, utilizando un par de oligonucleótidos de amplio espectro, seguida de una hibridación con sondas específicas para la tipificación individual de 37 genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico, entre estos: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82,

83, 84. Su utilización en estudios epidemiológicos enriquece la información clínica, ya que permite conocer el tipo específico de VPH y las infecciones múltiples, lo que posibilita el seguimiento particular de la persistencia de la infección con genotipos de alto riesgo y la identificación de infecciones con los genotipos más oncogénicos como el 16, 18, 31 y 45^(74, 75, 76).

3. Reacción en cadena de la enzima polimerasa

La reacción en cadena de la enzima polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por KaryMullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN.⁽⁷⁵⁾

Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer")^(75, 76).

3.1. Etapas reacción en cadena de la polimerasa

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura (> 90 °C), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje (4°C). Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros.

Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y de los dNTP en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar.⁽⁷⁶⁾

a. Inicio

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C (ó 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

b. Desnaturalización

En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos cadenas de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95 °C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la cadena, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.⁽⁷⁶⁾

c. Alineamiento o unión del cebador

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada⁽⁷⁶⁾.

d. Extensión o elongación de la cadena

Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende).

La temperatura para este paso depende del ADN polimerasa que usemos. Para la polimerasa Taq, la temperatura de máxima actividad está en 75-80 °C (comúnmente 72 °C). El tiempo de extensión depende tanto del ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Hay una regla comúnmente usada: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polimerizará mil bases en un minuto. ⁽⁷⁶⁾

e. Elongación final

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado ⁽⁷⁶⁾.

f. Conservación

Este es un paso que se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.

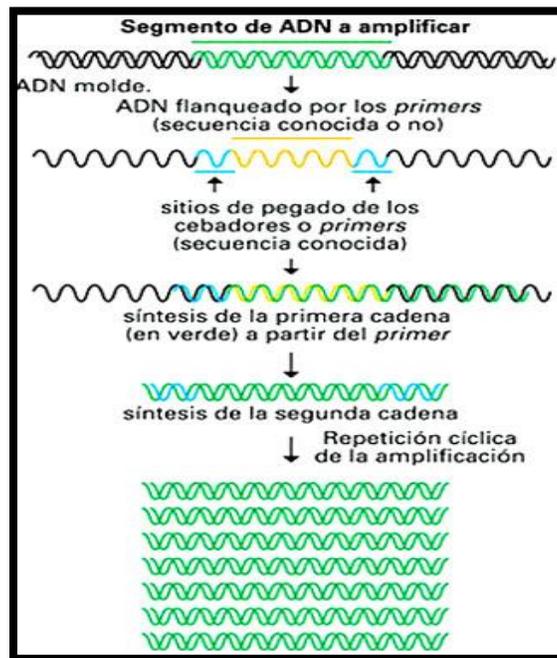


Figura N° 13 Etapas del PCR.

https://www.google.com.bo/search?q=reaccion+en+cadena+de+la+polimerasa&biw=1366&bih=673&source=lnms&tbn=isch&sa=X&sqi=2&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMI9M7h4pmCyQIVyZgmCh2BogNO&dpr=1#tbn=isch&q

La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción de 15-100 μ L, en pequeños tubos de 0.2-0.5 mL de capacidad que se colocan en el termociclador.

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, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes; en acrilamida, para los más pequeños; y, de forma más rápida y aplicable a la PCR asociada a marcaje fluorescente, la electroforesis capilar. El/los tamaño/s de los productos de la PCR vienen determinados por un marcador de peso molecular de ADN, el cual contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido, y que se corre en el gel junto con los productos de PCR ^(74, 75, 76).

3.2. PCR para la detección de VPH

Amplificación del ADN viral mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El ADN es amplificado utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos (MY09 - MY11) que permiten obtener amplificación de un gran espectro de tipos de VPH. Estos iniciadores se unen a una región de 450 pares de bases (pb) del Gen L1, altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH. Asimismo se incluyen iniciadores específicos para la beta-globina, como controles internos de la amplificación. La mezcla de reacción se prepara como se describe a continuación: 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8,5), 4,0 mM MgCl₂, 200ml de dNTPs, 2,5U de Taq Polimerasa. Las muestras son colocadas en un Termociclador

En todas las amplificaciones se incluye como control positivo el ADN purificado de células HeLa, las cuales están infectadas con el tipo 18 de VPH. El producto de la amplificación es analizado en un gel de agarosa al 2% y teñido con Bromuro de Etidio o EZ Vision, y posteriormente el tamaño del producto amplificado es visualizado con un trasiluminador mediante Luz Ultra-Violeta (UV), y fotografiado para su interpretación de presencia de infección por VPH ^(74, 75, 76).

En la actualidad uno de los sistemas más sensibles para determinar la infección por VPH, es la PCR en tiempo real, su utilización en estudios epidemiológicos enriquece la información

clínica, ya que además de proporcionar datos sobre la presencia del virus con una gran sensibilidad, permite estimar con gran exactitud la carga viral^(74, 75, 76).

M. Ensayos para la obtención de niveles de Biomarcadores: Retinol y Hierro

1. Ensayo inmunoenzimático

Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo se han usado diferentes métodos; los basados en la inmunoprecipitación y la aglutinación, pero por ser poco sensibles, se pasó a los que emplean marcadores para detectar dicha reacción. Se han usado isótopos radioactivos, compuestos fluorescentes y quimioluminiscentes, marcadores electro-activos, lantánidos, radicales libres estables, partículas de látex, liposomas, colorantes, coloides, bacteriófagos y enzimas, entre otros^(74, 75).

Los ensayos que usan como marcador enzimas (técnicas inmunoenzimáticas, inmunoensayos enzimáticos o ensayos inmunoenzimáticos) presentan extraordinarias ventajas aún no superadas, tales como:

- Elevada sensibilidad y especificidad.
- Equipamiento relativamente económico.
- Procedimientos técnicos rápidos y sencillos.
- Alta precisión y exactitud.
- Reactivos relativamente baratos y de larga vida.
- Gran variedad de substratos y cromógenos que incrementa su versatilidad.

Las técnicas inmunoenzimáticas constituyen el desarrollo ulterior del radioinmunoanálisis; en lugar de los peligrosos radioisótopos de corta vida media, se emplean enzimas como sustancias marcadoras. Surgieron a mediados de la década de los 60 para la identificación y localización intracelular de antígenos y han tenido un auge vertiginoso, su uso se ha ampliado para la detección de un diverso número de antígenos y anticuerpos.^(74,75)

Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las

enzimas. Mediante la combinación de la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible, el débil efecto inmunológico se ve reforzado por la amplificación enzimática, de forma que se consigue una elevada sensibilidad; si a esto le añadimos la especificidad de la reacción inmunológica, se podrá comprender su aplicabilidad en el diagnóstico clínico ⁽⁷⁵⁾.

Gracias a ello se han podido estudiar: hormonas, fármacos, péptidos y proteínas, vitaminas, agentes patógenos, otros analitos y, por supuesto, anticuerpos dirigidos contra los propios constituyentes del organismo (autoanticuerpos), contra diversos microorganismos o contra inmunógenos vacunales. ⁽⁷⁵⁾

La reacción antígeno-anticuerpo se detecta generalmente mediante un cambio de color o la emisión de luz, producidos por la interacción de la enzima y su sustrato. Ambos efectos son cuantificables y proporcionales a la intensidad de la interacción. El uso de sustratos de depósito permite la visualización de los resultados y es muy utilizado sobre membranas ^(74, 75).

1.1 Ensayo inmunoenzimático tipo sandwich

El ELISA tipo sándwich doble anticuerpo es el ejemplo clásico de métodos para la detección de antígenos, el primer anticuerpo captura el antígeno de la muestra que es detectado a través del conjugado anticuerpo-enzima o amplificado con un conjugado dirigido contra el segundo anticuerpo (sándwich doble anticuerpo modificado) u otros procedimientos.(Figura N°12)

Los ensayos sándwich doble antígeno, son usados para la detección de anticuerpos y son muy útiles para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas; en estos ensayos, al igual que en los indirectos, los antígenos capturan los anticuerpos, pero en esta ocasión en lugar de un conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, usamos antígeno-enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad y detectabilidad al no ser necesario diluir las muestras; sin embargo, detectamos todas las clases de inmunoglobulinas, lo que en ocasiones no es conveniente ⁽⁷⁵⁾.

En general, los ensayos sándwich son más apropiados para la automatización de los sistemas ELISA, ya que puede disminuirse un paso de reacción añadiendo simultáneamente muestras y conjugado, aunque hay que prever las posibles interferencias del conjugado a elevadas concentraciones de antígenos o anticuerpos en la muestra. Los ensayos de captura IgM deben usarse si queremos estudiar, mediante la detección de IgM, la respuesta primaria inducida por inmunógenos es timodependientes, o la producción de IgM en los timoindependientes, estos ensayos son también usados en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Los anticuerpos anti-IgM inmovilizados capturan la IgM de la muestra, que a su vez reacciona con el antígeno conjugado con una enzima, o sin marcar, lo que requiere de un paso adicional con un anticuerpo marcado. De esta forma se verifica si están presentes los anticuerpos específicos para el isotipo capturado ^(74, 75).

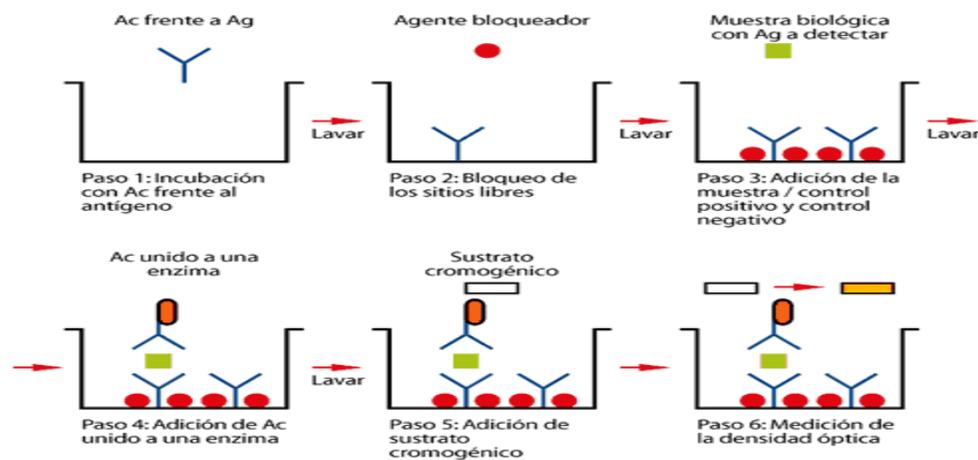


Figura N°14 Ensayo inmunoenzimático tipo sándwich

(<http://www.bioacademia.com.mx/miembros/tecnologia/0003.html>)

La detectabilidad de todos estos ensayos puede incrementarse usando métodos de amplificación no inmunológicos (por ejemplo el sistema avidina-biotina y cascadas enzimáticas) o inmunológicos (como el sistema peroxidasa-antiperoxidasa).

La selección de uno u otro principio depende principalmente de los propósitos del ensayo, la disponibilidad y calidad de los reactivos, su utilización en la práctica y la necesidad o no de su ajuste a un formato de estuche de reactivos ^(74, 75).

III. ANTECEDENTES

Datos mundiales describen que alrededor del 90% de la población femenina padeció alguna vez en su vida un episodio de infección por VPH, aunque solo el 10% de esta población desarrolla alteraciones celulares que podrían conducir al cáncer cervical.⁽⁶⁾

La mortalidad relacionada con las neoplasias malignas es alta y el CC ocupa el segundo lugar con mayor frecuencia en la población mundial ⁽¹⁾. En nuestro país, estos datos no se alejan de la realidad mundial, aunque no contamos con datos sobre la prevalencia de infecciones causadas por Virus del Papiloma Humano (VPH), se conoce que por cada 100.000 mujeres, 60 presentan CC, conociendo además que diariamente fallecen cinco por esta causa ⁽²⁾.

La infección persistente por ciertos tipos oncogénicos del VPH es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo del CC. Se conoce que el sistema inmunitario juega un rol básico en el control y eliminación de estos virus, por lo que es importante valorar en nuestra población el rol de otros factores que promueven o condicionan la persistencia de la infección por VPH, entre estos tenemos a los factores ambientales y sobre todo nutricionales, como factores biológicos importantes en una buena respuesta inmunitaria ⁽¹¹⁾.

Existen pocas enfermedades, quizá ninguna, cuya patogenia no esté relacionada de algún modo con el sistema inmune. La implicación del sistema inmune puede ser primaria, como en el caso de las reacciones de hipersensibilidad; o secundaria, como en el caso de enfermedades infecciosas ⁽¹²⁾. Por ende la respuesta inmune está considerada como un mecanismo efector en la resistencia a los tumores y está relacionada desde la fase de iniciación hasta el crecimiento y progresión de éstos. Importantes evidencias sugieren que el sistema inmunitario participa en la eliminación de las células malignas que aparecen en el huésped, probablemente, como resultado de mutaciones espontáneas, exposición a carcinógenos del medio ambiente y activación viral. Además, tiene una crucial implicación en la progresión de tumores ya establecidos generalmente, en aquellos pacientes que sufren inmunodepresión ^(12,13).

Numerosos reportes establecen que en la respuesta del huésped a la infección intervienen tanto los componentes celulares como humorales del sistema inmune ⁽¹¹⁾. La función inmunitaria abarca desde mecanismos simples e innatos de defensa hasta respuestas complejas y adaptadas, específicas de antígeno y en las que intervienen numerosos tipos celulares. Se trate de respuestas básicas o complejas, el sistema inmune, como cualquier otro sistema del organismo, depende de un aporte nutricional adecuado y es muy sensible a las carencias y desequilibrios nutricionales. Pero a diferencia de otros sistemas, las necesidades nutricionales del sistema inmune varían muy rápidamente en función de la replicación y síntesis celular, así como de otras funciones que requieran gran cantidad de energía ^(10,11).

