



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales**

«Epidemiología molecular del virus del papiloma humano
(HPV) en mujeres con lesiones cervicales en la ciudad de
Guayaquil-Ecuador»

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

Karla Stefanía Párraga Macías

GUAYAQUIL – ECUADOR

2015

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones que han brindado su apoyo en este trabajo: SENESCYT,
INSPI y ESPOL.

A las personas involucradas de forma directa o indirecta en todo este
proceso, especialmente a los integrantes del proyecto Papiloma.

DEDICATORIA

Para la mejor mujer, Madre, amiga y maestra de mi vida:

¡Feliz cumpleaños Mami!

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ph.D. Ana Tirapé Bajaña

PRESIDENTA

Ac. César Bedoya Piloza, M.Sc
DIRECTOR DE TESIS

Ph.D. Washington B. Cárdenas
EVALUADOR

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”.

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Karla Stefanía Párraga Macías

RESUMEN

El Virus del papiloma Humano (Human Papillomavirus) es considerado el virus de transmisión sexual más común. Es un virus de ADN, con un genoma de 8kb y carece de envoltura. Los HPVs causan verrugas y lesiones epiteliales en ciertos lugares anatómicos. En la actualidad se han detectado más de 120 tipos de HPV, de los cuales 15 son considerados de alto riesgo (HR-HPV) y, el resto de bajo riesgo (LR-HPV) o de riesgo indeterminado aún. La principal importancia médica de HPV es el desarrollo de una variedad de carcinomas asociado a los HR-HPVs principalmente HPV-16 y HPV-18. El cáncer asociado al HPV más frecuente es el de cuello uterino, documentado a nivel mundial como la segunda causa de mortalidad en mujeres que lo padecen. A nivel mundial y nacional, HPV es una infección de transmisión sexual (ITS) bastante frecuente, de la cual se tiene registros desactualizados y cuenta con un reducido número de estudios epidemiológicos.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar la epidemiología de HPV por diagnóstico molecular en mujeres que presentaron alguna lesión cervical. Se recolectaron 145 muestras de cepillado endocervical en distintos

centros de atención médica de la ciudad de Guayaquil. El diagnóstico se realizó por PCR convencional con primers MY11/09. De las muestras analizadas 73.8% fueron positivas y 26.2% negativas para HPV. Infecciones múltiples se determinó por multiplex qPCR empleando el Kit Anyplex II HPV 28, el cuál detecta 19 genotipos de alto riesgo y 9 genotipos de bajo riesgo. Este análisis dió como resultado un 2% de mono infecciones y 98% de infecciones múltiples. Estos resultados serán posteriormente relacionados con el tipo de lesión cervical y servirá para determinar la frecuencia de infección por HPV y los genotipos de alto riesgo más frecuentes en la ciudad de Guayaquil.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	VI
ÍNDICE GENERAL	VIII
ABREVIATURAS	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XVIII
INDICE DE GRÁFICOS	XX
INDICE DE TABLAS.....	XXII
INDICE DE ANEXOS.....	XXIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1:.....	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1. Virus del papiloma humano (HPV)	4
1.1.1. Antecedentes, clasificación taxonómica y características generales... 4	
1.1.1.1. Tipos de bajo/alto riesgo y su asociación con cáncer	8
1.2. Estructura del virus del papiloma humano.	10
1.3. Ciclo de vida de HPV	12
1.4. Citología del Virus/ Alteraciones citopatológicas	14
Exocervix normal.-	15
Cambios asociados al HPV	16
NIC 1	17
NIC2	17
NIC 3 y Carcinoma In Situ	18
Carcinoma invasor	18
Adenocarcinoma.....	18
1.4.1. Regresión de lesión, persistencia y progresión.....	19

1.5. Epidemiología	21
1.5.1. Factores de riesgo.....	23
1.5.2. Cáncer en Ecuador	27
1.6. Métodos de diagnóstico para HPV	29
1.6.1. Análisis citológicos e histológicos.....	29
Papanicolaou	30
Colposcopia	31
Prueba histológica.....	31
Biopsia	31
Estudio de endocervix	31
Conización.....	31
1.6.2. Análisis molecular de HPV.	32
Anyplex II 28 HPV.-.....	33
Capítulo 2:	36
Materiales y Métodos.....	36
2.1. Población de estudio	36
2.1.1. Tipo de estudio:	37
2.2. Criterios de inclusión.....	37
2.3. Criterios de exclusión	38
2.4. Muestras clínicas:.....	38
2.5. Factores a analizarse	39
2.6. Factores socio demográficos.....	39
2.7. Análisis de factores.....	40
2.8. Extracción de ADN:.....	40
2.9. Detección HPV:	40
2.10. Tipificación del virus y detección de infecciones múltiples.....	41
2.11. Análisis de datos	43
Capítulo 3:	1
Resultados.....	1
3.1. Matriz sociodemográfica del estudio.....	1

3.2. Detección de HPV mediante primers MY11/09 en distintos rangos de edad. 47	
3.3. Detección de HPV con primers MY11/09 según la lesión cervical de la paciente.	48
3.4. Detección de mono infección e infecciones múltiples con la tecnología Anyplex II HPV 28, Seegene	49
3.5. Frecuencia de los genotipos detectados por la tecnología Anyplex II 28 HPV, Seegene	50
3.6. Frecuencias de genotipos encontrados según la lesión cervical previa de cada paciente.....	51
3.7. p-value	52
Capítulo 4:	53
Discusión	53
Capítulo 5:	59
Conclusiones y Recomendaciones	59
5.1. Conclusiones.....	59
5.2. Recomendaciones:	61
Capítulo 6:	63
ANEXOS	63
Anexo A	64
Anexo B	65
Anexo C	66
Anexo D	67
Anexo E	68
Anexo F.....	70
Anexo G	71
Anexo H	72
Anexo I	75
Anexo J	78
Anexo K	81
Referencias bibliográficas:.....	86

ABREVIATURAS

WHO (World Health Organization) Organización mundial de la salud	NIC (Cervical intraepithelial neoplasm) Neoplasia intraepithelial cervical
ADN Ácido desoxirribonucleico	NIC 1 Displasia está en el tercio inferior del epitelio
ARN Ácido ribonucleico	NIC 2 Displasia está en los dos tercios inferiores del epitelio
PCR Reacción en cadena de la polimerasa	NIC 3 Displasia está en más de los dos tercios inferiores del epitelio
HPV (Human papillomavirus) Virus del papiloma humano	LSIL (Low grade Squamous Intraepithelial Lesion) Lesión intraepithelial escamosa de bajo grado
ITS Infección de transmisión sexual	HSIL (High grade Squamous Intraepithelial Lesion) Lesión
VIH Virus de inmunodeficiencia humana	
VHS Virus de herpes simple	

intraepitelial escamosa de alto grado	qPCR (quantitative Polimerase chain reaction) PCR cuantitativa en tiempo real
LR (Low risk) Bajo riesgo	M Molar
HR (High risk) Alto riesgo	mM Milimolar
CC Cáncer Cérvico	μM Micromolar
SCC (Squamud cell carcinoma) Carcinoma de células escamosas	mol Mol
p53 Proteína supresora de tumores	Mg Magnesio
pRb Proteína que inhibe la progresión del ciclo celular	mg Miligramo
nt Nucleótido	L Litro
Kb Kilobases	mL Mililitro
bp Pares de bases	μL Microlitro
ORF (Open Reading frame) Marco abierto de lectura	ng Nanogramo
LCR (Long control región) Región larga de control	% Porcentaje
	°C Grado Celsius
	min Minuto
	seg Segundo
	rxn Reacción

OR Odds Ratio

χ^2 Prueba Chi cuadrado

p probabilidad

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura del genoma de HPV (35).	10
Figura 2 Infección y acceso del genoma viral a las células basales. Para iniciar una infección latente, las partículas del virus tienen que acceder a las células epiteliales basales (7).....	13
Figura 3 Ciclo de vida infeccioso del virus del HPV. Varios tipos de HPV (por ejemplo los tipos de alto riesgo), en determinados sitios epiteliales, pueden conducir a neoplasias. La neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de diferentes grados puede ocurrir después de la infección de HPV. Si la infección ocurre con un HPV de alto riesgo puede predisponer a la progresión a cáncer en determinados sitios anatómicos (ejemplo: La zona anogenital) (50).	16
Figura 4 Progresión del epitelio normal a cáncer de cuello uterino (8).	21
Figura 5 Características de distintas pruebas para la detección de HPV (38).....	34
Figura 6 Colocación de controles positivos en el Set A y Set B. Fuente: Seegene Inc, 2013.....	84
Figura 7 Resultados prueba Kit Anyplex II 28 HPV	85

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Defunciones por cáncer- tasas por 100.000 habitantes, Ecuador 1980-2010 (51).	28
Gráfico 2 Detección de HPV en rangos de edades establecidos. En el rango de 50-59 años de edad, la frecuencia de HPV positivo fue del 83.333%, siendo la más alta en esta población.	47
Gráfico 3 Frecuencia de HPV con primers MY11/09 según la lesión cervical previa. Para las muestras con LSIL, el porcentaje de positivos fue de 73.91%, y para HSIL fue de 73.77%. A partir de los positivos para HPV con ambas lesiones cervicales, se procede a realizar el análisis con la tecnología Anyplex II 28.	48
Gráfico 4 Análisis realizado por la tecnología Anyplex II 28, tan sólo el 13.33% de pacientes en el rango de 50-59 años de edad tuvieron una mono infección, en la mayoría de los rangos de edad, las infecciones múltiples fueron del 100%	49
Gráfico 5 Número de casos de cada uno de los genotipos detectados por la tecnología Anyplex II 28. La mayor frecuencia fue HPV 58, luego HPV 70 y HPV 16	50
Gráfico 6 Barra de frecuencias de lesiones de bajo grado (LSIL) y de alto grado (HSIL), por cada uno de los genotipos detectables para la tecnología Anyplex 28. Las lesiones de alto grado fueron las prevalentes en la mayoría de casos.	51

INDICE DE TABLAS

Tabla I Clasificación de lesiones citológicas según su sistema de identificación (45).....	14
Tabla II Pronóstico de las lesiones NIC no tratadas (48).....	20
Tabla III Matriz de comportamientos sociodemográficos de la población de estudio, mostrándose los rangos de edades, centro de atención médica, estado civil, escolaridad, y situación laboral.	45
Tabla XI Componentes del Kit Anyplex II 28 HPV.	81
Tabla XII Volumen necesario de cada uno de los componentes para la preparación de la reacción para detectar infecciones múltiples.....	83

INDICE DE ANEXOS

Anexo A	64
Anexo B	66
Anexo C	67
Anexo D	68
Anexo E	69
Anexo F	71
Anexo G	72
Anexo H	75
Anexo I	78
Anexo J	81
Anexo K	81

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (HPV) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, tiene un genoma circular de ADN, con aproximadamente 8kb de tamaño, sin envoltura y es la etiología más frecuente de Infección de transmisión sexual (ITS) (1-3).

El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más común que afecta a las mujeres en todo el mundo, después del cáncer de mama, colorrectal y pulmón (3). Anualmente se han reportado 528 000 nuevos casos, los cuales son más notables en países de menores recursos económicos (4).

La región del sur de Asia alberga una cuarta parte de la carga del cáncer cervical (4-5).