El sistema inmune es muy sensible a la composición de la dieta tanto a corto como a largo plazo. Teniendo en cuenta el papel vital que desempeña el sistema inmune en ciertas patologías, a favor, o a veces en contra del individuo, es importante comprender cómo la nutrición influye en la salud y en la enfermedad ⁽¹⁴⁾. En el marco de este contexto Chandra y col. indican que un factor esencial en la nutrición lo dan las vitaminas que ejercen un papel importante como cofactores de muchas vías metabólicas esenciales para la integridad y el perfecto funcionamiento del sistema inmune. Algunos micronutrientes como la Retinol y elementos como el hierro ejercen efectos inmunomoduladores e influyen en la susceptibilidad del huésped a sufrir infecciones y a eliminarlas. ⁽¹⁵⁾

En el estudio de Giuliano y col. realizado en Brasil, indican que el estado inmunitario es evaluado a través de marcadores nutricionales, reportando como principal marcador al Retinol cuyo nivel bajo se asocia a la infección persistente del VPH ⁽¹⁸⁾. Según Rebecca L. et al, en la Universidad de Arizona se ha realizado un estudio entre la relación de la vitamina A y la persistencia de la infección por VPH, se reportó que los niveles altos del consumo de verduras ricas en vitamina A redujeron en un 54% la persistencia del VPH ⁽¹⁶⁾.

En línea con este estudio el reporte de Myung SK realizado en China, indica que existe una asociación entre la vitamina A y el riesgo de padecer neoplasia cervical, conociéndose que el Retinol juega un papel importante en la proliferación y diferenciación celular de las

células natural killer (células esenciales para la eliminación del virus), también se ha conocido que ejerce un efecto modulador de la respuesta inmune es por esta causa que el estudio reporta que la vitamina A favorece a resolver el proceso infeccioso ⁽¹⁷⁾.

En relación a la vitamina A, se ha estudiado sobre todo el efecto del beta-caroteno (provitamina A) sobre el sistema inmunitario, y se ha observado que su deficiencia ocasiona una disminución del tamaño del timo y bazo, una reducción en la actividad de las células Natural killer, una menor producción de IFN-g (interferón-gamma), un descenso de la hipersensibilidad retardada cutánea, y una baja respuesta a la estimulación con mitógenos por parte de los linfocitos según Grosset al, y de este modo no se puede combatir de manera adecuada la infección por VPH ⁽¹⁸⁾.

Un reporte de A. Ortiz frente a la deficiencia de vitamina A menciona que se ha observado defectos en la actividad fagocítica (alteración en la quimiotaxis, en la adhesión y en la habilidad de generar metabolitos reactivos de oxígeno en neutrófilos) y en el deterioro de la función de las células T y B. Además, la deficiencia de Retinol reduce la actividad de las células NK, disminuye la producción de interferón, reduce la efectividad de la actividad de los macrófagos que fijan grasa y disminuye la respuesta de linfocitos estimulados por mitógenos ⁽¹⁹⁾.

La anemia (disminución de los niveles de hemoglobina por diferentes causas) se presenta frecuentemente en los pacientes con cáncer; se ha reportado que más del 30% de los pacientes con tumores malignos la han padecido ⁽²⁰⁾. La anemia nutricional se refiere a aquella que se origina debido un aporte inadecuado de los nutrientes hematopoyéticos: hierro, ácido fólico y cianocobalamina ⁽²¹⁾, para esto un estudio de Mayor A y colaboradores indica que el hierro, el zinc, el cobre y el selenio son necesarios para un funcionamiento adecuado del sistema inmunitario y son fundamentales para una correcta protección frente a las infecciones ⁽²²⁾. Un aporte inadecuado de estos nutrientes está asociado con la supresión de la inmunidad celular y de la inmunidad adquirida; si se produce esta situación estaría aumentado el riesgo de morbilidad y mortalidad por infecciones virales, microbianas y

parasitarias sin embargo, al suplementar con el nutriente deficitario se restaura la inmunocompetencia según Bonham y colaboradores ⁽²³⁾.

Un estudio realizado por Chantes nos indica que el hierro es un elemento metálico importante para la vida, para el sistema inmune y fundamental para resolver procesos infecciosos ⁽²⁴⁾. Soyano nos indica que la deficiencia de hierro afecta a la inmunidad celular y humoral provocando la disminución de la capacidad proliferativa de células linfoides debido a una reducción en la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa, cuya consecuencia es la reducción de la síntesis de ADN, con respecto a la inmunidad mediada por células natural killer, en ratas y ratones que han desarrollado tumores malignos y a la vez son deficientes de hierro, se ha demostrado una disminución en la actividad citolítica de estas células ⁽²⁵⁾.

Erin en varios estudios realizados sobre la relación de los nutrientes y el riesgo de padecer CC, nos indica que la deficiencia de Retinol puede o no estar relacionada con la persistencia del virus del papiloma humano. ⁽⁶⁸⁾

También el mismo Erin en colaboración con Siegel nos indica que niveles elevados de hierro se encontrarían asociados con la persistencia de VPH dado que le proporcionaría elementos necesarios para llevar a cabo su replicación, con respecto al déficit no indica que este se encuentre en relación con la depuración del virus. ^(66,67,68)

III. Justificación y planteamiento del problema

El Cáncer Cervical representa la principal causa de muerte de mujeres en edad fértil en el mundo. En Latinoamérica, Bolivia ocupa el segundo lugar, después de Haití, con mayor incidencia de cáncer cervical ^(2,4,5). Esto indica que a pesar de existir un Programa Nacional de Prevención del CC, este no es eficaz, debido a que este programa se centran en el diagnóstico ya establecido de la patología, a través de la prueba del Papanicolau, que no brinda un diagnóstico preventivo, por lo que el CC representa una problemática vigente en nuestra población.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la infección con VPH es la causa de CC. La población femenina con infección por algunos genotipos de VPH es más susceptible a desarrollar anomalías cervicales, como lesiones intraepiteliales. Aunque el desarrollo del CC está relacionado en un 99% con la infección por VPH, no todas las infecciones por VPH desencadenan en displasia o CC.

Como todo proceso biológico, el CC es multifactorial. De todas las mujeres que alguna vez pasaron por la infección con VPH, solo el 10% de ellas desarrolla CC ⁽¹⁾. En condiciones de inmunocompetencia, el sistema inmune es capaz de controlar de manera natural la infección y eliminarla completamente, incluso en casos de infecciones causadas por VPH oncogénicos. Varios estudios plantean que los eventos iniciales, luego de la infección por VPH, son críticos para el establecimiento de la infección, el desarrollo de infección persistente y potencial desarrollo de displasia o cáncer.

Toda vez que la infección de las células cervicales por VPH está íntimamente asociada con la diferenciación de células epiteliales, los factores reguladores de la diferenciación, como el Retinol ha sido considerado como “factor control” en la prevención de la persistencia del VPH. Se conoce que el Retinol tiene un rol central en la inmunomodulación eficiente de la actividad fagocítica de macrófagos, participa del balance Th1/Th2, coadyuva en la diferenciación de linfocitos T y B, además que favorece la actividad de las células Natural

Killer que son importantes en la depuración del virus ^(16, 17, 18 y 19). Así mismo, la funcionalidad del sistema inmunitario es crucial en la depuración de infecciones virales.

Otro factor importante en la modulación de la respuesta inmune es el hierro cuya carencia incide negativamente en la capacidad fagocítica de polimorfonucleares, también reduce el número de células Natural Killer (NK). Las células NK tienen receptores de Transferrina para captar hierro, y al no existir este nutriente no existe una producción adecuada de receptores, viéndose afectados en número y función, el balance de los niveles de hierro debe ser teóricamente perfecto, esto debido a que niveles elevados, favorecen el establecimiento de otras infecciones, las cuales coadyuvarían a la persistencia del virus y niveles disminuidos provocarían una mala respuesta inmunitaria. ^(22, 23, 24, 66,67).

Estos factores: Retinol y hierro son provistos en la dieta alimentaria, por lo que una deficiente e inadecuada alimentación puede repercutir negativamente en la capacidad inmunitaria antiviral del sistema inmune celular innato, particularmente durante la respuesta inmune temprana que promueve la inducción de células NK y Linfocitos T citotóxicos. La alimentación en nuestro país es un problema común y serio relacionado con factores económicos y culturales que condicionan estados de desnutrición. En Bolivia, la prevalencia de desnutrición en la población femenina en general es del 48%, mientras que en mujeres en edad fértil es del 37,2 % ⁽²⁶⁾. Estos datos han situado a nuestro país entre los que tienen mayor desnutrición en Latinoamérica.

En la necesidad de establecer los factores que en nuestra población condicionan la alta frecuencia de CC, en el presente trabajo se plantea un estudio integral de los factores que podrían condicionar o promover la persistencia de la infección por VPH. Para esto se plantea identificar en la población participante la infección por VPH, infección por VPH oncogénico, particularmente oncotipos 16 y 18, y la capacidad inmunitaria a través de los niveles de Retinol y hierro, como estos nutrientes modulan los procesos inmunológicos. Se plantea este enfoque en la posibilidad de modificar conductas y acciones médicas que permitan valorar al participante de manera integral logrando mejorar resultados en cuanto a la resolución de la infección.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- Identificar al Virus de Papiloma Humano y biomarcadores inmunitarios, para determinar su probable asociación en la población en estudio.

B. Objetivos específicos

- Identificar la presencia de Virus de Papiloma Humano en muestras genitales.
- Identificar en infecciones activas, al Virus de Papiloma Humano alto riesgo oncogénico, y los genotipos VPH 16 y VPH 18.
- Detectar los niveles de Retinol a través de la proteína fijadora de Retinol.
- Detectar los niveles de Hierro a través de los marcadores Ferritina y receptor soluble de Transferrina.
- Determinar la asociación entre los niveles de Retinol, Hierro y la infección por Virus Papiloma Humano oncogénico y no oncogénico.
- Correlacionar los datos obtenidos con variables biológicas (edad, antecedentes gineco-obstetricos, etc).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Población

Formaron parte del estudio 70 mujeres (15 a 49 años) que aceptaron participar. Las participantes fueron reclutadas de las pacientes que asistieron al Instituto Seladis, cuya orden médica requería la detección del Virus del Papiloma Humano, por lo general las refieren los médicos ginecólogos, debido a que presentaban alguna alteración en el Papanicolau y requiere complementar el análisis para fines de diagnóstico/seguimiento.

B. Criterios de inclusión y exclusión de las participantes

1. Criterios de inclusión

Se incluyeron todas las participantes que acudieron al Instituto SELADIS y aceptaron voluntariamente ser parte del estudio, que contaban con órdenes médicas para la detección de VPH, que firmaron el consentimiento informado y accedieron a responder a la encuesta realizada y que además no tenían tratamiento con óvulos (ya que resultan ser inhibidores de ADN).

2. Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellas participantes que no aceptaron firmar el consentimiento informado, y que no cumplían con el volumen de muestra sanguínea requerida para el estudio.

C. Aspectos éticos

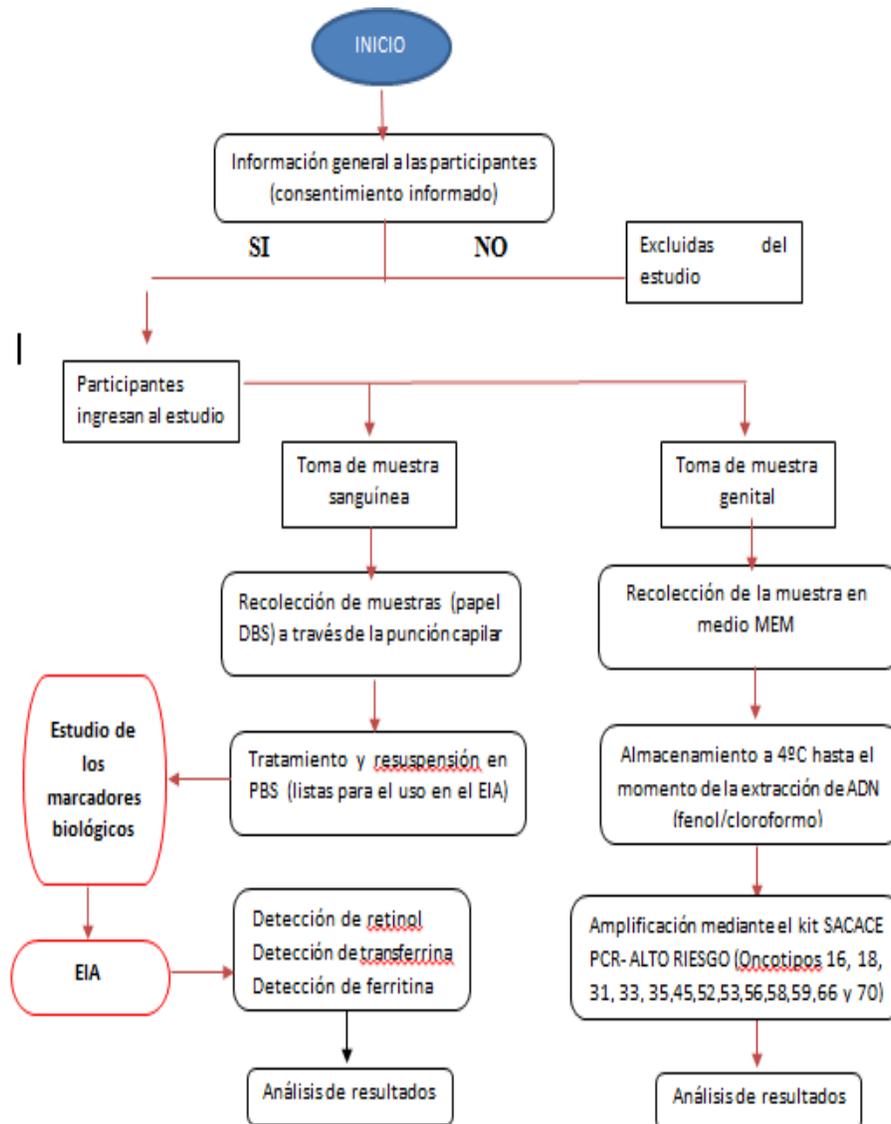
A todas las participantes que contaban con órdenes médicas para la detección de VPH, se les informó sobre el estudio y se aplicó el llenado del consentimiento informado avalado por el comité de ética de la Universidad Mayor de San Andrés. El beneficio que tuvieron las participantes fue contar con los resultados de laboratorio de las determinaciones de

Retinol, Ferritina y transferina, 72 horas después de realizada la toma de muestra sanguínea.

D. Tipo de estudio

El estudio es de tipo corte transversal exploratorio descriptivo/diagnóstico.

E. Flujograma de actividades



F. Muestras biológicas para el estudio de VPH y biomarcadores inmunitarios

1. Toma de muestra genital para identificación de infección por VPH

En el estudio, la toma de muestra se realizó mediante hisopado de la región genital, para esto las participantes tomaron posición ginecológica y se colectó la muestra introduciendo el hisopo en la vagina, aproximadamente 2 pulgadas, se realizaron movimientos rotatorios suaves durante 10 a 20 segundos para obtener la mayor cantidad de células epiteliales. Posteriormente la muestra fue introducida en medio de transporte viral MEM y se mantuvo en cadena de frío a 4°C hasta la extracción del genoma.

a. Identificación de VPH screening

En el estudio se realizó la identificación de VPH screening (detección de todos los tipos de VPH de alto y bajo riesgo) mediante protocolos estandarizados y validados en el Laboratorio de Virología del Instituto por varios estudios previos (S. Mancilla y cols., R. Salinas y cols., W. Machaca y cols., M. Patzi y cols).



Figura N°15 Proceso de revelado PCR VPH, preparación de la muestra de ADN con EZ-Vision

En la validación de la identificación screening de VPH, se incluyó ADN de cultivo celular (línea HeLa-VPH) que contiene el Virus de Papiloma Humano. Y para controles negativos se utilizó agua libre de nucleasas empleada en las diferentes etapas de PCR.

La extracción de ADN se realizó en tres etapas: La etapa de lisis consistió en desestabilizar las estructuras que confinan el citoplasma y liberar su contenido al medio. Para ello se empleó el detergente SDS, que eliminó los lípidos; el agente quelante EDTA que elimina los cationes de la solución, desestabilizando las membranas celulares e inhibiendo las ADNasas (enzimas que podrían degradar el ADN libre lisándolo en pequeños fragmentos); también se usó sales como el cloruro de sodio (NaCl) que forma una capa iónica alrededor del ADN protegiéndolo y finalmente el tampón Tris HCl que mantiene un pH de la solución estable. La lisis se realizó a 37°C que facilitó la ruptura de lípidos de la membrana y por ende la liberación de ADN de la estructura celular.

Posteriormente se procede a la eliminación de proteínas que se realiza mediante la adición de una mezcla de fenol:cloroformo y posterior centrifugación, lo que provoca que el ADN permanezca en el sobrenadante y en la interfase queden las proteínas. El fundamento es el siguiente: el fenol y el agua (solución acuosa donde se encuentra el ADN) no se pueden mezclar, por lo que el ADN que es muy polar debido a su carga negativa, permanecerá en la fase acuosa de la solución, mientras que las proteínas (formadas por grandes cadenas cuyos componentes elementales son aminoácidos algunos polares y otros no) quedarán tras la centrifugación en la interfase y en la fase orgánica debido a su polaridad. Se debe extraer el sobrenadante con cuidado para no arrastrar proteínas.

La precipitación y limpieza del ADN se realizó añadiendo al sobrenadante recuperado en el paso anterior cloruro de sodio a alta concentración. Con la adición esta sal, el ADN que está cargado negativamente va a obtener una capa iónica positiva que facilitará su precipitación. Posteriormente añadimos etanol en la solución de precipitación para eliminar la concentración residual de sales y promover la precipitación del ácido nucleico, ya que el alcohol sustraerá las moléculas de agua, promoviendo la deshidratación del ADN. Finalmente, se centrifugó la muestra por unos minutos para recuperar el precipitado de

ADN, lavándose el pellet obtenido varias veces con etanol al 70% para eliminar todas las sales que permanezcan en la solución. Posteriormente se volvió a centrifugar, se elimina cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta y se deja secar para eliminar las trazas de alcohol. El ADN así obtenido es rehidratado con agua libre de nucleasas.

El proceso de amplificación, el ciclado se realizó en el equipo BIORAD PTC -100 MJ Research, siguiendo el protocolo que se describe en la tabla N°4, que muestra el programa de ciclado.

Finalmente el revelado se realizó en gel de agarosa y la visualización se realizó mediante el uso de EZ visión (agente que interactúa con el ADN). Para un resultado positivo se debe visualizar una banda de 450 pb que corresponde al fragmento de genoma viral (Figura N°15).

Tabla N° 4 Programa de ciclado VPH screening

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclo
1	95°C	Pausa	
2	95°C	9 min	1
3	94°C	1 min	42
	52°C	1 min 30 seg	1
	72°C	2 min	
4	72°C	10 min	
5	4°C	Storage	

b. Identificación de VPH alto riesgo

En el estudio la identificación VPH alto riesgo (VPH -AR) se realizó en aquellas participantes que fueron positivas para la detección de VPH-screening, mediante el uso de kit (SACACE), que detecta en una sola identificación a los 13 oncotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66 y 70), a la vez. El kit refiere como se debe preparar el mix para proceder al ciclado según la siguiente tabla:

Tabla N° 5 Preparación de MIX PCR VPH – AR

Reactivo	Cantidad en uL
Mix 1	5
Buffer	10
Taq – pol	0,5
TOTAL	15,5

En nuestro caso realizamos la validación del kit mediante uso de controles internos con los que contaba la unidad, además de evaluar los controles provenientes del kit en sí, una vez que todos los controles se validaron se procedió a realizar la amplificación de las muestras de las pacientes que presentaban reactividad positiva para VPH screening.

Tabla N°6 Temperatura, tiempos y numero de ciclos PCR , VPH-AR / VPH 16 y18

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclo
1	95°C	Pausa	
2	95°C	15 min	1
3	95°C	30 seg	42
	63°C	40 seg	1
	72°C	40 seg	
4	72°C	1 min	
5	10°C	Storage	

Realizamos la interpretación de los resultados según los criterios ya establecidos en el kit teniendo la siguiente tabla de interpretación:

Tabla N° 7 Interpretación de resultados PCR VPH-AR, VPH 16/18

Muestra	Banda de control interno 723pb	Banda especifica VPH-AR (230pb) VPH- 16/18 (325/425 pb)	Interpretación
Control negativo	NO	NO	Resultado valido
Control positivo	NO	SI	Resultado valido
Control interno	SI	NO	Resultado valido
Muestra positiva	SI	SI	Resultado positivo
Muestra negativa	SI	NO	Resultado negativo

c. Identificación de VPH 16/18

En el estudio la identificación VPH 16 y VPH 18, se realizó a todas las participantes que fueron positivas para la detección de VPH-AR, mediante el uso de kit (SACACE), el cual identifica (genotipifica) cada oncotipo por separado. De esta manera identificamos que oncotipo es el más frecuente en nuestra población en estudio. El kit refiere como se debe preparar el mix (Tabla N°8), el proceso de revelado (visulizacion de las bandas) se observa en la figura N° 16.

Tabla N° 8 Preparación de MIX PCR VPH – 16/18

Reactivo	Cantidad en uL
Mix 1	10
Mix 2	Contenido en el tubo
Muestra	10
TOTAL	20

Para fines de entendimiento/practicidad se procedió agrupar a las participantes en tres grupos: VPH-AR POSITIVAS (participantes positivas para la detección alguno de los 13 genotipos de alto riesgo oncogenico), VPH-BR POSITIVAS (participantes positivas para detección de VPH screening) y VPH-AR/BR NEGATIVAS.

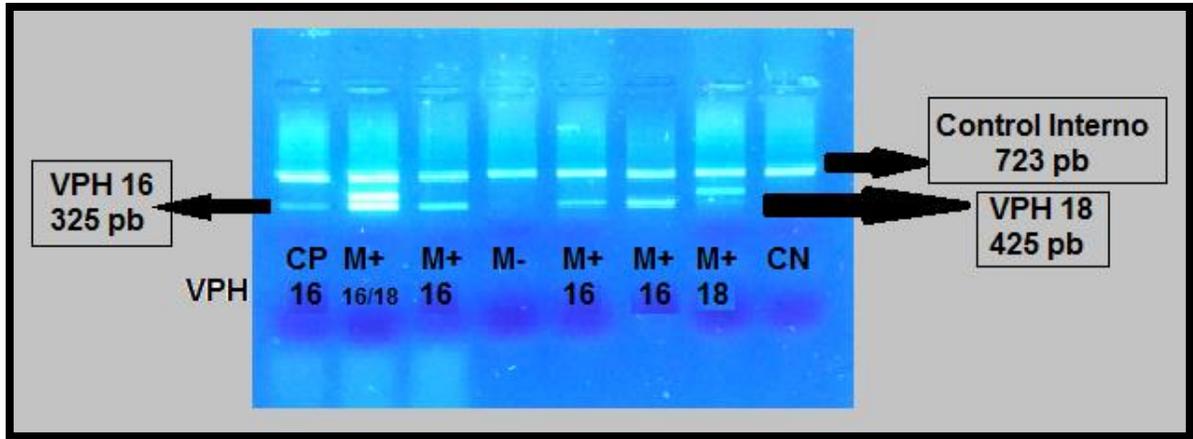


Figura N° 16 Revelado PCR VPH 16/18

2. Toma de muestra sanguínea, determinación de Retinol y Hierro

Para el estudio se realizó la toma de muestra de sangre capilar (diminutos vasos sanguíneos que se encuentran cerca de la superficie de la piel, muestra que se obtiene punzando la piel en un dedo, talón u otras áreas), mediante punción con lanceta, de la yema del dedo anular, previa desinfección del área (algodón embebido en alcohol yodado).

La técnica que se utilizo es denominada DBS (dotblott), que se basa en la recolección de muestras capilares obtenidas mediante pinchazo con lanceta (BD Microtainer) del dedo anular, la recolección de la muestra se realizó en papel Whatman 903, posteriormente se procedió al secado del papel a temperatura ambiente, para que luego realizáramos la perforación de 6mm del área donde tenemos la muestras, posteriormente se procedió a realizar una elución de este papel con PBS celular, dejando eluir el papel toda una noche, para que al día siguiente realizáramos la detección de los biomarcadores. Esta técnica nos permitió la recolección, almacenamiento y transporte fácil de las muestras de sangre.

a. Niveles de Retinol

Una vez que ya contamos con el eluído procedimos a realizar la detección de Retinol mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA), utilizando el kit (R&D) el cual se basa en la detección de Retinol mediante la técnica de inmunoensayo enzimático sándwich

cuantitativo, que consiste en la detección del micronutriente a través de dos anticuerpos específicos, uno que tapiza el pozo (captura) y el otro anticuerpo que detecta al nutriente.

b. Niveles de Hierro

En el estudio se realizó la detección de Hierro a través de dos marcadores: Ferritina y Transferrina mediante ELISA, en el caso de la Ferritina se usó kit (MONOBIND), y para Transferrina se empleó también kit (CYGNUS), el tipo de ELISA empleado en estos dos analitos es de tipo sándwich, (Figura N°17), que realiza la detección de los dos marcadores de modo similar al acápite anterior (niveles de Retinol).

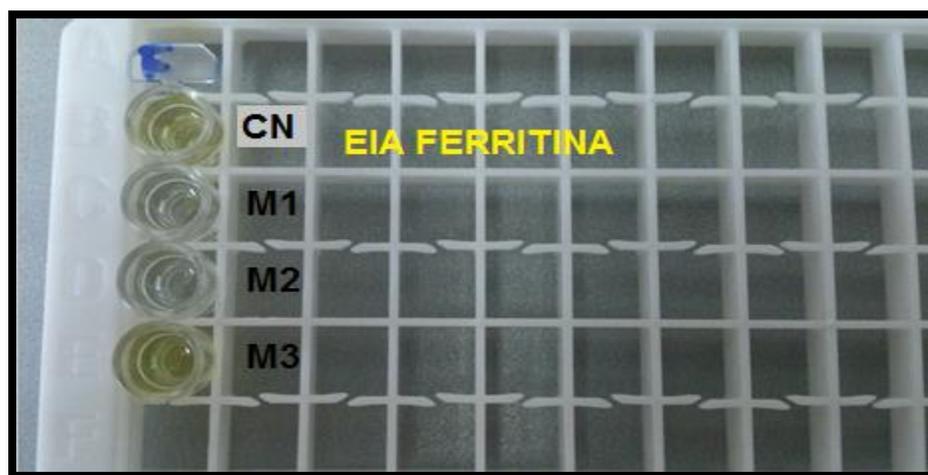


Figura N°17 Ensayo inmunoenzimático tipo sándwich detección de Ferritina

G. Análisis de datos

El análisis de datos fue realizado mediante aplicación de tablas de contingencia y la asociación entre las variables a través del estadístico Chi cuadrado, con un nivel de confianza del 95%, donde se determina $p < 0.05$ para considerar si es estadísticamente significativo. Teniendo las siguientes hipótesis:

Ha: niveles de biomarcadores alterados con respecto al valor normal

Ho: niveles de biomarcadores dentro del valor normal

VI. RESULTADOS

A. ASPECTOS TÉCNICOS DE LABORATORIO

1. Implementación de ensayos para la detección de los biomarcadores

1.1 Técnica DBS para la determinación de biomarcadores

La técnica DBS se ha utilizado durante más de 50 años ⁽⁷²⁾, para detectar enfermedades metabólicas congénitas en recién nacidos y puede llegar a medirse por esta técnica alrededor de 50 metabolitos. La técnica estándar nos indica el tipo de papel (Whatman 903, MP Biotechnologies), y lanceta (BD technologies) que se debe emplear para obtener los mismos parámetros de validación y de relación con el plasma, como establece la técnica estándar. Para tal cometido la perforación que se realizó fue de un diámetro de 6mm según parámetros establecidos en 2002 ⁽⁶⁵⁾. Posteriormente se procedió a realizar la elución del papel en tampón fosfato dejando eluir la muestra durante una noche, por necesidades prácticas se realizaron diferentes tipos de elución, para beneficiar el trabajo de laboratorio (Tabla N° 9).

Los estudios realizados establecen que el porcentaje de recuperación de la proteína de Retinol es de casi el 100% ⁽⁶⁵⁾ y para las proteínas que contiene o captan el hierro (Ferritina y Transferrina) el porcentaje de recuperación es aproximadamente el 90% ⁽⁷¹⁾. Sin embargo esta recuperación depende de varios factores como el tiempo de almacenamiento y la temperatura. Por este motivo y por la diferencia de migración de las proteínas procedimos a encontrar factores de recuperación internos comparando la cuantificación de las proteínas en cuestión y su relación con el suero/plasma.