La incidencia del cáncer cervical es muy variable dependiendo de la localidad y nivel de desarrollo de una población (7). Aproximadamente 83% se da en países en vías de desarrollo, especialmente África y Sudamérica, donde el cáncer cervical representa el 15% del total de los cánceres femeninos. Mientras que en los países industrializados el cáncer cervical figura alrededor del 3,6% (Anexo A) (3, 7).

En América Latina, aún no están establecidos los factores de riesgo asociados con la posibilidad de obtener cáncer de cuello uterino (la edad del primer coito, número de socios, el nivel socioeconómico, nivel educativo, genital higiene, enfermedades de transmisión sexual, etc.) (7-8).

El objetivo general de este trabajo fue el de describir la epidemiología molecular de HPV en mujeres con lesiones cervicales en la ciudad de Guayaquil-Ecuador. Entre los objetivos específicos tenemos:

- Implementar la tecnología Anyplex II 28 para la detección de HPV en la población de estudio.

- Determinar los genotipos más frecuentes en el estudio y clasificarlos según su riesgo oncogénico de acuerdo al tipo de lesión citológica.
- Correlacionar los resultados obtenidos de detección universal y genotipificación de HPV de las muestras de estudio con los datos clínicos y sociodemográficos de las pacientes estudiadas.

CAPÍTULO 1:

MARCO TEÓRICO

1.1. Virus del papiloma humano (HPV)

1.1.1. Antecedentes, clasificación taxonómica y características generales.

El Virus del papiloma Humano (HPV) es considerado el virus de transmisión sexual más común (10). Harald Zur Hausen en los años 70, propuso el rol de HPV en la formación del cáncer cérvico. A partir de eso, se lo ha sometido a estudios moleculares, epidemiológicos y clínicos; implicando al HPV como el agente etiológico de cáncer en el área anogenital incluyendo el cáncer cérvico (11). En la década de 1990, se confirmó la relación causal entre HPV y el cáncer de cuello de útero (12) siendo el carcinoma de células escamosas (SCC) el tipo más frecuentemente diagnosticado (80-90%), seguido de los adenocarcinomas (13).

HPV es una infección de transmisión sexual (ITS) que afecta el tejido epitelial como la región anogenital, piel, faringe y orofaringe (2,10). La mayoría de casos de cáncer de cuello uterino son la consecuencia de la persistencia de la infección por tipos de HPV de alto riesgo (HR-HPV) (14). El cuello del útero es especialmente vulnerable al contagio (14-15).

Las verrugas de la zona anogenital son de color carne planas o elevadas, las lesiones pueden ser solas o múltiples, siendo posible la latencia del virus en las células epiteliales durante años (17). El tiempo transcurrido entre la infección y los síntomas clínicos pueden ser bastantes largos (3).

Los Papillomavirus fueron designados como una familia distinta *Papillomaviridae*, en el séptimo informe de la ICTV (18). Dentro de *Papillomaviridae*, según publicaciones de Villiers et al. (2004), propuso la clasificación de 92 virus del papiloma humano (HPV) y 24 PV de tipo animal,

según pautas establecidas por el ICTV y la comunidad investigadora de PV (18).

Los Papillomavirus causan una variedad de proliferaciones benignas como: verrugas, quistes epiteliales, neoplasias intraepiteliales y papilomas en la zona orofaríngea (19). Dentro de la familia *Papillomaviridae*, cada rama filogenética relacionada remotamente entre papilomavirus se refiere a “género”, mientras que los grupos estrechamente relacionados son considerados “especies” (20). Las cepas de HPV son conocidos como “tipos” cuando la secuencia de nucleótidos de su gen L1 difiere de cualquier otro tipo al menos en 10% (1). El término “subtipo” refiere a las cepas aisladas que difieren entre 2-10% de la secuencia de cualquier tipo. Aislados independientes del mismo tipo que muestran una mínima diferencia de nucleótidos son llamadas “variantes” (1,18-19).

Se ha documentado más de 40 tipos de HPV que infectan el tracto genitourinario y región anal (21). El cáncer cérvico uterino (CC) es la segunda causa más común de cáncer a nivel mundial (22), relacionado en el 99.7% de los casos con el HPV (9,22).

Biológicamente, los HPVs se dividen en 3 grupos de acuerdo con su tropismo tisular (1,23). HPVs cutáneos.- Se encuentran frecuentemente en

verrugas cutáneas, lesiones cutáneas de pacientes inmunodeprimidos y algunos tumores epiteliales, los genotipos que podemos encontrar aquí son 1, 4, 5,8, 41, 48,60, 63 y 65 (1). HPV's mucosos.- Se los identifica porque se presentan en lesiones benignas y malignas del tracto anogenital, aunque ocasionalmente, se aíslan en tejidos y lesiones de la cavidad bucal, orofaringe y laringe incluso en esófago y lengua. Los genotipos asociados a estas afecciones son: 6,11,13,16,18, 26,30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 73 (15). Por último, hay un grupo de HPV's que se aíslan tanto en tejidos y lesiones ya sean cutáneas o mucosas, tales genotipos asociados son 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 44 57, 61, 62, 55, 66 y 72, pero su asociación con lesiones malignas no está del todo comprobada (15). En la mucosa genital de tipos de HPV como 6, 11, 42, 43, 44, 53, 54, 55,62 y 66 son principalmente encontrados en lesiones cervicales de bajo grado con genotipo 6 y 11 siendo la causa primaria de lesiones genitales o condilomas acuminados, mientras que los genotipos de alto riesgo son encontrados regularmente en displasias de alto riesgo, así como en cáncer cervical (1,10).

1.1.1.1. Tipos de bajo/alto riesgo y su asociación con cáncer

Se han identificado más de 120 tipos de HPV, y aproximadamente un tercio de estos infectan las células epiteliales de la mucosa genital (25).

Una nomenclatura de las variantes de tipo alfa-PV asociado con el cáncer cervical, basándose en las secuencias del genoma completo de HPV16 y HPV-18 con las variantes de linajes que se basa en la asociación geográfica (18).

Varios tipos de HPV de mucosas han sido identificados como agentes etiológicos de cáncer de cuello de útero y se denominan de alto riesgo (HR). Los tipos de alto riesgo (HR-HPV), incluyen los genotipos 16, 18, 31,52 y 58, que son los más prevalentes a nivel mundial. Otros genotipos de alto riesgo como el 33, 35, 39, 45, 51, 56, 59, 68, 73 y 82, son consideradas como los genotipos carcinogénicos más comunes; los genotipos 26, 53 y 66 son considerados como posibles carcinogénicos; y los genotipos 6, 11, 40, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 son los de bajo riesgo (4,21- 22).

Un avance importante en la asociación del HPV con el cáncer cervical se dió con la identificación y clonación molecular del HPV16 y HPV 18 (27), determinando que la mayoría de cáncer cervicales contenía ADN que se hibridaba con sondas específicas para estos dos genotipos(28) siendo asociados con el cáncer de cuello de útero (1,25-27). Además, la presencia de factores de riesgo , como las infecciones de transmisión sexual (ITS), múltiples parejas sexuales, el consumo de tabaco frecuente y la edad de la primera relación sexual, junto con la falta de programas de detección eficaces de HPV, contribuye a la dificultad de reducir la carga de cáncer cervical (28-29). Anteriormente, se pensaba que el HPV era solamente transmitido por el coito, pero ahora, se sabe que basta el contacto de piel a piel o de mucosa a mucosa para transmitir el virus, ya que presenta alto tropismo por tejidos (3).

Infecciones múltiples.- Coinfección con múltiples tipos de HPV podría aumentar el riesgo de lesión cervical. Sin embargo, los estudios de seguimiento sugieren que la presencia de múltiples tipos no influye en el curso de las infecciones por HPV (34).Múltiples tipos de HPV muchas veces coexisten dentro del epitelio cervical y son frecuentemente detectados junto con lesiones cervicales de alto riesgo (5).

1.2. Estructura del virus del papiloma humano.

El HPV es un virus de ADN doble cadena, circular, con un genoma aproximado de 8.0 kilobases (kb) (15). El genoma puede ser dividido en los siguientes dominios (Figura 1):

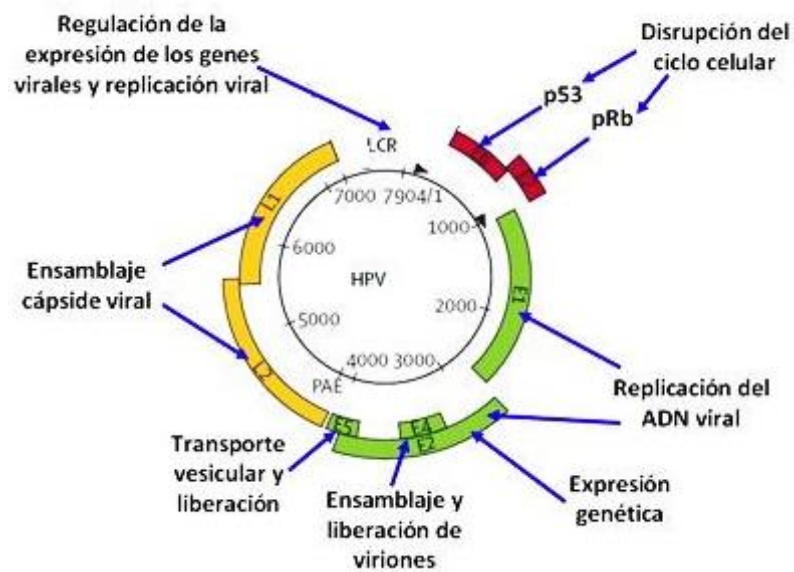


Figura 1 Estructura del genoma de HPV (35).

Región temprana (E: early): representa el 45% del genoma, tiene hasta ocho ORFs (E1-E8) que codifican las proteínas no estructurales, cuya función es controlar la replicación del ADN viral (6).

- La proteína E1 actúa en la replicación del ADN viral (ADNv) ya sea como agente inhibidor o de represión de la transcripción (6).

- Proteína E2.- También desempeña un papel funcional en la replicación del ADNv, se combina con la E1. Es responsable de las proteínas que codifican la regulación de transcripción del ADNv, transformación celular y transformación potencial de HPV. La inactivación de E2 afecta el desarrollo de lesiones tumorales mediante la expresión de E6 y E7, causando el aumento de p53 (6).
- E4: Proteína citoplasmática, pero que se detecta frecuentemente en el núcleo de la célula. Se expresa a menudo en las lesiones. Actúa en la maduración y replicación viral (6).
- E5: estimula la proliferación. También implicada en la transformación viral (6).
- Las proteínas E6-E7: son oncoproteínas transformantes, modificadores de la mitosis, aumentando la probabilidad de adquirir mutaciones celulares adicionales que contribuyen a la progresión carcinogénica durante la división celular (15). Están presentes en el deterioro del control de la regulación del ciclo celular y la maduración de células (6). La proteína E6 se conecta a p53, llevándola a la degradación proteolítica, resultando en una replicación descontrolada de células infectadas (15). La expresión de las proteínas E6-E7 dependerá la capacidad de bloqueo de proteínas del ciclo celular p53 y Rb. Esta expresión se verá modificada por factores como la carga

viral, la integración del genoma viral en el genoma celular o cofactores medioambientales (1, 15).

Región tardía (L: late): corresponde al 40% del genoma. Consta de dos genes (L1-L2), cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cápside. Dentro de la región L se encuentra la región larga de control (LCR) que constituye el 15% del genoma viral. Esta región controla la expresión de los genes E6 y E7 que son los oncogenes más importantes en HPV (6, 26,31).

1.3. Ciclo de vida de HPV

La replicación del virus del ADN ocurre en el núcleo de la célula huésped, proliferándose en el epitelio escamoso (34-35).

HPVs se adaptan a su anfitrión, y en la mayoría de los casos pueden completar su ciclo de vida y mantenerse en la población sin causar ninguna enfermedad aparente (38).

El ciclo de vida de HPV está vinculado con el estado de diferenciación del tejido epitelial del huésped. El receptor celular de entrada viral es aún

desconocido (1). El blanco de la infección inicial son las células epiteliales basales (39). En las células basales infectadas, los genomas virales se replican junto con el ADN celular y se distribuyen por igual a las células hijas estableciendo su genoma de 20 a 100 copias por célula basal infectada (1,34). Ya que HPVs no producen sus propias polimerasas, utilizan enzimas celulares para replicar sus genomas (40). E1 actúa como ADN helicasa, E2 actúa como un factor de transcripción y recluta E1 al genoma viral para permitir que funcione como ADN específico, permitiendo la replicación eficiente (41). La integración se presenta a menudo en sitios frágiles dentro del genoma del huésped los cuales son propensos a sufrir recombinación genética (42).

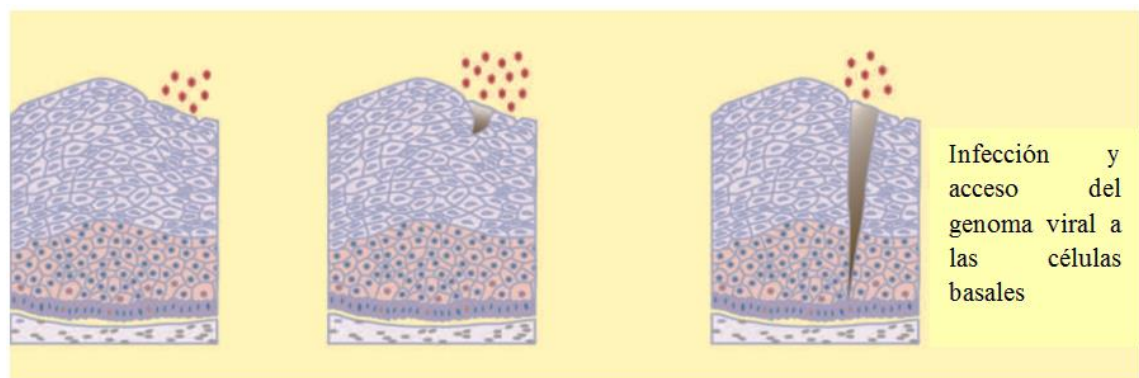


Figura 2 Infección y acceso del genoma viral a las células basales. Para iniciar una infección latente, las partículas del virus tienen que acceder a las células epiteliales basales (7).

HPVs expresan sus genes de forma secuencial, desde E1 hasta E7, resultando la expresión de las proteínas oncogénicas E6-E7 las cuales bloquean a las proteínas de control celular (8, 37).

1.4. Citopatología del Virus/ Alteraciones citopatológicas

El HPV es un patógeno intracelular estricto, por lo tanto, requiere internalizarse en la célula huésped para que se considere una infección verdadera (8,38).

A continuación, se muestra una tabla de clasificación de lesiones cervicales según el sistema de identificación:

Tabla I Clasificación de lesiones citológicas según su sistema de identificación (45).

Sistema de Papanicolaou	Sistema de la OMS	Clasificación NIC	Sistema de Bethesda
Clase I	Normal		Dentro de los límites normales
Clase II	Atipias Inflamatorias		Infección, cambios reactivos o reparativos
Clase III	Displasia Displasia Leve	NIC I	Anomalía de célula epitelial plana - Atipia de células escamosas - Lesión

	Displasia Moderada Displasia Severa	NIC II NIC III	intraepitelial escamosa SIL de bajo grado(incluye HPV) SIL de alto grado SIL de alto grado
Clase IV	Carcinoma In Situ	NIC III	SIL de alto grado
Clase V	Carcinoma Invasor de células escamosas Adenocarcinoma		- Carcinoma de células escamosas - Anomalía de células glandulares: Adenocarcinoma - Neoplasia maligna no epitelial

- NIC: Neoplasia intraepitelial cervical; SIL: Lesiones intraepiteliales escamosas; HPV: Virus del papiloma humano.

Exocervix normal.- La zona del cuello del útero consiste en un epitelio escamoso estratificado con una sola capa de células basales con células cúbicas pequeñas. Los queratinocitos presentan núcleos regulares, donde las células se aplanan progresivamente hasta que se desprenden de la superficie (9,43-44).

Cambios asociados al HPV.- Coilocitos son células epiteliales infectadas por virus con núcleos irregulares, agrandados y rodeadas por citoplasma claro y son indicativos de células infectadas por HPV. Sin embargo, la infección por HPV puede estar presente en el epitelio ectocervical en ausencia de coilocitos (9,45).

Hay dos vías para el seguimiento de ASCUS. Una es la de repetir las pruebas de frotis después de 1 año; el segundo es para la prueba de HPV (10,46).

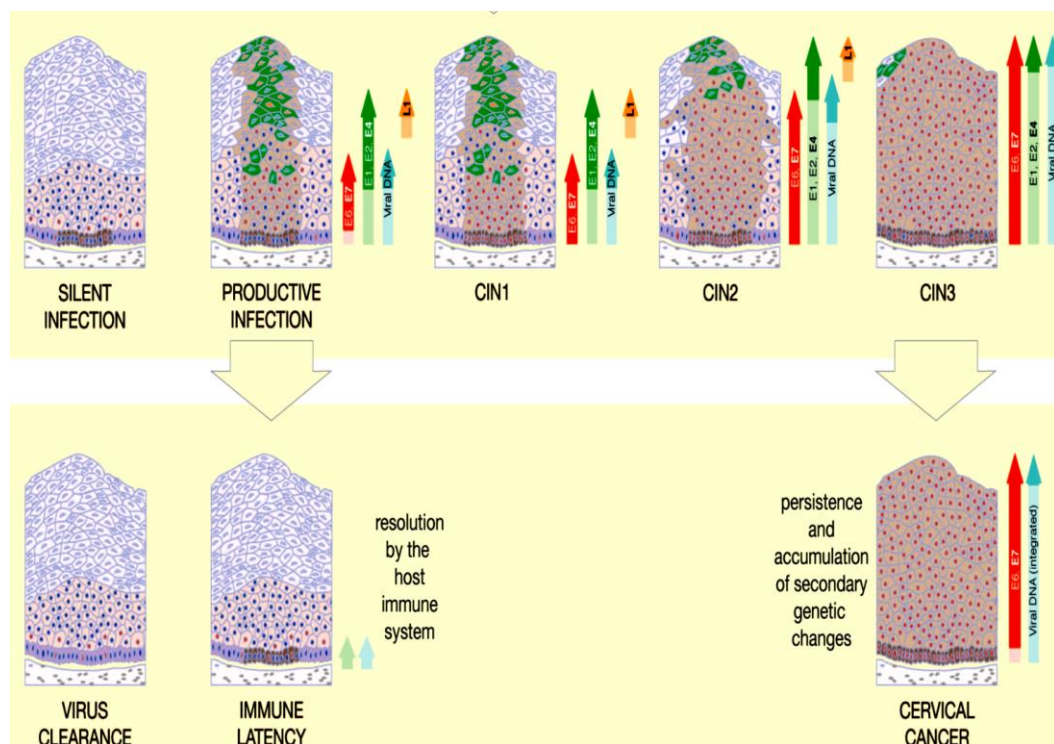


Figura 3 Ciclo de vida infeccioso del virus del HPV. Varios tipos de HPV (por ejemplo los tipos de alto riesgo), en determinados sitios epiteliales, pueden conducir a neoplasias. La neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de diferentes grados puede ocurrir después de la infección de HPV. Si la infección ocurre con un HPV de alto riesgo puede predisponer a la progresión a cáncer en determinados sitios anatómicos (ejemplo: La zona anogenital) (50).

La neoplasia intraepitelial cervical (NIC) es una lesión que puede existir en cualquiera de los siguientes estadios: NIC1, NIC2 o NIC3. Si no son diagnosticadas para ser tratadas a tiempo, la NIC2 o la NIC3 pueden progresar hacia cáncer de cuello uterino (43, 35).

NIC 1.- Las células epiteliales en el tercio inferior están hipercromáticas, mostrando aumento de la actividad mitótica. La maduración de los queratinocitos todavía se ve en los dos tercios superiores del epitelio (9). Existe presencia de coilocitos en la capa granulosa, los cuales pueden ser apreciados en la citología o examen de Papanicolaou. Otra lesión benigna que puede observarse es el condiloma a nivel de la vulva, mucosa de la vagina o cérvix (51).

NIC2.-La proliferación celular basal avanza hasta dos tercios del espesor epitelial. Mitosis anormal están presente hasta el tercio medio del grosor epitelial, mientras que la maduración de los queratinocitos todavía está presente en el tercio superior (Figura 4)(9).

NIC 3 y Carcinoma In Situ.- Las células atípicas se extienden en el tercio superior del epitelio. La poca maduración citoplasmática se puede todavía observar en el tercio superior del epitelio en NIC3. Sin embargo, la no maduración citoplasmática se ve en casos de carcinoma in situ (Figura 4) (9).

Carcinoma invasor.- Cuando se observan grumos irregulares de células escamosas invadiendo el estroma del cuello del útero, decimos que es carcinoma invasivo cervical de células escamosas (SCC). Las células también muestran algunas características atípicas, como la mitosis anormal (Figura 4) (9).

Adenocarcinoma.- En el adenocarcinoma *in situ*, las células glandulares endocervicales se sustituyen por células cilíndricas largas con mayor actividad mitótica (38).

Las citologías deben ser interpretadas, con la finalidad de hacer más homogénea la lectura. Se han propuesto algunos sistemas de clasificación, el

más utilizado en la actualidad es la clasificación de Bethesda, elaborado en el año 2001 "The Bethesda System-2001" (8).

Estudios citopatológicos clasifican las lesiones intraepiteliales escamosas (SIL, siglas en inglés de Squamous Intraepithelial Lesion) en dos grados, basándose en las recomendaciones realizadas en las reuniones de Bethesda del 1988, 1991 y 2001 (Anexo G)(15):

- SIL de bajo grado (LSIL).
- SIL de alto grado (HSIL).

Los estudios histopatológicos, siguiendo la clasificación de la Organización Mundial de la Salud del 2003 clasifican las lesiones como Neoplasia Intraepitelial Cervical el cual es un término ampliamente aceptado que describe una gama de cambios displásicos que ocurren en el epitelio cervical (CIN, siglas en inglés) en tres grados: NIC 1, NIC 2, NIC 3 (11,48).

1.4.1. Regresión de lesión, persistencia y progresión

Las infecciones ocasionadas por HPV pueden eliminarse como resultado de una respuesta inmune mediada por células, y no persistir el tiempo suficiente para la expresión génica desregulada (41).

HPV-16 tiene una media de persistencia que es más largo que la mayoría de los otros tipos de alto riesgo, y esto puede contribuir a su asociación con cáncer (41).

Tabla II Pronóstico de las lesiones NIC no tratadas (48).