La técnica estándar ⁽⁶⁵⁾ establece que el periodo óptimo de elución de la muestra es toda la noche. Con la finalidad de optimizar el proceso se evaluaron diferentes tiempos de elución, realizando valoraciones a diferentes tiempos de elución (Tabla N° 9). La valoración de la recuperación del analito se realizó mediante ELISA competitivo para la detección de

anticuerpos IgG contra Hepatitis A de muestras negativas y positivas. La lectura de los resultados fue realizada a 450 - 630 nm para los diferentes tiempos de elución encontrándose resultados prácticamente similares (ver Tabla N°9). Al no existir diferencias significativas entre los diferentes tiempos de elución y absorbancias se concluyó que se puede trabajar con ambos tiempos: over nighth y de una hora.

Tabla N° 9 Evaluación de los tiempos de elución de la muestra

Tiempo	Densidad óptica (D.O.)	
	450 – 630nm	
	MUESTRA POSITIVA	MUESTRA NEGATIVA
1 hora	0,072	1, 205
2 horas	0,070	1, 300
4 horas	0,075	1, 305
Over nighth	0,063	1, 306

Al no existir diferencias en los tiempos de elución, este procedimiento (1 hora de elución) fue aplicado en el estudio para la determinación de los niveles de los micronutrientes por ELISA.

2. Determinación de los factores de recuperación internos encontrados entre DBS y el ensayo inmunoenzimático (EIA)

2.1 Determinación del factor de correlación para Retinol

El factor de correlación, es un factor que se debe encontrar para cada analíto que se desee detectar y es único de cada kit/prueba, su determinación se basa en detectar cuantas veces se encuentra diluida la muestra del papel en relación al suero.

Según esto tenemos que el factor obtenido fue de 1,46 el cual se empleó para correlacionar las densidades ópticas obtenidas entre los resultados del eluído y los resultados de la muestra de suero (Tabla N°10).

Tabla N°10 Relación de los ensayos en suero y eluidos, determinación de los niveles de Retinol (Factor de correlación)

Ensayo	DO suero	DO eluido	Factor correlación
1	0,325	0,225	1,45
2	0,246	0,168	1,46
3	0,240	0,162	1,48
PROMEDIO	0,270	0,185	1,46

DS (0.001), CV (0.001)

2.2 Determinación del factor de correlación para Ferritina/Transferrina

En el estudio, el factor encontrado en el caso de la Ferritina fue de 3,66 esto nos indica que el eluido se encuentra alrededor de 4 veces más diluido en cuanto a la muestra de suero (Tabla N°11). En el caso de la Transferrina podemos identificar que el eluido se encuentra 2,13 veces más diluido que la muestra de suero, por esto se usó este factor para realizar todos los demás análisis (Tabla N°12).

Tabla N°11 Relación de los ensayos en suero y eluidos, determinación de los niveles de Ferritina (Factor de correlación)

Ensayo	DO suero	DO eluido	Factor
1	0,475	0,148	3,21
2	0,397	0,082	4,85
3	0,465	0,159	2,93
PROMEDIO	0,446	0,130	3,66

DS (1.040), CV (1.080)

Tabla N° 12 Relación de los ensayos en suero y eluidos, determinación de los niveles de Transferrina (Factor de correlación)

Ensayo	DO suero	DO eluido	Factor
1	2,676	1,431	1,87
2	2,746	1,151	2,38
3	2,662	1,250	2, 13
PROMEDIO	2,695	1,277	2,13

DS (0.250), CV (0.060)

B. RESULTADOS DEL ESTUDIO

1. Características de la población en estudio

En primera instancia es importante denotar que la población con la que se definió realizar el estudio, es una población abierta debido a que las participantes presentaban algún tipo de lesiones intraepiteliales, destacando que los médicos ginecólogos las refieren al Instituto para complementar el estudio Papanicolaou con diagnóstico de VPH, debido a que se encuentra directamente relación con el desarrollo de CC.

Aceptaron participar del estudio, mediante consentimiento informado, 70 participantes quienes llenaron el cuestionario de información sociodemográfica y gineco-obstetra. El promedio de edad de las participantes fue de 34 años (15 – 49 años).

Según los datos obtenidos, el 84% de las participantes refiere no usar ningún método anticonceptivo o usan métodos que no las protegen de contraer la infección (por ejemplo: uso de pastillas anticonceptivas, ritmo y dispositivos intrauterinos). También se puede indicar que 63% de las participantes tiene en promedio 2 hijos, es decir que la mayoría ha tenido al menos 1 embarazo a lo largo de su vida (tabla No 12). La mayoría de las participantes refiere no tener hábitos de consumo de tabaco, ni de alcohol en una 80 y 70%, respectivamente.

Tabla No 13 Características sociodemográficas de la población en estudio

Característica	Rango Poblacional (%)
Rango de edad	15 – 49 años (Promedio 34 años)
Estado civil	Soltera 37/70 (53) Casada 32/70 (46) Divorciada 1/70 (1)
Antecedentes gineco-obstetricos	Sin hijos 26/70 (37) Con hijos 44/70 (63)
Método anticonceptivo	Ninguno 41/70 (59) Barrera (condón) 11/70 (16) Anticonceptivos 9/70 (13) Ritmo 6/70 (8) DIU 3/70 (4)
Hábito de fumar	Si 14/70 (20) No 56/70 (80)
Hábito de consumo de alcohol	Si 21/70 (30) No 49/70 (70)

2. Frecuencia de infección por el Virus de Papiloma Humano en la población en estudio

Los resultados del diagnóstico molecular de VPH screening en las 70 muestras genitales, mostro que el 57% (n=40/70) de las participantes fue positiva a la infección (Figura N° 13). Toda vez que el ensayo de screninng utiliza primer de consenso (MY09 y MY11) dirigidos a amplificar la región conservada del genoma VPH, los resultados indican que la población en estudio presenta infección con una o más variedades genéticas de VPH de alto riesgo oncogénico, de bajo riesgo oncogénico o ambos (Figura N°18). Por lo anterior, para fines de tratamiento y/o seguimiento de la infección, se realizó una mayor caracterización, identificando la población que cursa infección con virus de alto riesgo oncogénico.

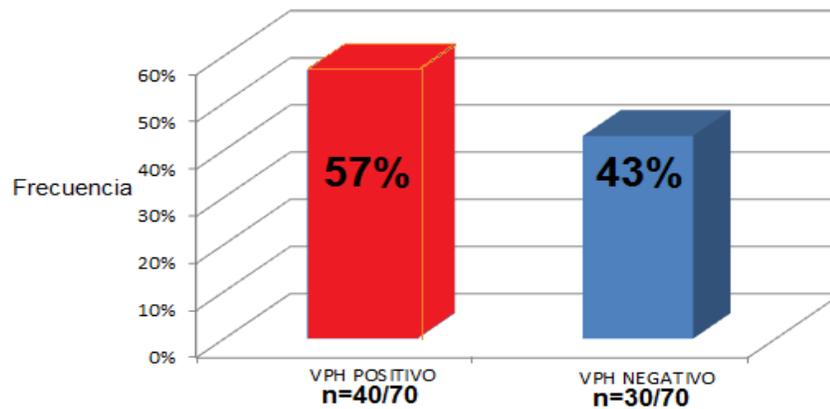


Figura N°18 Frecuencia de infección por VPH en muestras genitales

2. Frecuencia de infección por Virus de Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico

Las muestras de las 40 participantes que presentaron resultado positivo para la detección del VPH screening, fueron analizadas para identificar VPH de alto riesgo oncogénico. Se encontró que 25/40 muestras fueron positivas. Toda vez que para esta identificación de VPH alto riesgo se realiza mediante el uso de un coctel de primers dirigidos contra las regiones de VPH A6, A7 y A9 de oncovirus, el resultado nos indica que el 63% de la población presenta reactividad para algún oncotipo de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66 y/o 70.) (Figura N°19).

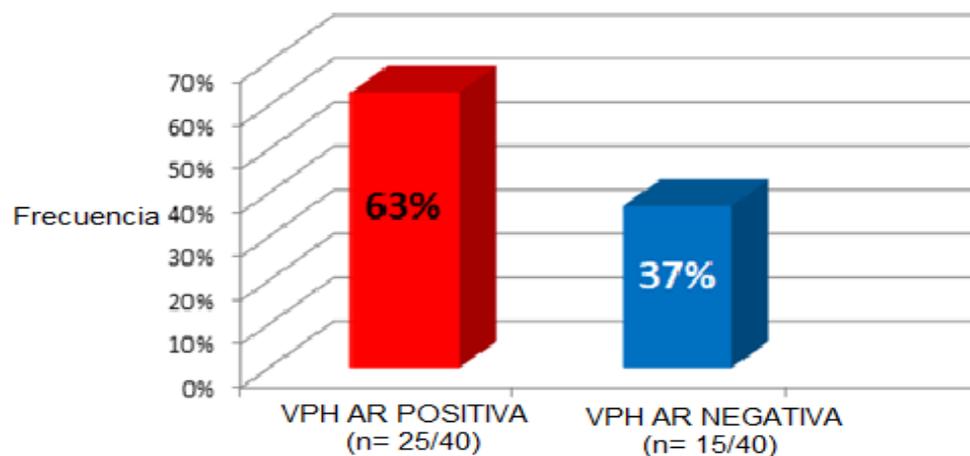


Figura N°19 Frecuencia de infección por VPH de alto riesgo oncogénico

4. Frecuencia de infección con oncotipos de Virus de Papiloma Humano genotipo 16, 18.

Las 25 participantes que presentaron resultado positivo de infección con VPH – Alto riesgo oncogénico fueron analizadas para tipificación de los genotipos más frecuentemente relacionados (>70%) con la generación de Cáncer Cervical en el mundo, siendo más agresivos el oncotipo 16 y el oncotipo 18. Esta tipificación se realizó mediante el uso de primers que reconocen la región específica de estos oncotipos E6 y E7 por separado.

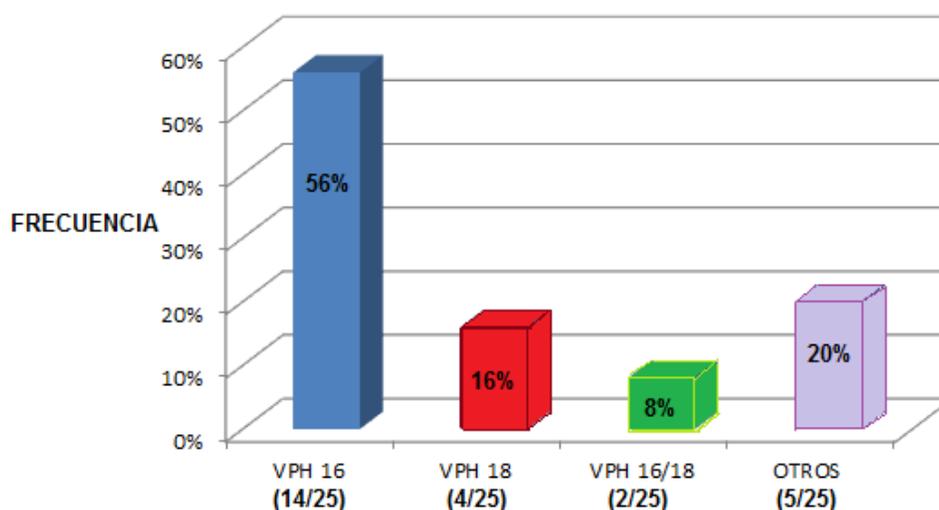


Figura N°20 Tipificación de oncotipos VPH tipo 16, 18 y otros

Como se puede observar en la Figura N°20, en el estudio determinamos que el oncotipo con mayor frecuencia es el tipo 16 (n=14/25) el que corresponde al 56% de la población, mientras que el 16% de la población presenta infección con el oncotipo 18 (n=4/25). Solo el 8% de la población presenta co-infección con ambos oncotipos 16 y 18 (n=2/25). El 20% de las participantes fue negativa para estos oncotipos, por lo que prevé que las otras variedades de VPH oncogénicos pueden estar presentes en esta población (31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66 y/o 70). En el estudio no se realizó la tipificación de estos oncotipos, sin embargo será necesario abordar esta tipificación en estudios posteriores, que es importante para fines de uso de la vacuna en nuestro medio y su relación de protección de la población.

5. Análisis de la asociación de la infección por VPH y los biofactores nutricionales

5.1 Agrupación de la población de estudio según infección por Virus de Papiloma Humano

Para fines del análisis de asociación de datos (micronutrientes - VPH) se agruparon a las 70 participantes en tres grupos: Alto riesgo positivas, bajo riesgo positivas y alto/bajo riesgo negativas. Esta agrupación se realizó considerando los datos obtenidos entre la detección de VPH screening (población no reactiva) que nos determina la población que es negativa para todos los genotipos de VPH, y VPH (reactiva) – VPH alto riesgo (no reactiva) que determina que la población es positiva para VPH bajo riesgo y finalmente VPH alto riesgo (reactiva) que determina que las participantes son positivas para alguno de los oncotipos (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66 y 70) (Figura N°21).

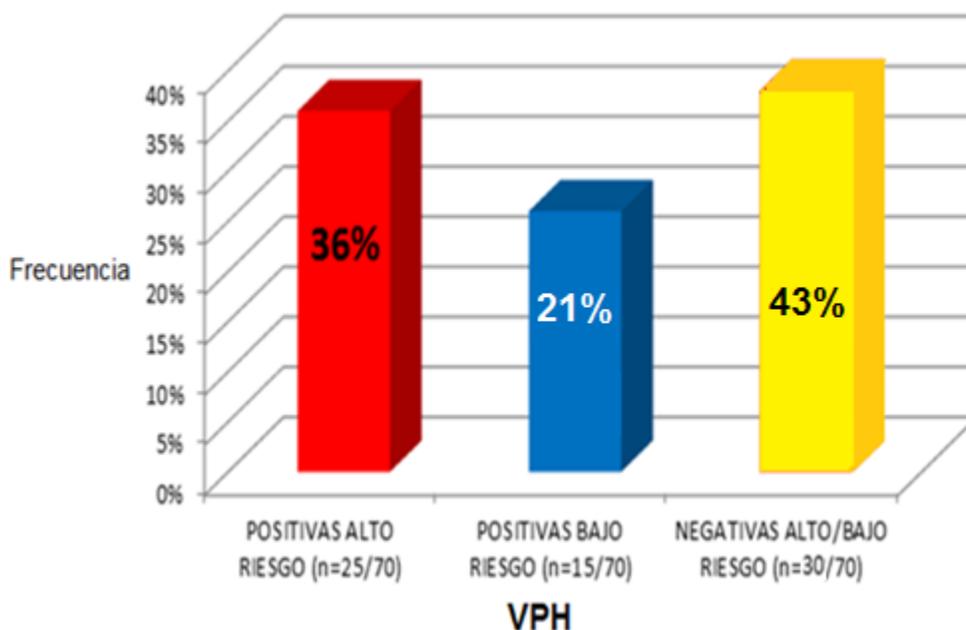


Figura N°21 Frecuencia de infección por VPH alto riesgo, bajo riesgo y negativas en las muestras de estudio

En el estudio obtuvimos que el 36% (n=25/70) de la población presentó reactividad positiva para algún genotipo de VPH-AR, el 21% (n=15/70) de las participantes presenta

reactividad positiva para VPH-BJ y el 43% (n=30/70) de la población es negativa para todos los tipos de VPH (alto/bajo riesgo).