	Regresión	Persistencia	Progresión hacia NIC3	Cáncer Invasivo
NIC1	60%	40%	10%	1%
NIC2	40%	40%	20%	5%
NIC3	33%			>12%

La regresión espontánea de NIC1 por infección de HPV se observó en el 60% de los casos, las tasas de regresión espontánea disminuyen después del desarrollo de NIC2 y el porcentaje de cáncer invasivo aumenta con la presencia de NIC3 (Ver tabla II). El desarrollo de cáncer invasivo se establece en un periodo de tiempo requerido de aproximadamente 25 a 40 años (Ilustración 5) (49).

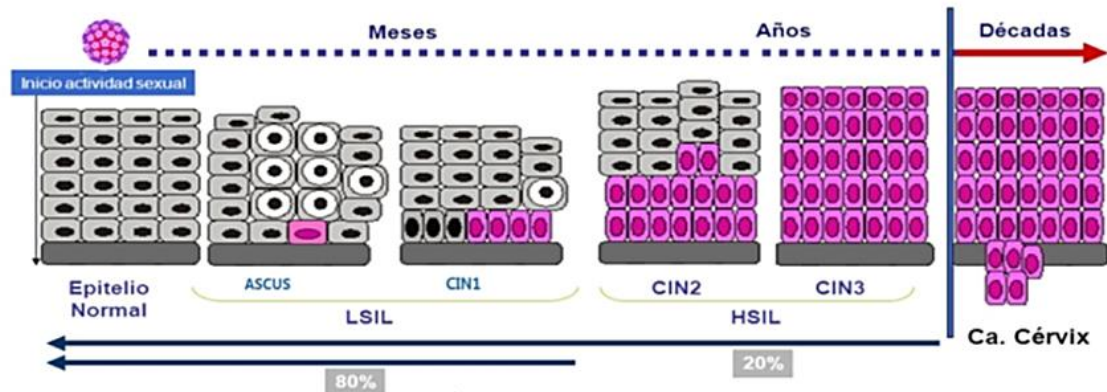


Figura 4 Progresión del epitelio normal a cáncer de cuello uterino (8).

1.5. Epidemiología

La distribución de los genotipos específicos del HPV varía mucho entre grupos poblacionales y se han realizado diferentes encuestas geográficas en distintas regiones a fin de aplicar estrategias de vacunas y prevención adecuadas(8).

La infección por HPV es una causa importante de cáncer de cuello de útero, más del 50% de personas con una vida sexual activa han estado infectadas con al menos un tipo de HPV en su vida, en algunos casos se reciclará la infección de HPV, mientras que en otros la infección progresará a cáncer (53).

Los estudios epidemiológicos en todo el mundo indican que los HPV son agentes necesarios para la aparición de cáncer de cuello uterino, siendo responsable en un 99.7% (23). Cabe mencionar que también está asociados con cánceres en otros sitios, como el de pene en hombres, vagina y vulva en mujeres y, en ambos sexos, la zona anal, las amígdalas, orofaringe y la base de la lengua (41). De todos los virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV) el tipo 16 ha sido considerado como el genotipo más prevalente, siendo el agente de cáncer de cuello uterino, faringe y orofaringe principalmente (20,30). Los HPVs son patógenos que se dirigen a diferentes sitios del cuerpo especialmente el tejido epitelial, ya sean cutáneos o de mucosa (12,38).

La expresión clínica más conocida de la infección viral la constituyen los condilomas acuminados o verrugas genitales, consecuencia de los genotipos de bajo riesgo en su mayoría (8).

Las estimaciones de la prevalencia por región de HPV fueron África 22,1%, América Central y México 20,4%, América del Norte 11,3%, Europa el 8,1%, y Asia 8,0% (23).

1.5.1. Factores de riesgo

A pesar que HPV es un requisito previo para el cáncer, existen otros factores de riesgo que pueden ser considerados como cofactores en lugar de factores independientes (54). La etiología cervical en los pacientes de cáncer de cuello uterino aumenta el riesgo de padecer cáncer de pulmón, esófago, vejiga, riñón y vulvar (52).

La hipótesis de que otro agente microbiológico actúa en el epitelio cervical aumentando el riesgo de adquirir cáncer cervical en presencia de HR-HPV (51).

Varios factores de riesgo se han descrito del cáncer de cuello del útero como el tabaquismo, la inmunosupresión, alto número de parejas sexuales, y también la historia de las lesiones precancerosas y cancerosas de cuello uterino (12 ,30).

Entre los cofactores infecciosos:

- Virus del herpes simple (VHS).- Un virus de los más estudiados como cofactor en cáncer cervical, ya que, de forma similar al HPV se podría asociar al comportamiento sexual. Varios estudios

seroepidemiológicos han hallado asociación moderada entre anticuerpos del VHS tipo 2 y la neoplasia cervical (51).

- *Chlamydia Trachomatis*.- Bacteria que produce comúnmente una infección de transmisión sexual, entre el 85-90% de infecciones por este microorganismo son asintomáticas por lo que no pueden ser diagnosticadas y tratadas de forma temprana. Aunque *Chlamydia Trachomatis* es una infección bacteriana tratable, es una importante causa de infección intracelular. Muchos estudios muestran una asociación entre esta bacteria y neoplasias cervicales de alto grado o cáncer cervical invasivo (51).

- Edad de iniciación de vida sexual.- Debido a la inmadurez cervical, deficiencias de flujo cervical protector, puede conducir a una mayor vulnerabilidad para la adquisición de una infección de HPV en mujeres adolescentes y en adultas jóvenes (55).

- Número de parejas sexuales: Asociación entre número de parejas, puede aumentar la probabilidad de contraer una infección por HPV. El lapso de tiempo entre una pareja sexual y otra es otra característica

influyente, ya que si el período es corto existe mayor riesgo de infectarse (15).

Factores de riesgo no infecciosos:

- Tabaquismo.- El tabaco tiene un efecto carcinogénico y produce alteración de la inmunidad local en el cuello uterino, siendo más proclive a desarrollar la lesión. Si el paciente deja de fumar puede disminuir el riesgo de padecer un cáncer subsiguiente de esta etiología (52). Se han detectado metabolitos del tabaco en el moco cervical de las pacientes luego de haber fumado cigarrillo (13,52).

- Anticonceptivos hormonales.- Los estrógenos y la progesterona han sido relacionados con el desarrollo de lesiones cervicales preinvasivas e invasivas (51). El uso excesivo por un largo período de tiempo, aumenta la expresión de los genes E6 y E7 del HPV. Los estrógenos favorecen el desarrollo de lesiones ya establecidas (55).

- Paridad.- Por muchas décadas, se ha dado énfasis en que el elevado número de hijos puede incrementar el riesgo para desarrollar carcinoma *in situ* o cáncer cérvico uterino, aunque muchos de dichos estudios no controlaron la presencia de HPV en la historia sexual y esto podría causar confusión (51).

Como cofactores virales:

- Genotipo HPV.- Los genotipos 16 y 18 presentan un mayor riesgo de progresión. Y en particular, los genotipos 16,18 y 45 tienen una integración más efectiva al genoma, pudiendo desarrollar de forma más rápida lesiones de alto grado (6).

- Variantes de HPV: Las variantes geográficas se han relacionado con distintos tipos de cánceres, podría estar influido por dos mecanismos tales como la diferencia en su capacidad funcional o evasión del sistema inmunitario huésped (57).

- Carga viral: Se indica que una carga viral elevada indica una mayor probabilidad de integración del ADNv en el genoma del huésped (14,54).

- Coinfección: Si la infección posee más de un tipo viral, aumenta el riesgo de desarrollo a cáncer (59).

1.5.2. Cáncer en Ecuador

En Ecuador se ha realizado el programa de tamizaje que se basa en pruebas citológicas tradicionales (Papanicolaou), estimulando el tratamiento más eficaz en lesiones de alto grado (51).

En la última década, los datos estadísticos a nivel local relacionados a cáncer han sido gracias al registro de tumores que funciona en la Sociedad de Lucha contra el cáncer (SOLCA), conjuntamente con el Ministerio de Salud pública y el Instituto de estadísticas y censos (51). En el año 2009, un caso reportado en el Journal de Patología italiano, evaluó 250 muestras de dos localidades de Ecuador: Quito y Tosagua. En este estudio, reportaron una tasa de infección de HPV de 4,95% a través de la prueba de papanicolaou (60).

Una base epidemiológica respecto al cáncer cérvico uterino *in situ* e invasor se publicó en el 2004 por el registro de tumores que establece diferencias desde al año 1985 hasta el 2002, resultado del programa de citología (51).

Según datos de INEC-Ecuador, respecto al cáncer de cérvix invasor, ha disminuido en el período de 1985-1989 de 14.8 a 9.8 por cada cien mil habitantes. De igual manera en cáncer *in situ*, estando en el período de 1985-1989 en 9.9 a encontrarse en el período de 2000-2002 en 3.5 por cada cien mil habitantes, la tasa estandarizada de mortalidad por cada cien mil habitantes bajo de 10.1 en el período de 1995-1999 a 7.9 en los 2000-2002 (gráfico 1) (51).

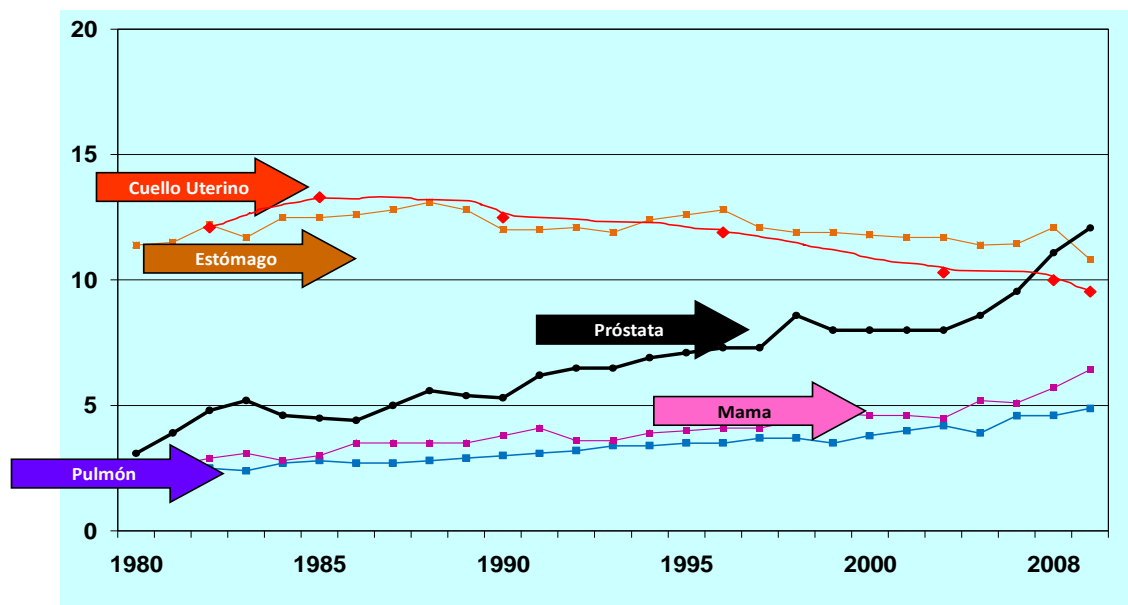


Gráfico 1 Defunciones por cáncer- tasas por 100.000 habitantes, Ecuador 1980-2010 (51).