5.2 Niveles de vitamina A, a través de la proteína fijadora de Retinol (RBP) en población con o sin infección por VPH

La RBP es una proteína plasmática que une retinoides, su función es el transporte de los retinoides unidos a los tejidos diana, el proceso por el cual el Retinol se incorpora a las células diana depende de la existencia de receptores para RBP en dichas células.

En el análisis que se realizó en las 70 muestras tenemos que los niveles de Retinol se encuentran dentro de la normalidad en un 74% (n=52/70) y existe una disminución en un 26% (n=18/70), de la población, observándose que estadísticamente no existe significancia entre los niveles de Retinol y presencia de VPH alto riesgo ya que obtuvimos un valor de chi cuadrado de 0,232 para $p < 0,05$ (Tabla N°14).

Tabla N° 14 Detección de los niveles de Retinol en la población clasificados en los distintos grupo de VPH (alto/ bajo riesgo positivos y negativos)

MARCADOR (GRUPO)	Nivel de Retinol				TOTAL
	Normal		Disminuido		
	#	%	#	%	
VPH-AR Positivo	18	72	7	28	25
VPH-BR Positivo	11	73	4	27	15
VPH-AR/BR Negativo	23	77	7	23	30
TOTAL	52	74	18	26	70

Dado que el Retinol modula eficientemente la respuesta inmunitaria, su determinación en la población en estudio (70 participantes) tuvo un promedio de 16 mg/dL (rango de referencia 12,7 a 48,6 mg/dL). Para aquellas participantes VPH –AR positivas el promedio de los niveles de Retinol fue de 14,6 mg/dL (Figura N°22).

Para las participantes con diagnóstico de VPH bajo riesgo positivas el nivel de Retinol encontrado fue de 15,2 mg/dL, finalmente para la población que fue negativa para los dos grupos de VPH (AR/BR) el promedio del nivel de Retinol fue del 17, 2 mg/dL (Tabla N°12), encontrándose que los niveles promedio de Retinol se encuentran dentro de los rangos de normalidad en los tres grupos.

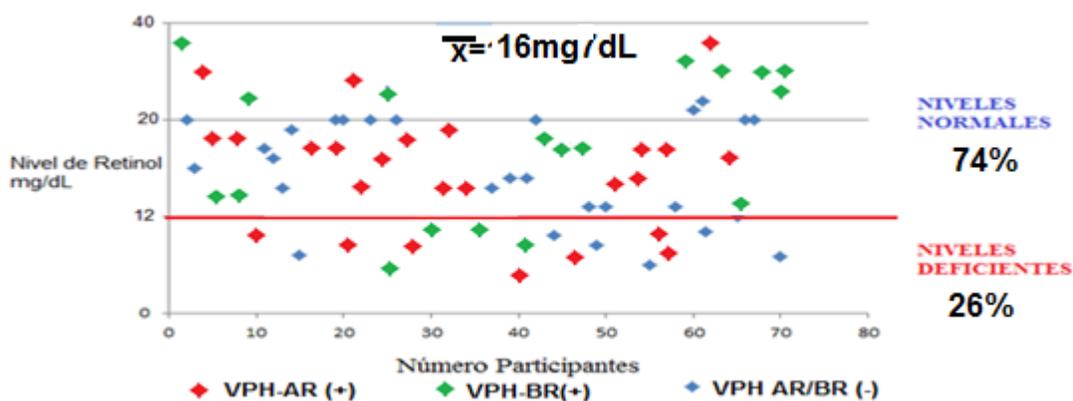


Figura N°22 Asociación Retinol y VPH en la población

5.3 Niveles de Hierro, a través de la Ferritina en la población en estudio

En el organismo hay un compartimento de depósito de hierro para atenderla demanda de células y tejidos, la molécula que cumple esta misión es la Ferritina intracelular. Bajo condiciones fisiológicas más del 50% del hierro en depósito se encuentra en la Ferritina, bajo esta condición se realizó su análisis en la población.

En la población en estudio se encontró que un 77% (n=54/70) presenta niveles de Ferritina dentro de la normalidad, mientras que en 23% (n=16/70) los niveles están disminuidos. Así mismo es importante resaltar que considerando el rango de referencia para la Ferritina, toda la población con niveles normales de este biomarcador presenta valores muy por debajo del rango medio. Estadísticamente no existe significancia entre los niveles de Ferritina y presencia de VPH alto riesgo ya que obtuvimos un valor de chi cuadrado de 0, 716 para $p < 0,05$. (Tabla N°15)

Tabla N° 15 Detección de los niveles de Ferritina en los distintos grupo de VPH (alto/ bajo riesgo positivos y negativos)

MARCADOR	Nivel de Ferritina				TOTAL
	Normal		Disminuido		
	#	%	#	%	
VPH-AR Positivo	18	72	7	28	25
VPH-BR Positivo	11	73	4	27	15
VPH-AR/BR Negativo	25	83	5	17	30
TOTAL	54	77	16	23	70

En nuestra población (n=70), en promedio se obtuvo que el nivel de Ferritina es de 11,6 mg/dL (rango de referencia 6 a 159 mg/dL). Para aquellas participantes VPH-AR positivas el promedio fue de 14,6 mg/dL, para las participantes con diagnóstico de VPH- BR positivas el promedio encontrado fue de 11,1 mg/dL, mientras que para aquellas participantes que son negativas para los dos grupos de VPH el promedio de niveles de Ferritina fue del 9, 3 mg/dL (Figura N°23). Concluyendo que los niveles de ferritina en la mayoría de la población se encuentran dentro de los rangos normales indistintamente del grupo al cual pertenecen (VPH -AR positivas, BR positivas y AR/BR negativas).

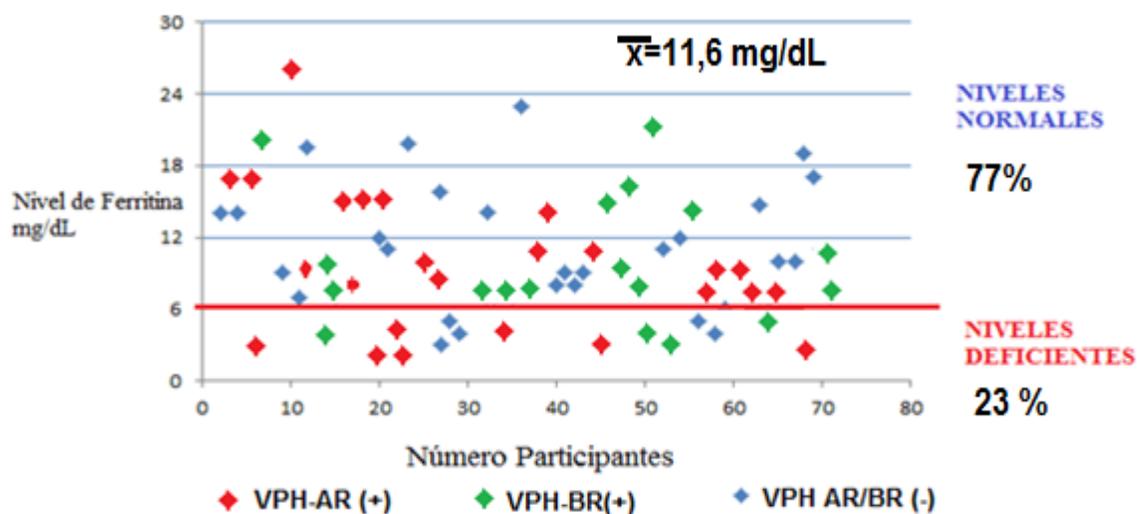


Figura N°23 Asociación Ferritina y VPH en la población

5.4 Detección de los niveles de Hierro a través del receptor soluble de Transferrina

El receptor de Transferrina (RTf) es una proteína trans-membranal, presente en todas las células del organismo, a excepción de los eritrocitos maduros. El receptor "soluble" de Transferrina (RsTf) es un fragmento del receptor de membrana. A diferencia de la Ferritina sérica y demás parámetros, el RsT no se afecta por la respuesta de fase aguda, es por esta razón que se empleó este marcador como evaluador de los niveles de hierro.

En la población en estudio de 70 muestras sanguíneas analizadas, los niveles de Transferrina se encuentran normales en un 76% (n=53/70) y existe una disminución de los niveles en un 24% (n=17/70). Estadísticamente no existe significancia entre los niveles de Transferrina y presencia de VPH alto riesgo ya que obtuvimos un valor de chi cuadrado de 0, 869 para $p < 0,05$ (Tabla N°16).

Tabla N° 16 Detección de los niveles de Transferrina en los distintos grupo de VPH (alto/ bajo riesgo positivos y negativos)

MARCADOR	Nivel de Transferrina				TOTAL
	Normal		Disminuido		
	#	%	#	%	
VPH-AR Positivo	18	72	7	28	25
VPH-BR Positivo	11	73	4	27	15
VPH-AR/BR Negativo	24	80	6	20	30
TOTAL	53	76	17	24	70

En el estudio en un total de 70 participantes, el promedio del nivel de Transferrina fue de 8,3 ng/mL (rango de referencia 5 a 26 ng/mL). Para aquellas participantes VPH –AR positivas el promedio del nivel de RsTf fue de 7,2 ng/mL, mientras que para las participantes con diagnóstico de VPH- BR positivas encontramos un nivel de RsTf fue 7,7 ng/mL y para aquellas participantes que son negativas para los dos grupos de VPH el promedio de niveles de RsTf fue del 10,1 ng/mL.(Figura N°24). Encontrando que estos valores guardan relación con los encontrados para la determinación de Ferritina.

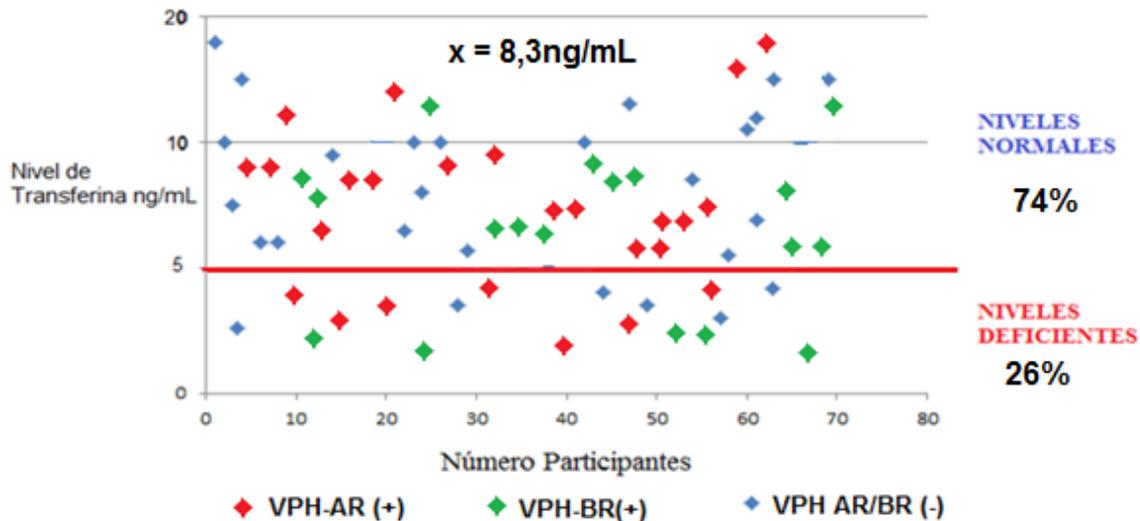


Figura N° 24 Asociación receptor soluble de Transferrina y VPH en la población

6. Relación de los factores biológicos con la infección por VPH

6.1 Relación de la infección por VPH bajo/alto riesgo con el uso de métodos anticonceptivos

El uso prolongado de anticonceptivos orales y la falta de uso de anticonceptivo o barreras físicas (condón) que protejan a la población de contraer VPH y otras infecciones de transmisión sexual, son factores que pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer cervical, es por esta razón que se realizó el análisis de esta variable con relación a la presencia/ausencia de VPH (Figura N°25). De las 70 participantes, 59% (n=41/70) de ellas reportó que no usa ningún método anticonceptivo, el 25% (n=3/70, 6/70 y 9/70, respectivamente), usan métodos anticonceptivos que no protegen a la participante de contraer infección por VPH y solo el 16% (n=11/70) de ellas refieren usar métodos de barrera como el uso de condón.

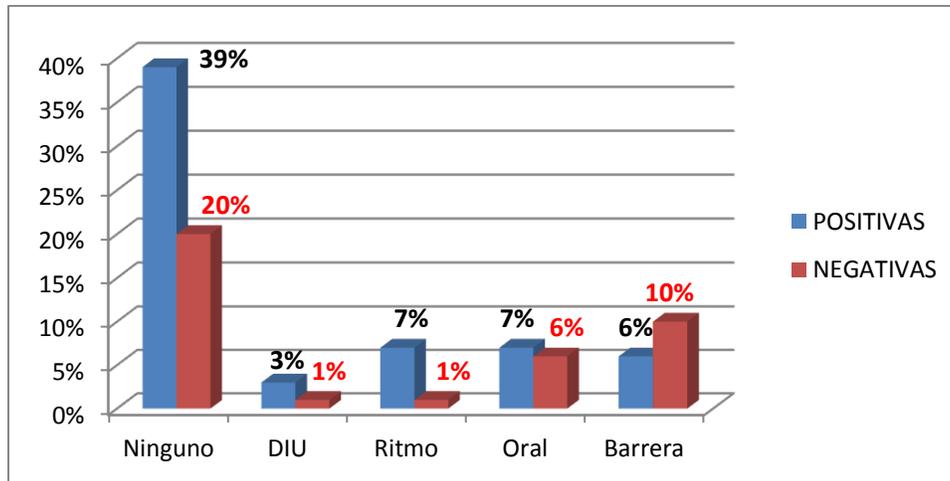


Figura N° 25 Frecuencia de uso de métodos anticonceptivos en la población en estudio (VPH alto/bajo riesgo positivas y negativas)

En la tabla N°17, podemos observar la distribución de frecuencias del uso de métodos anticonceptivos (barrera), de las participantes que no usan métodos anticonceptivos o usan métodos que no protegen de la infección (ninguno, DIU, oral y ritmo) siendo estas significativamente diferentes $\chi^2=2,65 > 1,95$

Tabla N° 17 Relación VPH con el uso de anticonceptivos.

Anticonceptivos	VPH		TOTAL
	POSITIVAS	NEGATIVAS	
Ninguno	27	14	41
DIU	2	1	3
Ritmo	5	1	6
Oral	5	4	9
Barrera	4	7	11
TOTAL	43	27	70

6.2 Relación de VPH bajo/alto riesgo según antecedentes gineco-obstetricos

La paridad provoca en la mujer un desbalance a nivel nutricional, hormonal e inmunológico lo que conlleva que podría promover la persistencia del VPH y el correspondiente desarrollo de CC. En el estudio se determinó que de la población, el 62% (n=44/70) refiere

tener hijos teniendo una media de 2 hijos por paciente (rango de 1 a 7 hijos). La distribución de frecuencias según positividad o negatividad para VPH alto/bajo riesgo se detalla en la Figura N°26.

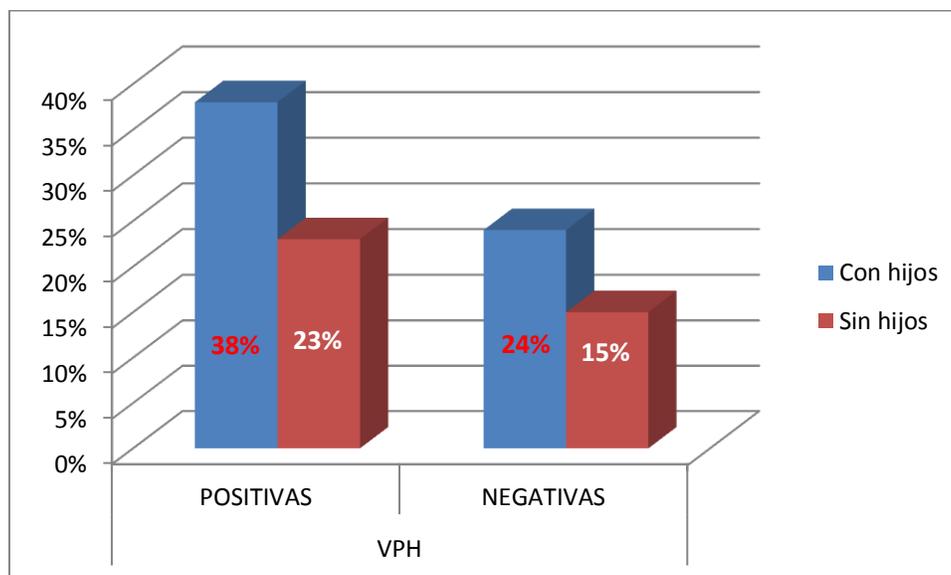


Figura N° 26 Frecuencia porcentual de la concepción en la población en estudio (VPH alto/bajo riesgo positivas y negativas)

El análisis de esta variable de número de hijos en la distribución de frecuencias entre los grupos en el estudio no es estadísticamente significativa teniendo un valor de $\chi=0,75 > 1,95$

Tabla N° 18 Relación VPH con los antecedente ginecoobstetricos.

Antecedentes ginecoobstetricos	VPH		TOTAL
	POSITIVAS	NEGATIVAS	
Con hijos	27	17	44
Sin hijos	16	10	26
TOTAL	43	27	70

6.3 Relación del estado civil y el VPH bajo/alto riesgo en la población

El estado civil de la población puede estar relacionado con la exposición al riesgo de contraer infección por VPH y otras enfermedades de transmisión sexual. Los estudios epidemiológicos reportan que el número de parejas sexuales es un factor de riesgo para la

infección con VPH. En el estudio de la población total (n=70) el 53% de participantes refirió estar soltera, el 46% se encuentran casadas y solo 1% de la población son divorciadas (Figura N°27).

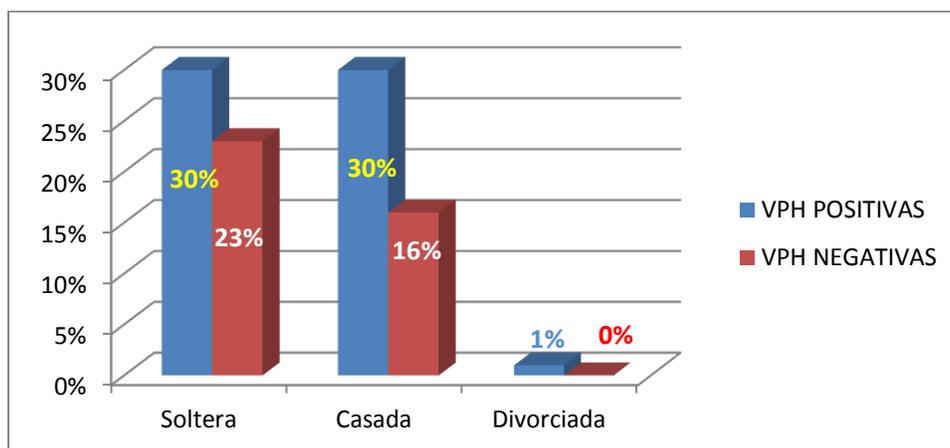


Figura N° 27 Frecuencia del estado civil en la población en estudio (VPH alto/bajo riesgo positivas y negativas)

La distribución de frecuencia entre los grupos no es estadísticamente significativa teniendo un valor de $\chi^2=0,75 > 1,95$

Tabla N° 19 Relación VPH alto/bajo riesgo con el estado civil de las participantes

Estado civil	VPH		TOTAL
	POSITIVAS	NEGATIVAS	
Soltera	21	16	37
Casada	21	11	32
Divorciada	1	0	1
TOTAL	43	27	70

6.4 El VPH bajo/alto riesgo y su relación con el hábito de consumo de tabaco

El consumo de tabaco se encuentra directamente relacionado con el desarrollo de cáncer cervical debido a que los metabolitos de los cigarrillos dañarían la mucosa genital (). En nuestra población en estudio, el 20% de las participantes (n=14/70) refiere consumir tabaco

y el 80% no consume, no tiene este hábito. Llama la atención que aquellas participantes que son VPH positivas tienen una mayor frecuencia porcentual de consumo de tabaco con respecto a los otros grupos 50% (n=7/14) (Tabla N°20).

Tabla N° 20 Relación VPH alto/bajo riesgo con el consumo de tabaco

CONSUMO DE TABACO	VPH				TOTAL	
	POSITIVA		NEGATIVA		#	%
	#	%	#	%		
SI	7	10	7	10	14	20
NO	36	51	20	29	56	80
TOTAL	43	61	27	39	70	100

6.5 El VPH bajo/alto riesgo y la relación con el hábito de consumo de alcohol

Del total de la población en estudio (n=21/70) el 30% de esta refiere consumir alcohol en eventos sociales (bebedoras ocasionales) y el 70% (n= 49/70) refiere que no realiza este consumo. En cuanto a la detección de VPH alto riesgo, en bebedores ocasionales el 33% (n=7/21), observándose un descenso al 16% (n=3/1) del consumo en aquellas participantes con VPH bajo riesgo positivas, finalmente las participantes que son VPH alto/bajo riesgo negativas tienen una mayor frecuencia porcentual de consumo del 52% (n=11/21).

Tabla N° 21 Relación de los casos de VPH alto/bajo riesgo con el consumo de alcohol

CONSUMO DE ALCOHOL	VPH				TOTAL	
	POSITIVA		NEGATIVA		#	%
	#	%	#	%		
SI	10	14	11	16	21	30
NO	33	47	16	23	49	70
TOTAL	43	61	27	39	70	100

VII. DISCUSIÓN

El cáncer cervical representa un problema grave de salud que conlleva la muerte de miles de mujeres a nivel mundial ⁽¹⁾. El CC es el segundo cáncer más frecuente dentro de este género, después del cáncer de mama; aunque en nuestro país, los datos epidemiológicos indican que el CC es la causa más frecuente de muerte de nuestra población femenina, donde se reporta que aproximadamente al día mueren 5 mujeres por esta causa ⁽²⁾.

En este tiempo es conocido que uno de los factores principales del CC es la infección persistente con genotipos oncogénicos del Virus de Papiloma Humano, sin embargo los estudios de este virus en nuestro medio son limitados y escasos. A esto, podemos sumarle el problema de desnutrición en Bolivia que es crítico, la prevalencia de desnutrición de mujeres en edad fértil es del 37% (FAO 2014); debido a la pobreza que aún nos aqueja y considerando que hoy en día vamos adoptando cada vez más hábitos de alimentación no naturales, como el consumo de alimentos transgénicos y de comida chatarra. La desnutrición puede promover un estado a la persistencia del VPH debido a un status inmunitario deficiente por la deficiencia de micronutrientes.

En este contexto, el presente estudio se realizó con el propósito de caracterizar los factores involucrados en el desarrollo de CC en nuestra población y así contribuir al conocimiento de esta patología, su manejo clínico y de laboratorio.

En este marco en el trabajo estudiamos una población de 70 voluntarias con diagnóstico de diferentes grados de lesión intraepitelial, en la que se determinó la presencia de infección por VPH, la frecuencia de infección por VPH de alto riesgo oncogénico, la prevalencia de genotipos oncogénicos 16 y 18 en la población, así como los niveles de Retinol, Ferritina y Transferrina como marcadores biológicos involucrados en la eficiencia de la respuesta inmune antiviral. Así mismo se analizó la importancia de factores socioculturales en la infección por VPH.

Inicialmente varios componentes de laboratorio fueron puestos a punto o revisados para ser aplicados al presente trabajo:

A. Ensayo molecular *in house* para la detección de VPH

La detección de VPH se realizó mediante ensayo molecular (reacción en cadena de la polimerasa) *in house*, este ensayo fue estandarizado, optimizado y validado consistentemente en nuestro laboratorio, por varios estudios (S. Mancilla y cols., R. Salinas y cols., W. Machaca y cols., M. Patzi y cols). El ensayo molecular se realizó mediante el uso de primers de consenso MY09 y MY11 dirigidos a amplificar la región conservada del genoma VPH, y de este modo detectar en una sola corrida si una muestra presenta infección con cualquier genotipo de VPH (sea de alto o bajo riesgo oncogénico). Este ensayo incluye primers que son utilizados mundialmente, y cuya secuencia se comparó con diversos programas informáticos de alineamiento de secuencias de ADN. La inclusión de esta estrategia en el estudio de diagnóstico de VPH nos permitió discriminar a las personas que no cursan infección (aproximadamente 30% de la población) y por consiguiente una disminución de gastos que podría incurrirse con el empleo directo de técnicas que identifican VPH oncogénicos (aproximadamente 70% de la población) y que son de mayor costo.

B. Implementación de la técnica DBS

Con la finalidad de mejorar la participación de voluntarias en el estudio, así como aplicar procedimientos menos invasivos en el trabajo, se adoptó la técnica DBS que nos permite realizar la colección de muestras de sangre en papel filtro, lo que a su vez facilita la manipulación de este tipo de muestra biológica.

De este modo mejoramos las condiciones de toma de muestra ya que realizamos punciones capilares en lugar de punciones venosas. Una vez colectada la muestra se procedió a su elución con PBS, lo que nos permitió recuperar el Retinol en casi el 100%, la Ferritina/Transferrina en aproximadamente el 90% según la técnica ya establecida ⁽⁶⁵⁾. Sin embargo, existen factores que deben considerarse en el DBS, el mayor inconveniente que tenemos es el análisis de las muestras que debe ser inmediato, el tiempo de conservación de la muestra y la temperatura de almacenamiento.

El tiempo de conservación de la muestra es de alrededor de 2 semanas ⁽⁶⁵⁾, en el estudio se evidencio este hecho ya que después de este tiempo los niveles de las proteínas se reducen

en aproximadamente el 50%, debido a que las proteínas no permanecen estables. Shi y cols, ⁽¹³⁾ demostraron, en 1995, la posibilidad de medir retinol por esta técnica, encontrando que este sistema abría la posibilidad de medir confiablemente esta vitamina. Posteriormente, en 1999, Craft y cols ⁽⁹⁾, comprobaron que en este sistema se podía analizar retinol, hierro y zinc y que éste era comparable con el retinol sérico obtenido por punción venosa con una correlación de 0.90. Estos estudios nos indican que la medición de estos nutrientes se puede realizar tanto en papel DBS como en sangre venosa, obteniendo resultados similares, siempre y cuando se establezcan factores de correlación.

Posteriormente se procedió a calcular el factor de correlación interno comparando la cuantificación de la proteína en cuestión en sangre entera con el eluido. Se encontró los siguientes factores: 1.46 para el Retinol, 3.66 para Ferritina y 2.13 para Transferrina, estos factores permiten corregir las densidades ópticas de los eluidos con respecto a la muestra real (suero/plasma), y son establecidos para cada ensayo, además de ser únicos para cada kit. Por lo cual, los diferentes estudios realizados solo reportan el porcentaje de recuperación como el de Bertaso y cols.

C. Alta frecuencia de infección por Virus de Papiloma Humano

La detección de VPH se realizó a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, la cual es una herramienta altamente sensible y específica que detecta el genoma viral del VPH.

En el trabajo se realizó la detección de VPH en muestras genitales de 70 participantes obteniendo que el 57% de ellas (n=40/70) fueron positivas para VPH (incluye todos los genotipos del virus), lo que contrasta con anteriores hallazgos del Laboratorio en los que se identificó en población colposcópica el 45% (Mancilla y cols), mientras que en población de consulta ginecológica externa fue del 14.5% (Salinas y cols), La alta frecuencia de infección identificada en este estudio, podría deberse al hecho que las participantes provenían de consulta ginecológica en la que se evidenció necesidad de confirmar diagnóstico presuntivo clínico (Alteraciones en el PAP).