La publicación y estudios científicos realizados en Ecuador respecto a cáncer cérvico uterino, es limitada. Según datos de SOLCA, en el período de 2005-2009 tenemos que la tasa cruda de cáncer en mujeres de Guayaquil es de 149,22 x 100.000 habitantes.

Cáncer Invasor	19,7 x 100.000
Cáncer <i>In situ</i>	14,3 x 100.000

Solca Ecuador, 2014

Los casos nuevos de cáncer *In situ* de Cérvix en mujeres desde los años 2010 hasta 2013 han ido disminuyendo, según datos estadísticos (Anexo F).

Los casos nuevos de cáncer invasor de cérvix en mujeres desde los años 2010 hasta 2013 han variado en cada período, incrementado o disminuyéndose los casos; dándose la mayor frecuencia en el año 2010 (Anexo F). A nivel de todo el análisis, la mayor frecuencia la encontramos en el rango de edad de 50-54 con 202 casos seguido del rango de 45-49 con 199 casos (Anexo F).

1.6. Métodos de diagnóstico para HPV

1.6.1. Análisis citológicos e histológicos

En los exámenes rutinarios de citología/histología, los resultados alterados son la herramienta inicial hacia la detección de HPV o cáncer de

cuello uterino. La prueba de diagnóstico primero debe ser citológico-histológica para luego hacer el diagnóstico molecular (13,52).

Papanicolaou.- El uso de la prueba de Papanicolaou (Pap) para el cáncer cervical ha disminuido significativamente la incidencia de cáncer cervical y su mortalidad asociada en los últimos años. Sin embargo, la prueba de Papanicolaou tiene una baja sensibilidad (70%) para la detección de alto grado de lesión intraepitelial escamosa (LSIL), que ha planteado una serie de cuestiones en relación con la necesidad de métodos adicionales para mejorar la detección. Por lo tanto, se recomienda para la detección del virus del papiloma humano (HPV) en combinación con la prueba de Papanicolaou, para mejorar la detección de lesiones precancerosas de cuello uterino (61).

Para la prevención y la detección temprana de cáncer de cuello uterino, es importante no sólo detectar cambios intraepiteliales cervicales, sino también identificar la presencia de HR-HPV y su tipo. Si los resultados de la prueba de HPV de HR son positivos, la posibilidad de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) puede ser pronosticada incluso si no hay cambios citológicos en el cuello uterino (62).

Colposcopia.- Técnica creada y desarrollada por Hans Hinselman (8)
.Esta técnica se basa en la observación del tracto genital mediante un microscopio binocular. El motivo más común para solicitar una colposcopia es la citología cervical anormal, generalmente descubierta como resultado de un estudio de tamizaje (63). Puede identificar la extensión de lesiones, localizar áreas sospechosas y planificar un posible tratamiento, sin embargo es poco específica, ya que no siempre las colposcopias anormales son el resultado de una lesión cervical (8).

Prueba histológica

Biopsia.- Mezclando los resultados de la colposcopia con los de una biopsia dirigida, se optimiza el diagnóstico de neoplasias intraepiteliales y la posible presencia de adenocarcinomas (8,59).

Estudio de endocervix.- Se realiza mediante un cepillo endocervical para la realización de frotis citológico (8,47).

Conización.- Funciona como prueba de diagnóstico y como medida terapéutica en ciertos casos (8).

1.6.2. Análisis molecular de HPV.

- **Reacción en cadena Polimerasa (PCR).**- Se basa en el mecanismo de replicación del ADN. Este ADN bicatenario, pasa a ser monocatenario, se duplica y vuelve a enrollarse (64).

Esta técnica combina la especificidad de la unión de los dos primers y la sensibilidad que resulta del proceso de amplificación, identificando el virus de interés(15).

- **Captura híbrida (HC2).**- se utilizan sondas de ARN marcadas que tienen la capacidad de hibridar con el ADNv con amplificación de la señal que utiliza la detección quimioluminiscente de microplacas. La más usada en el mercado es el test Hybrid Capture 2, que permite detectar 5 tipos de LR-HPV (6,11,42,43,44) y 13 tipos HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Diseñado como método de detección de la enfermedad cervical, se recomienda que vaya de la mano con la historia médica del paciente (65).

Es una prueba de ADN de HPV con la tecnología Hybrid Capture 2 (La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia de ADN diana en la muestra (66)).

- **Anyplex II 28 HPV.-** Tecnología patentada por Seegene que hace posible la detección de múltiples patógenos en un solo canal de fluorescencia en una qPCR. Permite la amplificación, detección y diferenciación simultánea de los ácidos nucleicos diana de diversos HPVs, 19 de alto riesgo (16,18,26,31,33,35,39,45,51, 52,53, 56, 58, 59, 66,68, 69, 73, 82) y 9 de bajo riesgo (6,11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) y sus controles internos respectivos (67). La detección de Anyplex II 28 HPV utiliza el gen de β -globina como control interno endógeno que garantiza la purificación de ADN, verificación de la reacción de PCR. Se emplea el sistema uracil-DNA glicosilasa (UDG), el cual es prevenir la mutagénesis mediante la eliminación de uracilo a partir de moléculas de ADN mediante la escisión de base. Por lo tanto, los sistemas UDG se utilizan para controlar la contaminación cruzada de las muestras (67).

En la siguiente figura, se presentan distintas formas para la detección de HPV.

Prueba	Analítica		Clinica
	Sensibilidad/especificidad	Sensibilidad/especificidad para NIC 3 y cáncer cervicouterino	
Basado en morfología celular	Papanicolaou	No aplica	Baja/alta
	Colposcopia	No aplica	Moderada/baja
	Inspección visual	No aplica	Baja/baja
Detección de proteínas de VPH	Immuncito/histo química	Baja/alta	Baja/baja
	Microscopía electrónica	Baja/alta	Baja/baja
	Western blot	Baja/alta	Baja/moderada
<i>Detección del genoma del VPH</i>			
Métodos directos	Southern blot	Moderada/alta	Moderada/alta
	ISH	Moderada/moderada	Moderada/moderada
	Dot blot	Baja/alta	Baja/alta
Amplificación de la señal	HC	Alta/alta	Alta/alta
Amplificación del blanco	PCR	Alta/alta	Muy alta-alta/alta-moderada
	qPCR	Muy alta/alta	Muy alta
Detección de anticuerpos anti-VPH	Péptidos ELISA	Baja/baja	Baja/baja
	VLP	Moderada/alta	Baja/baja
	E6/E7 fusionados	Alta/moderada	Baja-moderada/alta

Figura 5 Características de distintas pruebas para la detección de HPV (38).

Capítulo 2:

Materiales y Métodos

2.1. Población de estudio:

El presente estudio se encuentra dentro del Proyecto Senescyt PIC-12-INH-001«Epidemiología Molecular del Virus del Papiloma Humano para la prevención del Cáncer Cérvico Uterino en mujeres de la Región Litoral del Ecuador»»

2.1.1. Tipo de estudio:

El presente estudio es de tipo transversal, observacional y prospectivo.

2.2. Criterios de inclusión

Dicho proyecto cuenta con criterios de inclusión, los cuales son:

- Mujeres.
- Edad de 30 años en adelante.
- Habiten en el litoral ecuatoriano, en caso de extranjeras, que la residencia sea mínimo de 5 años en el lugar de estudio.
- Pacientes con diagnósticos citológicos de Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASCUS) con el reporte de sus resultados.
- Pacientes con lesiones citológicas de alto grado (H-SIL) con el reporte de su respectivo resultado.

2.3. Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión, también rigen ciertos parámetros, los cuales son:

- Muestras que tengan infección bacteriana o Micótica.
- La muestra tomada en ciclo menstrual.
- Muestras con presencia de tratamiento de óvulos o tinciones.
- Muestra de pacientes con abstinencia sexual menor de 48 horas.

Para el presente trabajo, se analizó las pacientes de la ciudad de Guayaquil-Ecuador.

2.4. Muestras clínicas:

La paciente debe llenar una ficha de registro donde detallará su historia clínica (Anexo B) y un consentimiento informado donde se explica el propósito del proyecto y las condiciones del mismo (Anexo C). A partir de los resultados respectivos, ya sea Papanicolaou o Biopsia con citología alterada/inflamatoria se realiza el cepillado uterino por parte del Médico y/o profesional encargado.

Estableciéndose los criterios del estudio, las muestras se recolectarán se transportarán mediante la tecnología Cobas PCR Cell Collection Media (Anexo E). La recolección de muestras clínicas fue aprobada por el comité de Bioética Institucional del Hospital del Niño “Dr. Francisco de Ycaza Bustamante” (Anexo D), Los centros médicos que colaboraron con la toma de muestra son: Sociedad de Lucha contra el Cáncer del Ecuador SOLCA, Hospital Gineco-Obstétrico Enrique C. Sotomayor, Hospital de Infectología Dr. José Rodríguez Maridueña. La clasificación de la citología se evaluó utilizando los criterios establecidos en las directrices del Sistema Bethesda 2001 (Anexo G).

2.5. Factores a analizarse

En la ficha de datos se registraron factores clínicos como: Historia anticonceptiva, historia obstétrica, historia ginecológica, antecedentes de prueba citológica alterada, antecedentes de cirugía cervical y hábitos tóxicos.

2.6. Factores socio demográficos

De igual forma, se procede a registrar los factores socio demográficos del paciente como: la edad, lugar de donde procede, lugar de la toma de muestra, grado de escolaridad avanzado hasta la actualidad, situación laboral y estado civil.

2.7. Análisis de factores

De los factores registrados en el presente estudio, se analizó los factores sociodemográficos de los pacientes, hallando los posibles factores de riesgo para la infección de HPV.

Los resultados de Papanicolaou de cada paciente, son analizados por la clasificación de Bethesda 2001 y la del MSP del Ecuador, para luego realizar la correlación de la lesión cervical con el/los genotipo(s) encontrados.

2.8. Extracción de ADN:

A partir de las muestras recolectadas, se realizó la extracción de ADN mediante el kit QiAmp DNA Mini and Blood Mini Handbook , de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Anexo H). Finalizada la extracción, se procedió a cuantificar el ADN de la muestra mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y llevarlas a una concentración estándar entre 100 ng/ml aproximadamente.

2.9. Detección HPV:

La presencia de ADN genómico humano se verificó mediante amplificación de un fragmento de 110 bp del gen de la β -globina mediante el uso de cebadores PC03-PC04 (Anexo I).

Detección de ADN de HPV, se realizó mediante PCR convencional utilizando primers universales para la detección de HPV: MY11/09 (Anexo J) (68), que amplifican un fragmento de 450 bp de la región conservada L1 de HPV. Se realizó la detección del producto de PCR por electroforesis en gel de Agarosa al 2.5%.

2.10. Tipificación del virus y detección de infecciones múltiples

Con una previa evaluación con primers generales para HPV, realizamos la prueba para detectar las infecciones múltiples existentes mediante el sistema Anyplex II HPV28 (67) que es un ensayo *in vitro* cualitativo para la detección de 14 tipos de HPV de alto riesgo y 9 tipos de HPV de bajo riesgo. Consiste en dos reacciones de PCR:

Set A.- Una múltiple prueba que permite la amplificación simultánea del target de ADN de 14 HPV de alto riesgo.

Set B.- Es una prueba múltiple que permite la amplificación simultánea del target de ADN de 5 HPV de alto riesgo y 9 HPV de bajo riesgo.

La reacción se la realiza según indicaciones del fabricante en un volumen final de 20µl (Anexo K). Se utiliza una sonda primaria específica para un tipo de HPV que lleva un 5'(lanzador) para la extensión y una segunda sonda artificial con fluorescencia específica marcada para cada lanzador, para un tipo dado de HPV dado el receptor es activado por la extensión del oligonucleótido 5' complementaria al 3' del receptor emparejado, uniéndose por síntesis de la ADN polimerasa y la conversión del receptor de cadena sencilla a doble cadena con la simultánea liberación del quenching y la emisión de fluorescencia. Cada receptor, y su correspondiente HPV, se pueden distinguir de los otros que comparten el mismo fluoróforo por fusión de análisis de la curva en 3 pasos específicos durante la PCR en tiempo real (14).

El conocimiento de la etapa en la que la curva de fusión se convierte en positivo nos permite semi cuantificar la carga viral, desde baja (positiva después de 40 ciclos de PCR), a intermedio (positiva dentro de 31 a 39 ciclos), a alto (positivo antes de 31 ciclos). La grabación de datos y la interpretación se automatizaron con el software de visualización Seegene de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.11. Análisis de datos

Todos los datos recolectados en la ficha fueron ingresados en una base de datos, colocando las variables y los resultados de todos los análisis realizados. Los nombres de los pacientes fueron protegidos con un código establecido por el proyecto de acuerdo al sitio de procedencia de la muestras. Las pruebas realizadas fueron evaluados por Softwares Epidat 3.1 y EpiInfo 3.5.4, para el respectivo análisis epidemiológico, usando regresión logarítmica con el estadístico X^2 y p-value y analizando factores de riesgo para los factores sociodemográficos (OR).

Capítulo 3:

Resultados

3.1. Matriz sociodemográfica del estudio

La población de estudio fue de 145 muestras, 107 resultaron positivas para HPV y 38 negativas con PCR universal, usando primers MY11/09. A continuación, la matriz basada en factores sociodemográficos del estudio

Tabla III Matriz de comportamientos sociodemográficos de la población de estudio, mostrándose los rangos de edades, centro de atención médica, estado civil, escolaridad, y situación laboral.

Rango de Edades	Número de muestras
30-39	60
40-49	32
50-59	18
60-69	21
70 en adelante	14
Centros de atención médica	
Solca Guayaquil	110
Hospital de Infectología	19
Maternidad Enrique Sotomayor	16
Estado Civil	
Soltera	44
Casada	49
Divorciada	9
Viuda	7
Unión Libre	36
Escolaridad	
Elemental	19
Primaria	57
Secundaria	58
Pre Tecnológico	3
Universitario	8
Situación Laboral	
Ama de casa	122
Estudiante	4
Obrera	11
Profesional	5
Comerciante o Informal	3

Utilizando los programas Epidat 3.1 y EpiInfo 3.5.4, la prueba de regresión logarítmica con el estadístico X^2 , para factores de la matriz sociodemográfica se calculó los valores de O.R. y p-value con intervalo de confianza de 95%, obteniendo los siguientes resultados:

- Rango de edades.- el valor de O.R. fue 0.9945 y p fue 0.6821 siendo no significativos.
- Estado civil.- el valor de O.R. fue 0.9891 y valor p fue 0.3607 siendo no significativos.
- Escolaridad.- el valor de O.R. fue 0.9825 y valor de p fue 0.3751 siendo no significativos.
- Situación laboral.- el valor de O.R. fue 0.9699 y el valor de p fue 0.1036 siendo no significativos.

3.2. Detección de HPV mediante primers MY11/09 en distintos rangos de edad.

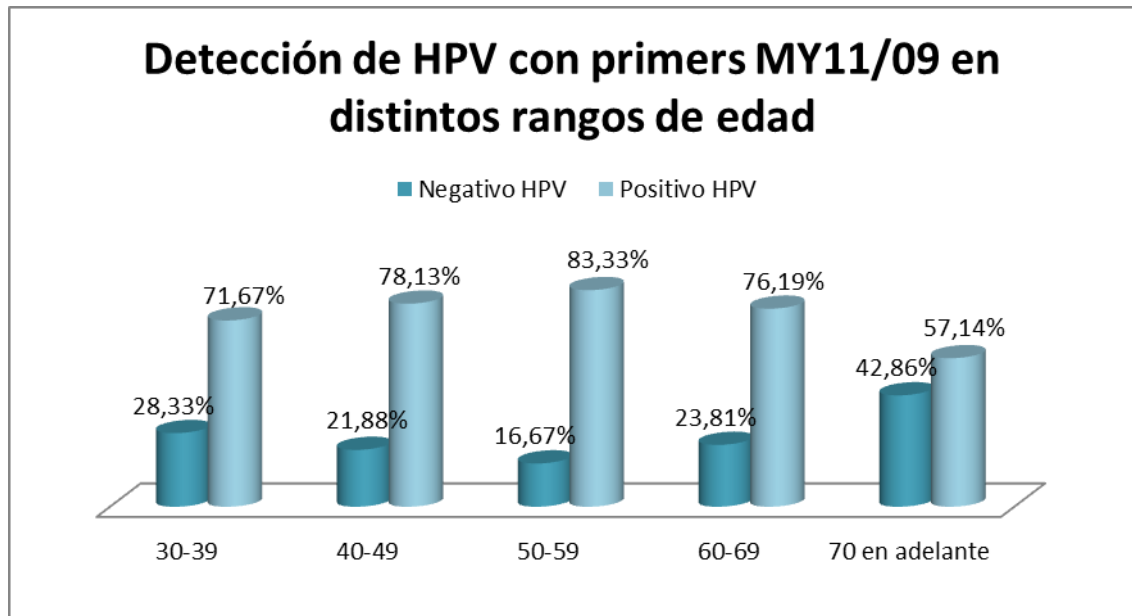


Gráfico 2 Detección de HPV en rangos de edades establecidos. En el rango de 50-59 años de edad, la frecuencia de HPV positivo fue del 83.333%, siendo la más alta en esta población.

3.3. Detección de HPV con primers MY11/09 según la lesión cervical de la paciente.

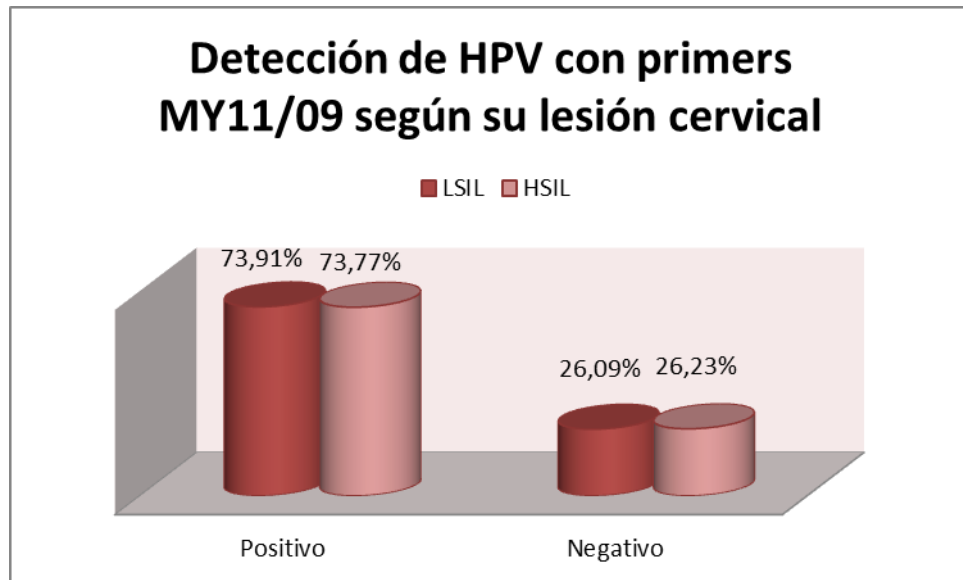


Gráfico 3 Frecuencia de HPV con primers MY11/09 según la lesión cervical previa. Para las muestras con LSIL, el porcentaje de positivos fue de 73.91%, y para HSIL fue de 73.77%. A partir de los positivos para HPV con ambas lesiones cervicales, se procede a realizar el análisis con la tecnología Anyplex II 28.

3.4. Detección de mono infección e infecciones múltiples con la tecnología Anyplex II HPV 28, Seegene

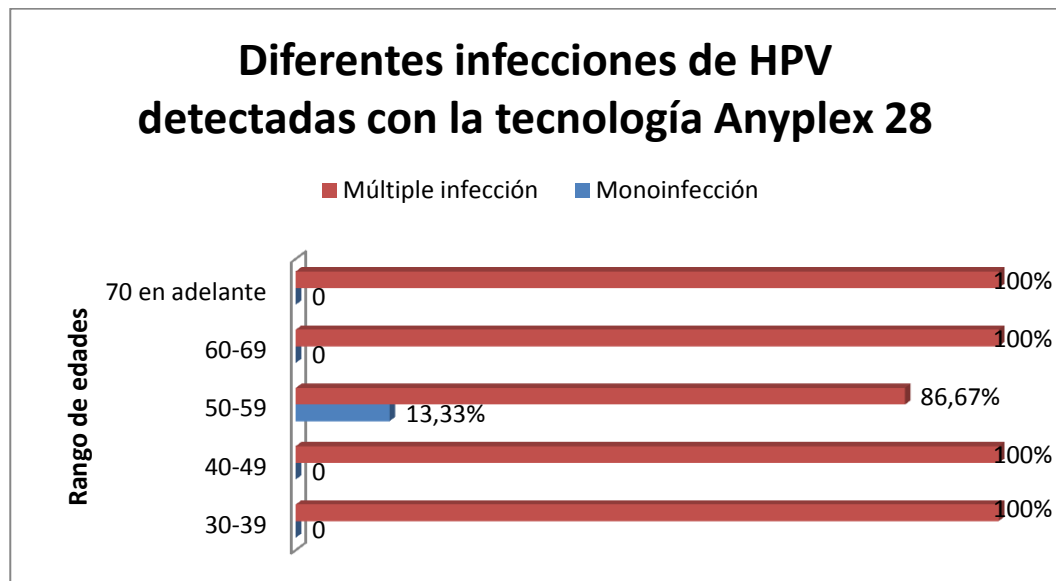


Gráfico 4 Análisis realizado por la tecnología Anyplex II 28, tan sólo el 13.33% de pacientes en el rango de 50-59 años de edad tuvieron una mono infección, en la mayoría de los rangos de edad, las infecciones múltiples fueron del 100%