D. La infección con Virus Papiloma Humano de Alto riesgo oncogénico es altamente frecuente en la población estudiada, siendo el oncotipo VPH-16 el de mayor predominancia

Los VPH de tipo oncogénicos se encuentran directamente relacionados con el desarrollo de CC debido a que proteínas tales como E6 y E7, provocan una desregulación del ciclo celular evadiendo mecanismos de control mediados Rb y p53. Al momento, se han identificado más de 13 genotipos de VPH asociados con el desarrollo de CC. En este contexto con la finalidad de establecer la importancia de VPH oncogénicos en la población estudiada y así evaluar su relación con posibles estados de desnutrición se determinó la presencia genotipos de alto riesgo utilizando un mix de 13 pares de primers para los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66 y 70. Esta detección se efectuó en todas las participantes que dieron positivo para VPH screening (n=40/70) identificando que el 63% (25/40), de ellas presentaban reactividad frente a estos oncotipos y el 56 % de estas se deben a VPH16. Hoy en día, en el contexto mundial (Centro de Control de Enfermedades “CDC”) se conoce que solo el 10% de la población VPH positiva alto riesgo (incluso VPH-16) llega a desarrollar CC.

Además, la **OMS** reporta que el genotipo más frecuente a nivel mundial es el VPH 16, el estudio de Valdivia y cols, reporta que los genotipos mayormente encontrados en Chile son el 16 y 18 en un 75%, concordante con esto, el estudio de Lizano y cols, en México nos reporta que el genotipo 16 es el oncotipo mayormente encontrado en las lesiones intraepiteliales de alto riesgo, nuestro trabajo concuerda con estos datos latinoamericanos y mundiales. El identificación de los oncotipos circulantes en nuestra población coadyuvaría a fortalecer el uso de la vacuna la cual en su composición contiene al VPH 16 y VPH 18, pero se recomienda realizar la genotipificación de otros oncotipos como el 31 y 35 que también se encuentran ampliamente distribuidos y podrían encontrarse en Bolivia según un estudio realizado en Tarija (dato expuesto en la feria del Sistema boliviano de Universidades por la Universidad Juan Misael Saracho del cual no cuenta con una publicación)

Si bien los resultados de laboratorio fueron remitidos a su médico, en nuestro caso sería oportuno realizar seguimiento a estas pacientes con la finalidad de determinar el tiempo en que llegan a realizar la depuración del virus, para este cometido se debería contar con un estudio prospectivo de por lo menos de 2 años según otros estudio realizados. Así mismo en pacientes VPH-AR positivas, la genotipificación de VPH 16 y 18 se considera obligatorio toda vez que son los genotipos más virulentos. Su determinación positiva considera medidas preventivas de seguimiento cada 6 meses con la finalidad de evidenciar el control de la infección o prevenir el desarrollo de malignidad en caso de infección persistente. Toda vez que la depuración del agente depende básicamente de la capacidad inmunitaria del huésped, el presente estudio incluyó la valoración de parámetros inmunológicos como diagnóstico complementario.

E. Relación de parámetros inmunológico-nutricionales con la infección por VPH: VPH y niveles de Retinol

Se conoce que la persistencia del VPH provoca alteraciones celulares que a lo largo del tiempo desencadenarían el desarrollo de CC, pero este virus no actúa solo, el desarrollo de la patología va directamente relacionado con el status del sistema inmune, ya que la mayoría de las mujeres en algún momento de su vida cursan por la infección pero la mayoría de ellas llegan a depurar al virus, debido a un estado inmunitario adecuado, este estado es óptimo si se tiene una buena alimentación, ya que se estarían brindando los nutrientes adecuados para el óptimo funcionamiento del sistema inmune, para evidenciar tal efecto, se realizó la detección de Retinol, ya que muchos estudios reportan como este marcador nutricional estaría directamente relacionado con el adecuado funcionamiento de la RI, pero existen pocos estudios realizados de la relación de este nutriente con respecto a la infección por VPH, y estos nos reportan contradicciones entre los valores encontrados ⁽⁶⁶⁾.

Una respuesta inmune antiviral efectiva se encuentra caracterizada en primera instancia por la respuesta inmune innata y en nuestro caso la primera línea de defensa son las mucosas, y las células NK. Estudios in vitro han demostrado que la vitamina A ^(11, 12, 13) ejerce un efecto inmunomodulador a través del aumento del número de células NK y optimiza la

funcionalidad de las mucosas promoviendo la queratinización que es importante en la eliminación de células epiteliales infectadas. Además de la respuesta inmune innata, el Retinol ha mostrado modular la respuesta inmune adaptativa, principal mediadora del control/eliminación del virus. Se ha confirmado que el Retinol optimiza la respuesta tipo T ayudadora, lo cual provoca un aumento de la respuesta Th1 (IFN gamma, IL-2) y una disminución de Th2. El desbalance de esta relación sería el evento central por el cual el VPH no puede ser eliminado. Por lo tanto mantener los niveles de Retinol óptimos en una infección activa por VPH podría contribuir al control de la infección, lo que está en estudio en varios equipos de investigación.

En nuestro estudio, los niveles de Retinol que se obtuvieron tanto en las participantes positivas y negativas para la infección con VPH estaban en parámetros de normalidad en un 74% (media de 16 mg/dL) y no se estableció asociación. Similares datos fueron encontrados en el estudio prospectivo de Erin et.al., en Brasil que indica que no existiría asociación significativa entre esta proteína y el VPH, y postula que no existirían fuertes nexos entre estos nutrientes antioxidantes y la persistencia del VPH. Sin embargo existe mucha discrepancia entre los resultados hallados en diferentes estudios, según Jason en un estudio realizado en la Universidad de Pensilvania en el que evaluó los niveles de Retinol y ácido retinoico en pacientes con CC encontró niveles disminuidos de estos nutrientes, en contradicción a este estudio tenemos al estudio de Mc Gill y cols, que nos indica que los niveles de ácido retinoico, Retinol y carotenoides se encontraban en niveles normales en 40 participantes con alteraciones citológicas.

De modo similar, este marcador en nuestro estudio no sería un factor causal para que se dé el desarrollo de CC, además podemos percibir que aunque nuestra población no tenga buenos hábitos de alimentación, varios alimentos que se expenden vienen reforzados de contenido de vitamina A, y este aporte tal vez puede ser suficiente para cubrir las necesidades del nutriente en situaciones de infección activa. Aunque no se debe descuidar el hecho que los niveles detectados en nuestra población se encuentran en el rango inferior de normalidad. Sin embargo también está claro que al ser un proceso crónico (infección persistente por VPH) y dinámico, la carencia de este micronutriente sea evidente en estadios más avanzados de lesiones intraepiteliales, por lo que será necesario evaluar los

niveles de Retinol también en estos pacientes. Así mismo, en el estudio determinamos 11 participantes (15%) con infección positiva que presentaban deficiencia de este nutriente, de las cuales 7 además de tener la deficiencia también presentan reactividad frente al VPH- alto riesgo estas participantes representarían el grupo de riesgo a las cuales se les debería realizar un seguimiento para determinar la necesidad de restablecer niveles óptimos de Retinol y por consiguiente potencial mejora del control de la infección.

F. Relación de parámetros inmunológico-nutricionales con la infección por VPH: VPH y niveles de hierro

La detección de Hierro se realizó a través de los marcadores Ferritina/receptor soluble Transferrina, los cuales se midieron a través de los ensayos inmunoenzimáticos, esta medición se realizó a las 70 participantes del estudio detectando que los niveles de este marcador se encuentran dentro de la normalidad en un 74% y 77%, respectivamente. Se eligieron estos marcadores porque valoran los depósitos de hierro en el organismo (Ferritina), y la capacidad de captar al hierro (receptor soluble de Transferrina “RsTf”) sin que se vea alterado su nivel por las infecciones que pueda estar cursando el huésped (Stella Coy y cols). Dado que la Ferritina también es un marcador de fase aguda, se puede encontrar elevada en las participantes por otro tipo de infecciones, es por esta razón que para una mejor correlación se realizó la detección de hierro a través RsTf que no se ve afectado por esta situación, en nuestro caso ambas variables se correlacionaron en el estudio observando que no existió diferencias entre ambos marcadores; es decir, que en las participantes que tenían déficit de hierro, ambos marcadores se encontraban disminuidos. (Cascante, Quintana y Cols).

En el estudio estadístico no existe asociación significativa entre los niveles de Hierro y la presencia del VPH en las participantes, para tal entendido esto difiere con la hipótesis que indica que el déficit de hierro altera la respuesta inmune ya que actuaría a nivel de tres aspectos fundamentales. En primer lugar dentro la inmunidad innata ya que mecanismos bactericidas y bacteriostáticos dependen de los depósitos de hierro, en segundo lugar es un elemento necesario para la proliferación y maduración de células inmunitarias, y en tercer

lugar a través de proteínas como la Transferrina y lactoferrina de reducir la disponibilidad de hierro para consumo de elementos infecciosos, es por esta razón que es importante su medición como elemento responsable de modular la respuesta inmune, según varios estudios, como el de Castillo y cols en España, que nos indica que hierro participa en la respuesta a la infección de tal forma que su déficit puede impedir o dificultar el desarrollo de patógenos y su exceso favorecer las infecciones o su gravedad. Por otro lado, el aumento de las reservas de hierro pueden aumentar el riesgo de infección persistente por VPH ya que promovería la actividad viral y contribuye al daño oxidativo del ADN (Chantes y cols). Este hecho no se evidenció en nuestro estudio ya que este elemento se encuentra dentro de los niveles normales en nuestra población sea VPH positiva o negativa. El hierro es un nutriente de crecimiento para los seres humanos y se requiere para la replicación del ADN⁽⁶⁸⁾; sin embargo, también es esencial para la sobrevivencia de otros patógenos. En el metabolismo del hierro se ha demostrado puede ser alterado por varias infecciones virales, incluyendo el VIH, CMV y bacterias, lo que provocaría un desbalance del nutriente y fortalecería la persistencia de VPH. En nuestro estudio esta variable fue monitoreada gracias al receptor soluble de transferrina que no se ve alterado, si existe otro tipo de infección o proceso inflamatorio.

Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre cómo el VPH utiliza hierro celular. En estudio de Polkaj y cols, demostró *In vitro*, como las concentraciones elevadas de hierro promueven el crecimiento celular de VPH en células SiHa, aumento de la expresión de E6 / E7, y el tratamiento con quelantes de hierro inducida por la detención del crecimiento y la apoptosis. Nosotros no encontramos participantes con niveles elevados de este elemento, solo identificamos la deficiencia de este elemento en un 36 y 33% de las participantes que son VPH alto/bajo riesgo positivas y negativas, un estudio realizado por Siegel y cols, indica que las mujeres con niveles de hierro por encima de la mediana eran más propensas a depurar el virus en menor tiempo, en nuestro estudio se obtuvo que la media de Ferritina es de 11,6 mg/dL y de Transferrina fue de 8,3 ng/mL, los cuales se encuentran en el límite inferior de normalidad, que luego se podrían observar disminuidos si la población en estudio va desarrollando diferentes tipos de alteraciones celulares, es por esta razón que es importante realizar, en un estudio prospectivo, la determinación de los niveles de hierro y la

detección de VPH para determinar el tiempo de depuración del virus y si los niveles de este elemento coadyuvan a tal efecto, o si las participantes llegan a desarrollar mayores lesión intraepiteliales y si el elemento va disminuyendo, lo que sobrellevaría al desarrollo de CC.

Es importante indicar, que en el caso de este elemento debe encontrarse dentro de la normalidad es decir en balance casi perfecto porque una alteración de sus niveles (elevación - deficiencia) provoca alteraciones en el huésped y en el patógeno lo cual se encuentra directamente relacionado con el CC. Este resultado es apoyado por Erin y cols que en su estudio observó que las mujeres con los niveles más altos de Ferritina tienen menor probabilidad de eliminar infecciones por VPH en comparación con las mujeres con niveles bajos de Ferritina. A su vez, en un estudio realizado por Pynaert y cols se encontró que los niveles disminuidos de hierro no tienen significancia en el hecho de eliminar el VPH, en comparación al hábito de fumar que fue el factor que se relaciona directamente con el progreso a CC. Nuestro estudio determinó que el hierro no se encuentra asociado con la infección por VPH en nuestra población, pero es importante ampliar la población en estudio estratificándola por niveles de alteración celular y observando si existe o no depuración viral.

G. Relación de parámetros biológicos (edad, antecedentes ginecoobstetricos, etc) con la infección por VPH

Muchos estudios han identificado factores relacionados con la persistencia del VPH y el desarrollo de CC, entre ellos podemos mencionar; el uso de anticonceptivos, la multiparidad, hábitos de fumar y consumir bebidas alcohólicas.

El no uso de anticonceptivos de protección como el condón podrían incrementar el riesgo a contraer la infección y en nuestro estudio el 59% de las participantes refiere no usar ningún método anticonceptivo, y son precisamente estas participantes las que presentan reactividad frente al VPH en un total de 13 casos, por otro lado el uso prolongado de anticonceptivos por vía oral, podría favorecer la integración del VPH con el genoma celular, además está demostrado que el CC es hormona-dependiente, por lo que debería considerarse con

cuidado la utilización de estos medios de control de la natalidad en pacientes positivas para VPH de alto riesgo, principalmente VPH 16 y 18.

La multiparidad es otro factor que contribuye a la persistencia del VPH, debido a que se relaciona con las participantes que sufren traumas gineco-obstetricos repetitivos. Estos procesos dañarían las capas de estratos epiteliales. En nuestro estudio se encontró una media de 2 hijos por participante y estadísticamente no existe significancia ya que no sería un factor de riesgo, aunque está claro que la multiparidad está referida a mayor número de hijos.

El hábito de fumar es otro factor de riesgo, ya que numerosos estudios han establecido que daña las mucosas y reduce el número de células Langerhans, por ende las funciones inmunológicas resultan alteradas. En nuestro caso, el 80% de las participantes refiere no fumar, de este modo se puede evidenciar que ninguno de los factores biológicos se correlacionan con la presencia de VPH, a excepción de los anticonceptivos que sí tuvieron significancia entre los diferentes grupos, ya que la mayoría de la población (59/70), no usa condón que sería el método más seguro para no contraer la infección. Según un estudio realizado por la Colaboración Internacional de Estudios Epidemiológicos del Cáncer de Cérvix (ICESCC) reporta que las mujeres fumadoras presentaban un aumento significativo del riesgo de desarrollar CC en comparación con las mujeres que nunca habían sido fumadoras, en nuestro estudio este factor de riesgo resulto ser no significativo.

VIII. CONCLUSIONES

En nuestro estudio, el 57% de las participantes presentaba reactividad frente algún tipo de VPH, siendo el oncotipo más frecuente el VPH-16.