3.5. Frecuencia de los genotipos detectados por la tecnología Anyplex II 28 HPV, Seegene

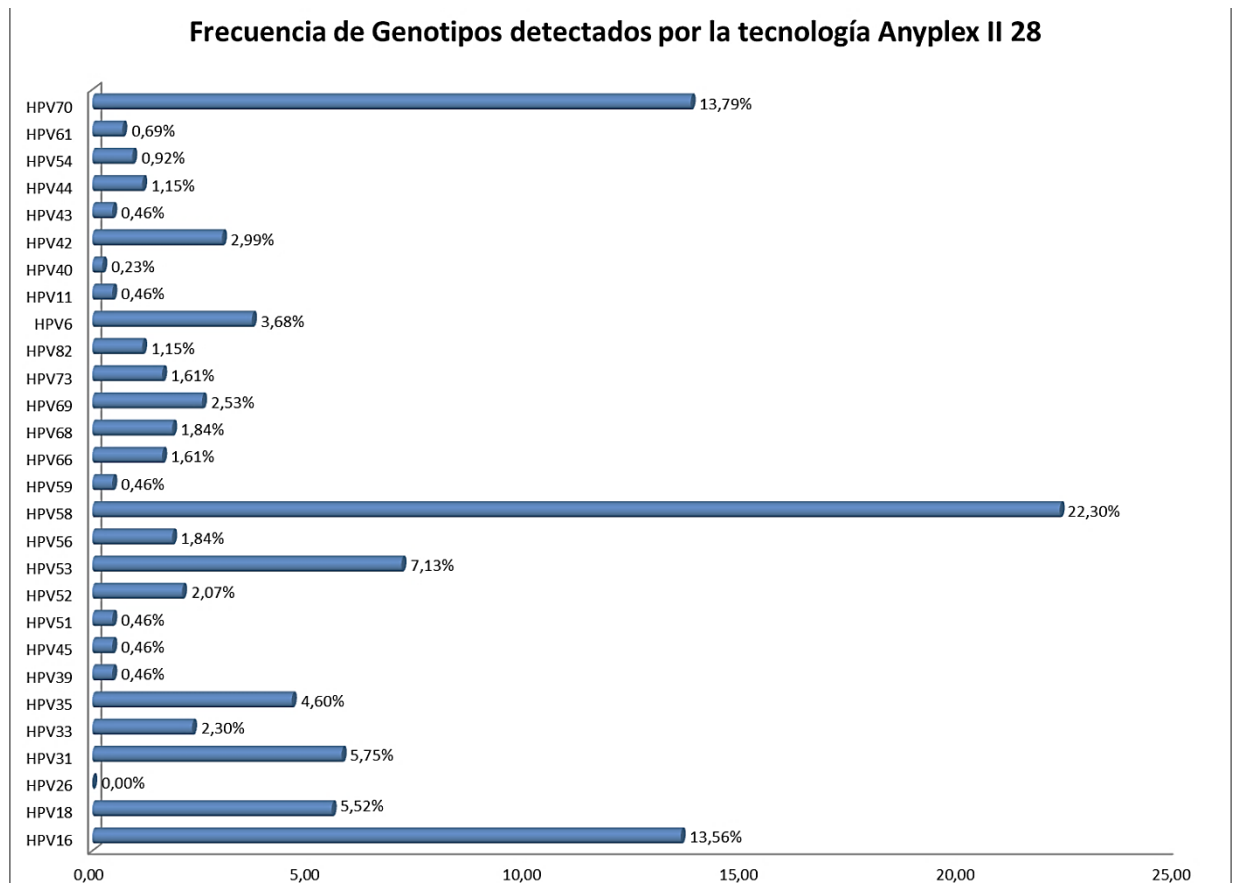


Gráfico 5 Número de casos de cada uno de los genotipos detectados por la tecnología Anyplex II 28. La mayor frecuencia fue HPV 58, luego HPV 70 y HPV 16.

De los resultados presentados, en el caso de las infecciones múltiples, la misma muestra podía dar más de un genotipo. Por lo tanto, las frecuencias

son el porcentaje correspondiente al número de veces que aparece un genotipo determinado en mi población de estudio. De los 28 genotipos que detecta la tecnología Anyplex II HPV 28, el Genotipo 58 fue el de mayor frecuencia. Con esta revisión general, podremos asociar la presencia de cada genotipo encontrado con la lesión citológica que presentaba.

3.6. Frecuencias de genotipos encontrados según la lesión cervical previa de cada paciente

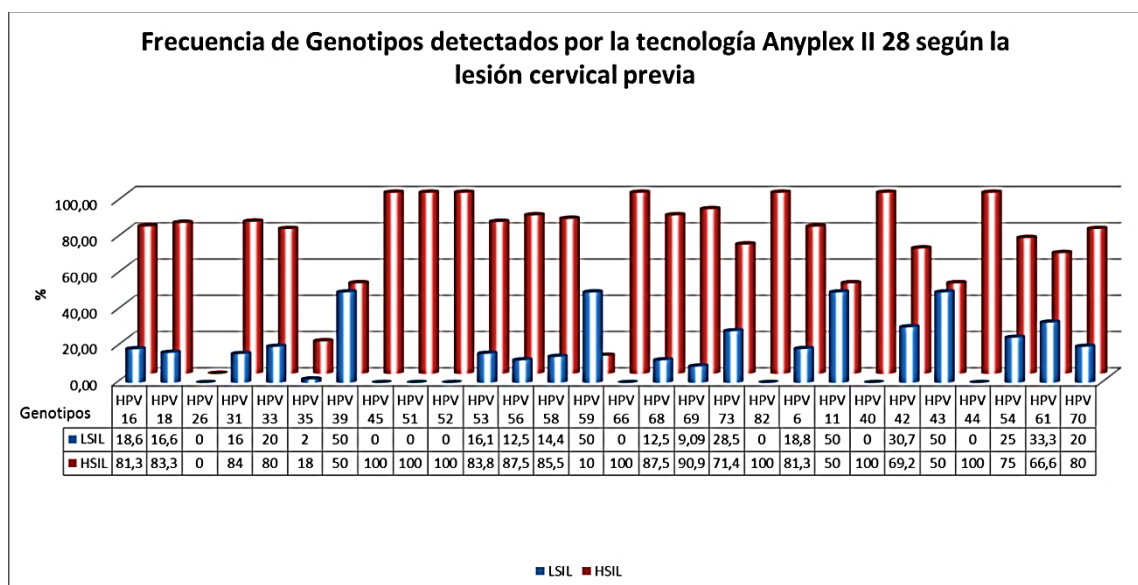


Gráfico 6 Barra de frecuencias de lesiones de bajo grado (LSIL) y de alto grado (HSIL), por cada uno de los genotipos detectables para la tecnología Anyplex 28. Las lesiones de alto grado fueron las prevalentes en la mayoría de casos.

3.7. p-value

Realizando la prueba t de dos colas, dando un valor de $p= 0,001$. Indicando estadísticamente que al tener una lesión cervical de alto grado (HSIL) la probabilidad de tener un HPV de alto riesgo HR-HPV es mayor.

Capítulo 4:

Discusión

En el presente trabajo se estudió la epidemiología molecular de HPV en mujeres de la ciudad de Guayaquil. Las relaciones estadísticas para los factores rango de edad (OR: 0.9945; p: 0.6821), estado civil (OR: 0.9891; p: 0.3637), escolaridad (OR: 0.9699; p: 0.3751) y situación laboral (OR: 0.9699; p: 0.1036) de la matriz sociodemográfica fueron no significativas estadísticamente. En el presente estudio un gran número de pacientes

presentaron una escolaridad de primaria y secundaria. Respecto a la situación laboral, gran parte del estudio lo comprendían amas de casa, aunque, estos factores fueron no significativos. Respecto a los cofactores virales, muchos datos no fueron llenados en la ficha de registro por lo que no se pudo generar un análisis para esos factores.

Varios factores han sido relacionados con infección HPV y lesiones cervicales. Según Soto et al, cofactores como el nivel educativo, ingesta excesiva de alcohol, tabaquismo, resultado de citología anormal, fueron predictores para el desarrollo de las infecciones por HPV, siendo conductas investigadas tales como asociación de infección por HPV y su progresión a cáncer cérvico. De dicho estudio, el 90.5% de las mujeres fueron positivas, y de lo cual el 94.3% tiene HR-HPV (28,32). Un estudio en Ecuador reportó que en Ecuador las mujeres con menor escolaridad y baja posición socioeconómica tienen menos posibilidades de control médico y de realizarse la prueba de Papanicolaou (60).

En el presente estudio se obtuvo 73.90% de positivos y 26.20% de negativos para HPV. De los positivos para HPV, el 73.91% presentaba LSIL, y el 73.77% presentaba HSIL. Varios países de América del Sur han propuesto estandarizar programas nacionales de detección y de cribado para

HPV (30,68). Un estudio reportó el 80.5% de positivo para HPV (70). Se ha reportado que la prevalencia de HR-HPV aumenta según la lesión cervical. Las pacientes asintomáticas tan sólo presentaron el 4% de HR-HPV, mientras que las pacientes que presentaban ASCUS/LSIL/HSIL, fueron entre el 60-90% de HR-HPV (48). Estudios realizados en Ecuador, reportaron que el 97% de la población estudiada (Costa-Sierra y Oriente) fue positiva para HPV, mientras que el 3% fue negativo (71).

La tecnología de Anyplex II HPV 28 fue realizada a partir del resultado de lesión cervical y PCR universal con primers MY11/09. Estudios garantizan lo eficiente que es la tecnología Anyplex II HPV 28 para estudios epidemiológicos utilizando muestras cervicales frescas, pero no se aconseja basar un estudio sólo con esta tecnología, es necesario que tenga un ensayo clínico previo como Papanicolaou o colposcopia (67). El genotipo más frecuente que este estudio detectó con la tecnología Anyplex II HPV 28, fue HPV 58, con una frecuencia de 22.30% en la población de estudio. De este porcentaje, el 85.5% de casos tuvieron una HSIL y el 14.4% una LSIL. Los siguientes genotipos más frecuentes fueron el HPV 70 con un 13.79% de frecuencia, teniendo un 20% con LSIL y un 80% con HSIL y el HPV 16, con un 13.56%, con el 18.6% de LSIL y el 81.3% de HSIL. Resultados de un estudio previo nos indica que el 42% de su población fueron infecciones múltiples, las cuales sino se hubiese aplicado el ensayo, igual hubiesen sido

positivas para HPV (67). En presencia de cáncer cérvico la prevalencia combinada de HPV16 y 18 es del 67.7% según un reciente estudio africano (59).

Un meta análisis sobre la prevalencia del HPV en lesiones cervicales en América Latina y el Caribe demostró que el 46,5% de los casos de HSIL tuvo HPV-16 y el 8,9% de los casos de LSIL tuvo HPV-18(72). Para este trabajo, el 85,57% de HSIL tuvo HPV 58, el 18.64% fue HPV 16, observando que a nivel de Latinoamérica el HPV 58 no ha sido reportado entre los más frecuentes.

Según García et al. (2012), reporta que HPV16 fue el más frecuente (35.3%) aumentando su presencia según aumentaba el grado de lesión. HPV 31 fue el segundo más frecuente y como tercero más frecuente HPV 58 (34). Explica la alta frecuencia del genotipo 58 por el número de inmigrantes de América latina que ha llegado en la última década, poniendo énfasis que el cáncer cérvico es un problema importante para la salud pública (60). Según Azuma, en un estudio realizado en Japón los tres principales tipos más frecuentes fueron el HPV 16 (24,1%), el HPV 52 (17,5%) y el HPV 58 (10,7%) (73).