La finalidad del trabajo es brindar un diagnóstico integral de la patología, tomando en cuenta factores nutricionales como moduladores de una respuesta inmune eficaz, para esto se realizó la detección de Retinol y Hierro como inmunomodulares, los cuales presentan niveles normales en nuestra población, por ende contribuirán a la depuración del VPH.

En particular existieron 7 participantes que presentaron deficiencia de hierro y Retinol a la vez y que además presentaban reactividad frente al VPH-AR oncogénico, este habría de ser un grupo de riesgo que podría llegar a desarrollar CC, para tal efecto se debería evaluar la depuración del virus y los niveles de los biomarcadores en diferente tiempos, recomendándose un periodo mínimo de 6 meses durante 2 años.

Los otros factores de riesgo como la multiparidad, hábitos de fumar y consumo de alcohol cuales no presentan asociación con la presencia o ausencia VPH a diferencia del uso de métodos anticonceptivos que estarían directamente relacionados con la posibilidad de contraer la infección por VPH.

Finalmente el diagnóstico de cáncer cervical debe realizarse de manera integral tomando en cuenta al agente patológico, ambiente y huésped, de esta manera se lograra realizar un tratamiento dirigido para cada caso en particular.

IX. RECOMENDACIONES

Según el estudio realizado, se recomienda complementar los análisis en una población cerrada, participantes con alteraciones en la citología cervical, que acudan a la unidad de colposcopia, en las cuales se evidencie según el grado de lesión cuales son los niveles de los inmunomodulares (Retinol y Hierro).

Toda vez que la depuración del agente depende básicamente de la capacidad inmunitaria del huésped, y la capacidad inmunitaria depende de la nutrición se recomienda realizar un estudio de tipo longitudinal, en cual se evidencie este hecho, determinándola carga viral de VPH y los niveles de estos micronutrientes en diferentes periodos, recomendándose el seguimiento cada 6 meses durante 2 años.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Richard Lord, Planificador de Acción para la detección del Cáncer Uterino (PATH), disponible en:<http://www.rho.org/aps/learn-basics.htm>
- 2.- “Bolivia: Cada vez más mujeres contraen cáncer cervicouterino”, EJU noticias, 03 de marzo 2014 disponible en:<http://eju.tv/2014/03/cncer-de-cuello-uterino-mata-a-5-mujeres-al-da/>
- 3.- OMS/OPS: reducción de desnutrición en Bolivia es un hito histórico para la región, disponible en: <http://www.boliviaentusmanos.com/noticias/bolivia/181075/omsops-reduccion-de-desnutricion-en-bolivia-es-un-hito-historico-para-la-region.html>
- 4.- Merle JL. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. OPS, 11 de octubre de 2005, Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/NC/pcc-ccsit-lac.htm>
- 5.- Elena de la Fuentes, 47 preguntas sobre el VPH, Universidad de Valencia (2008)
- 6.- De la Fuente Villarreal, David. “Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico”. Departamento de Anatomía Humana- Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. Mexico (Marzo 2010).
- 7.- Lopez Saavedra, Lizano “Cáncer cervical y virus del papiloma humano: La historia no termina”. Unidad de investigación Biomédica en Cáncer; Instituto Nacional de Cancerología, Mexico D.F. Cancerología 1 (2006).
- 8.- ClaresPochet, María del Carmen. “Caracterización de las respuestas inmunocelular y humoral en pacientes con virus del papiloma humano”. Hospital Provincial Docente Clínicoquirúrgico “Saturnino Lora Torres”, Santiago de Cuba (2012).
- 9.- Ortiz, Andrellucchi. “Nutrición e inmunidad” Grupo de Investigación en Nutrición, Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España; Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) (2007).
- 10.- K. Klasing. “Interacciones entre nutrición y el sistema inmune” XI Curso de Especialización FEDNA, Barcelona (2005).
- 11.- Vilaplana Batalla, Montse. “Nutrición y sistema Inmunitario una relación muy estrecha” Farmacéutica comunitaria. Máster en Nutrición y Ciencias de los Alimentos (2010).
- 12.- Tamura J, y col. Immunomodulation by vitamin A: augmentation of CD8+ T lymphocytes and natural killer (NK) cell activity in vitamin B12-deficient patients by methyl-B12 treatment. ClinExpImmunol. 1999.

- 13.- Jpynson, Jacobs et al. "Deficit in cell mediated immunity in patients with iron - deficiency" (1992).
- 14.- Alimentos funcionales para una alimentación saludable. Disponible en URL <http://www.nutricioncomunitaria.com> (2006).
- 15.- Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* (1997).
- 16.- Rebecca L. Inmunidad del tracto intestinal. Procesamiento de antígenos. *AlergolInmunologyClinicUniversity Arizona* 2001.
- 18.- González-Gross M, Marcos A. Functional foods and the immune system: a review. *Eur J Clin Nutr*. 2002
- 20.- Bichara, Frida E. "Determinación del tipo de anemia y su relación con la ingestión alimentaria y marcadores bioquímicos en pacientes con cáncer cérvico uterino" *Rev Chilena de Nutrición*, Vol. 36, N°4, Diciembre 2009
- 21.- Mayor A. Randomized double blind trial of beta-carotene and vitamin C in women with minor cervical abnormalities (1999).
- 22.- Boham S, González-Gross M, Marcos A. Functional foods and the immune system: a review. *Eur J Clin Nutr*. 2002.
23. Chantes I, Schade AL. An iron binding component in human blood plasma. *Science*.
- 24.- Bhaskaram C, Reddy V. Cell mediated immunity in iron and vitamin deficient. *Br Med J*.
- 26.- Datos programa nacional de desnutrición cero Bolivia, prensa La Paz 2013.
- 27.- ZurHausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiology Immunology* 1997.
- 28.- Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, et al. Type specific persistence of high human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002.
- 29.- Juarez Gerardo. "Diagnóstico molecular del VPH tesis para optar el grado de maestría en ciencias, especialidad en biomedicina molecular. Instituto Politecnico Nacional, Mexico. 2007.
- 30.- Perfil epidemiológico del cáncer cervicouterino en Mexico. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. Octubre –diciembre 2009.

- 32.- Consuegra Mayor Claudia y colaboradores. "El Virus del Papiloma Humano, agente viral precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical". Salud UNINORTE. Barranquilla (Col.), 19: 3-13, 2004.
- 33.- Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogénesis. *Cancer Res.* 2010.
- 34.- Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules:infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS.* 2010.
- 35.- Chow L, Broker T, Steinberg B. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS.* 2010.
- 36.- Muñoz N, Bosch FX, de San José S, Herrero R, Castell sagué X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003.
- 37.- Carrillo-Infante C, Abbadessa G, Bagella L, Giordano A. Viral infections as a cause of cancer. *Int J Oncol.* 2007.
- 38.- Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007.
- 39.- Bergonzini V, Salata C, Calistri A, Parolin C, Palù G. View and review on viral oncology research. *Infect Agent Cancer.* 2010.
- 40.-WalboomersJmm, Jacobs Mv, Manos Mm. Human papillomavirus: a necessary cause of invasive cervical cancer world-wide. *J Pa thol* 1999.
- 41.-Marchal C, Rangeard L. Anemia impact on treat9. ments of cervical carcinomas. *CancerRadiother* 2005.
- 42.- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades Su fuente confiable de información sobre salud en internet Instituto Nacional del Cáncer (NationalCancerInstitute) Unidad de consultoria y desarrollo humano marzo 2011.
- 43.- Nees M, Geoghegan JM, Munson P, Prabhu V, Liu Y, Androphy E, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* 2000.
- 44.- Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 2002.
- 45.-Delvenne P. Immunologic response to (pre)neoplastic cervical lesions associated with human papillomavirus. *Bull MemAcad R MedBelg* 2005.

46.- Rincón, Olga L.; Pareja, Luis René; Jaramillo, Sergio; Aristizábal, Beatriz H. Virus Del Papiloma Humano, Respuesta Inmune Y Cáncer Cervical: Una Relación Compleja Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, vol. 58, núm. 3, septiembre, 2007,

47.- Rodrigo Arriagada D, Eugenio Suárez P, Omar Nazzal N, Raúl Larraguibel P, Luciano Rojas F, Pablo Escudero B, Alessandro Bronda M. Oncogénesis viral: virus papiloma humano (VPH) y cáncer cervicouterino. Rev. Obstet. Ginecol. - Hosp. Santiago Oriente Dr. Luis Tisné Brousse. 2007.

48.- Dr: Luis Miguel Allende Martínez, Efectos del retinol (vitamina a) en la Activación de linfocitos T humanos y sus Implicaciones terapéuticas. Universidad Complutense Madrid. 1997.

Dr. Arturo Llanes Castillo, Dra. Irma Aída Torres Fermán, Dra. Carmen Barrientos Gómez, Dra. Dolores Lin Ochoa. El cáncer cervico uterino, enemigo número uno de la salud de la mujer. Revista electrónica Medicina, Salud y Sociedad. 2011

49.- Batista Duharte, Alexánder. Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) Instituto Superior de Ciencias Médicas, MEDISAN 2003.

50.- Álvarez Aldana, Adalucy. Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. INVESTIGACIONES ANDINA.

51.- Forrelat Barrios, Mariela. Metabolismo del hierro. Instituto de hematología e inmunología. HEMOTER 2000.

52.- Valverde Muñoz, Ricardo. Las vitaminas y el sistema inmune. Universidad de Costa Rica 2009.

53.- La Vitamina A en la salud, revista Manual de Ver y Vivir.

54.- Acho Castro, Victoria. Cuidado Paliativo para Mujeres con Cáncer de Cuello Uterino: un manual para personal de salud que trabaja en la comunidad, Hospital Nicolas Ortiz Antelo.

55.- Jiménez Flores, Carolina. Tratamiento Nutricional en Pacientes con Cáncer Cervicouterino Cancerología 2 (2007).

56.- Rebozo-Perez J. Indicadores bioquímicos de la deficiencia de Hierro. Rev Cubana AlimentNutr 1997.

57.- González-Gross M, Wörnberg J, Álvarez R, Medina S, Marcos A. Los alimentos funcionales y su relación con el sistema inmune. En: Marcos A. Actualización en nutrición, inmunidad e infección. Madrid: Panamericana; 2003.

- 58.- Van Asbeck BS, Marx JJ, Struyvenberg A, VerhoefJ. Functional defects in phagocytic cells from patients with iron overload. *J Infect.* 1994.
- 59.- Dra. Annette Garbey cols, Retinoids Are Important Cofactors in T Cell Activation, From the Immunology Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Cancer, New York, 1992.
- 60.-Dr R. D. Semba, Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections Department of Ophthalmology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, 2009.
- 61.- A. Catharine RosS and Charles B. Stephensent. Vitamin A and retinoids in antiviral responses. Depailment of Nutrition, Pennsylvania State University.
- 62.- Alberto Chantes Guerraa y cols. El hierro, elemento metálico importante en la VIDA y en los procesos infecciosos. *Elementos* 85. 2012.
- 63.- Vicente Cascante Burgos. El Receptor Soluble De La Transferrina: Estudio Clínico De Un Nuevo Marcador Del Metabolismo Del Hierro. Universidad Complutense Madrid, 1999.
- 64.- Luz Stella Coy Msc, Martha Castillo1 Msc, Ana Isabel Mora1 Msc, Ana Lucía Oliveros1 Msc, Zulay Vélez. Estrategias diagnósticas utilizadas para detectar deficiencias de hierro subclínicas y asociadas a enfermedades crónicas. *Revista Científica NOVA*, 2005.
- 65.- Diego Alexander Bonilla Ocampo, Hierro: Metabolismo y Sistema Inmunitario, 2014.
- 66.- 1] Wang J & Pantopoulos K. Regulation of Cellular Iron Metabolism. *Biochem J.* 2011.
- 67.- Quintana Guzmán, Eugenia María; Salas Chaves, María del Pilar Receptores solubles de transferrina como mejor indicador bioquímico para definir deficiencia de hierro. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, vol. 44, núm. 3, julio-septiembre, 2010.
- 68.- Alejandro del Castillo-Rueda, Parham Khosravi-Shahi. The role of iron in the interaction between host and pathogen. *Medicina Clinica-Universidad Complutense*, Madrid, España, 2009.
- 69.- Bertaso, Sorio, Vandoros, De Palo, Bortolotti, Tagliaro. The use of finger-prick dried blood spots and capillary electrophoresis for carbohydrate deficient transferrin screening in forensic toxicology, 2016.
- 70.- Poljak-Blazi M1, Jaganjac M, Sabol I, Mihaljevic B, Matovina M, Grce M. Effect of ferric ions on reactive oxygen species formation, cervical cancer cell lines growth and E6/E7 oncogene expression. *Elsevier*, 2011.
- 71.- Siegel EM, Patel N, Lu B, Lee JH, Nyitray AG, Huang X, Villa LL, Franco EL, Giuliano AR. Circulating biomarkers of iron storage and clearance of incident human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 2012.

73.- Pagina 7. Tasa del virus de papiloma en el país es la más alta de la region, 2014. Disponible en: <http://www.paginasiete.bo/sociedad/2014/9/16/tasa-virus-papiloma-pais-alta-region-32370.html>

74.- Dr. Roberto P. Stock Silberman, IBQ. Rocío Vanessa Calderón Pascacio. Tecnicas de Laboratorio, Universidad deMexico, Cuernavaca, Morelos, 2007.

75.- María Daniela Sandin. Métodos de Estudio y Diagnostico Viral.

76.- Hubbard RA. Métodos para Detectar el Virus del Papiloma Humano. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2003.

Este trabajo se llevó a cabo, gracias a la cooperación de:

 <p>INSTITUTO SELADIS</p>	<p>INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD “SELADIS”</p> <p>LABORATORIO DE VIROLOGÍA, INMUNIDAD E INFECCIÓN PROGRAMA DE ESPECIALIDAD VERSION 13ava</p>
 <p>Asdi</p>	<p>AGENCIA SUECA DE COOPERACIÓN PARA EL DESARROLLO INTERNACIONAL “ASDI”</p> <p>PROYECTO: INFECCIONES VIRALES TROPICALES</p>
 <p>UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS</p> <p>V Convocatoria <i>para la presentación de Fondos Concursables</i></p> <p>IDH 2013 – 2014</p>	<p>V CONVOCATORIA PARA LA PRESENTACION DE FONDOS CONCURSABLES 2013-2016 IMPUESTO DIRECTO DE HIDROCARBUROS “IDH – UMSA”</p>