Respecto a las infecciones múltiples encontradas en nuestro estudio, en una misma muestra se pudo detectar hasta 8 genotipos diferentes. De todas las posibles combinaciones dentro de las infecciones múltiples, se encontró una frecuencia de 9.35% de HPVs 58-16-70, del grupo de positivos para HPV. Un estudio realizado en Egipto, documenta que en general 37,0% de pacientes HPV positivas fueron coinfectados con más de un tipo de HPV. Cuatro de cada nueve pacientes HPV-16 positivas (44,4%) fueron coinfectadas con otros tipos de HPV y una de cada tres mujeres HPV-18 positivas (33,3%) fue coinfectadas con otros HR-HPV (70). Datos publicados indican que múltiples tipos de LR-HPV en una sola infección no aumenta el riesgo hacia una HSIL. Mientras que aquellas pacientes infectadas con 2 o más tipos de HR-HPV tenían un mayor riesgo de LSIL (7). Un estudio realizado por British Columbia, reporta que mujeres mayores de 30 años presentan en un 6.1% HR-HPV a partir de muestras de citología previa (74).

Investigaciones de SOLCA en el año 2005, destaca la presencia de HPV 18 ya sea solo o asociado a otro genotipo de HPV (75). El HPV 66 también fue bastante frecuente a pesar de no ser HR-HPV y el genotipo HPV 16 ocupó el tercer lugar entre los casos que dieron positivos(75). En el año 2009, hubo un estudio reportado donde se valoraron muestras de Quito y Tosagua, encontramos una tasa de infección de HPV de 4,95% en las mujeres que buscan una prueba de Papanicolaou. La prevalencia es algo

más baja que los reportadas en otros países de América Latina, como México (14%), Chile (14%) 14, Colombia (16,8%) y Argentina (15,5%). La prevalencia encontrada en este estudio fue parecida a los datos en Bolivia (5,2%) y, México (4,8%).

HPV 16 y HPV 18 han sido por muchos años los HR-HPV reportados a nivel mundial como los de mayor prevalencia en cáncer cervical. En los resultados de este trabajo, tenemos el HPV 58 como el de mayor frecuencia y la asociación de 3 tipos de HPV, que son: 16-58-70, dos reportados como HR-HPV y el HPV 70 a pesar de ser LR-HPV fue el segundo más frecuente en este estudio y se encuentra asociado a HR-HPVs.

Capítulo 5:

Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- El estudio realizado fue de tipo transversal y observacional respecto a la epidemiología molecular de HPV en mujeres en la ciudad de Guayaquil que presentaban una lesión cervical.

- Los métodos citológicos como Papanicolaou y colposcopia son importantes para detectar a tiempo la alteración de las células en el cuello uterino, pero la genotipificación de HPV es esencial en la epidemiología, en el triaje y el monitorio de pacientes a largo plazo.

- Por mucho tiempo, la PCR universal y Captura Híbrida han sido métodos para la detección molecular de HPV. El kit Anyplex II HPV 28 es un ensayo preciso y capaz de detectar múltiples infecciones, siendo su implementación efectiva para la detección temprana de HR-HPV.

- Los resultados de infecciones múltiples con su respectiva lesión cervical servirán para la elaboración de bases de datos actualizadas a nivel de provincia y de país.

- HPV 16 y HPV 18 han sido por muchos años los HR-HPV reportados a nivel mundial como los de mayor prevalencia a cáncer cervical. En los resultados de este trabajo, tenemos el HPV 58 como el de mayor

frecuencia y la asociación de 3 tipos de HPV, que son: 16-58-70, dos reportados como HR-HPV y el HPV 70 a pesar de ser de bajo riesgo oncogénico fue el segundo más frecuente en este estudio y se encuentra asociado a genotipos de alto riesgo oncogénico.

5.2. Recomendaciones:

- Los resultados negativos por PCR universal con primers MY11/09 debe ser evaluados con una técnica más sensible como PCR cuantitativa basada en Sybr Green. Ya que la técnica basada en Sybr Green es mucho más sensible que la técnica basada en PCR universal.

- Un proyecto factible a realizarse sería con pacientes que no presenten lesiones cervicales, ya que a nivel mundial hay reportadas investigaciones con pacientes asintomáticas que tienen infección de HR-HPV.

- El presente estudio fue realizado con pacientes mayores a 30 años. Una opción a futuro sería realizar el estudio con mujeres menores de

30 años, ya que en dicha población de estudio existe una alta prevalencia de HPV.

Capítulo 6:

ANEXOS

Anexo A

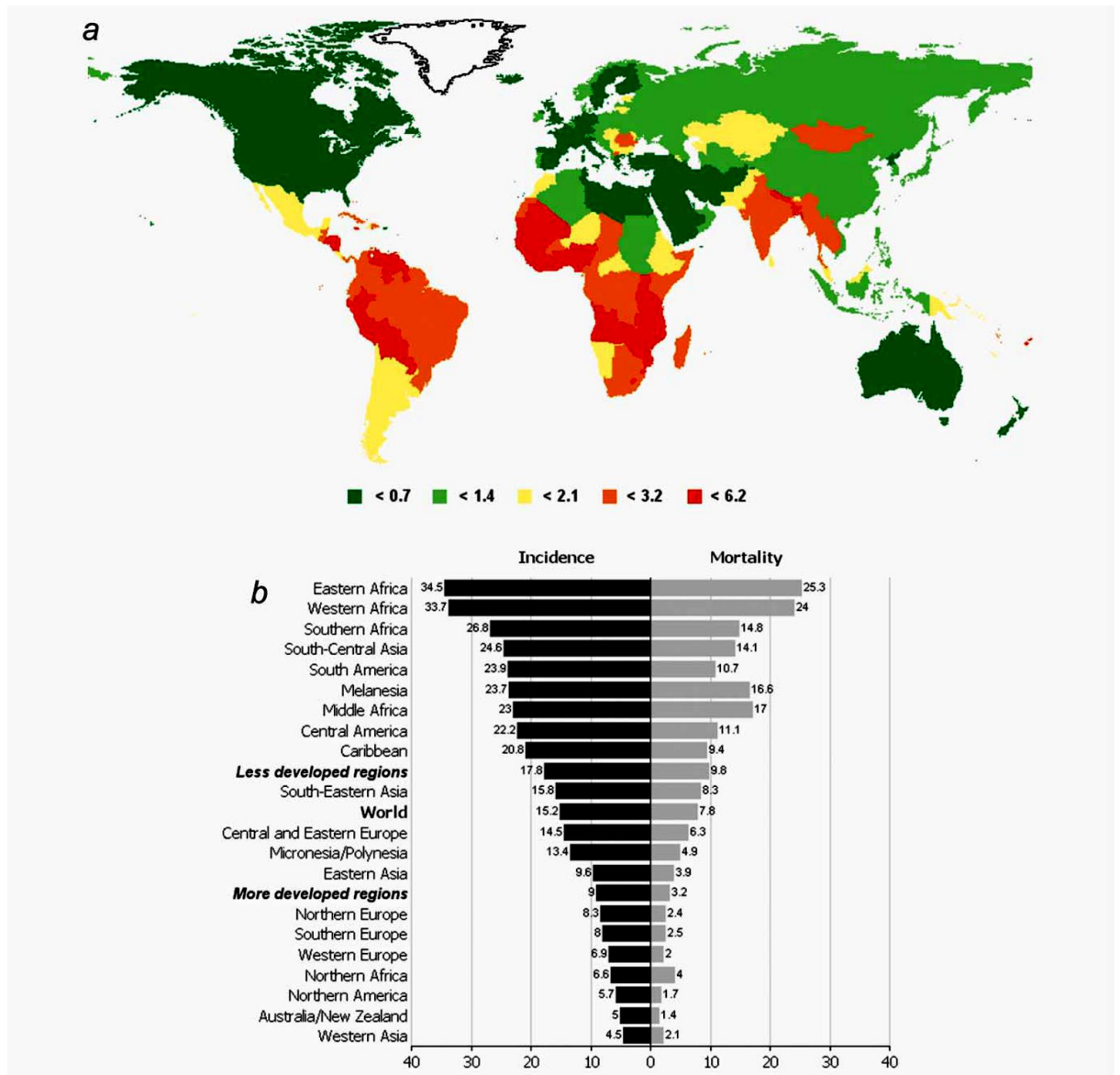


Ilustración 1 (a) Riesgo estimado de incidencia acumulado (0-74) %: el cáncer de cuello uterino. (b) Las tasas estimadas estandarizadas por edad de incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino (76).

Anexo B

Ficha clínica para la matriz de estudio de HPV.

Ficha de paciente para la investigación de Papiloma Virus Humano

Fecha de toma de muestra _____
 Tipo de Muestra _____
 Muestra tomada por _____
 Procedencia _____

I- DATOS PERSONALES.

Nombre y Apellidos: _____
 Fecha de nacimiento: _____ Edad: _____ Número de HC: _____
 Cl: _____ Dirección: _____ Teléfono: _____
 Centro de Trabajo: _____

II-ULTIMO GRADO DE ESCOLARIDAD ALCANZADO.

Elemental ___ Primario ___ Secundaria ___ Pre o tecnológico ___ Universitario ___

III-SITUACION LABORAL.

Ama de casa ___ Estudiante ___ Obrera ___ Técnica ___ Profesional ___ privado o informal ___

IV-ESTADO CIVIL.

Soltera ___ Casada ___ Viuda ___ Divorciada ___

V-HISTORIA ANTICONCEPTIVA.

a: (actual)

DIU ___ Progesten +Estradiol ___ P/C ___ biorritmo ___ Tiempo de uso _____

b: (anterior a la actual)

DIU ___ P+E ___ P ___ biorritmo ___ Tiempo de uso _____

Usa protección al tener relaciones sexuales SI ___ NO ___

VI-HISTORIA OBSTÉTRICA.

Edad de la primera menstruación _____
 Última menstruación (fecha) _____
 Trastornos Menstruales ___ Metrorragia ___ Leucorrea ___
 Menopausia ___ Espontánea ___ Total ___
 Quirúrgica ___ Parcial ___

Edad de inicio de las primeras relaciones sexuales _____
 Embarazos ___ Primer parto ___ Total ___ Abortos Espontáneos ___
 Normales ___ Provocados ___
 Patológicos ___

Número de parejas en los últimos dos años _____

VII-HISTORIA GINECOLÓGICA.

a) Antecedentes de enfermedades ginecológicas de naturaleza infecciosa:

Condiloma ___ Gonorrea ___ Monilias ___ Sífilis ___ Trichomonas ___ Herpes Genital ___
 Herpes Oral ___

Otras _____

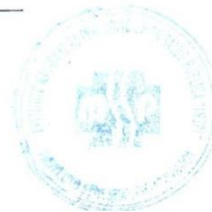
b) Antecedentes de prueba citológica alterada: Si ___ No ___

c) Antecedentes de cirugía cervical: Si ___ No ___

VIII-HABITOS TÓXICOS (en los últimos 10 años): a) Cigarro ___ b) Alcohol ___
 c) Otros _____

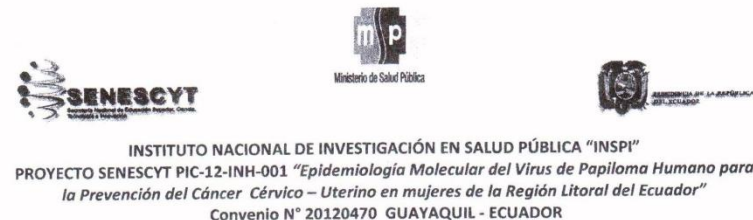
IX-RESULTADOS:

Prueba citológica _____
 Colposcopia _____
 Biopsia _____
 PVH/PCR _____



Anexo C

Consentimiento informado del proyecto HPV



CONSENTIMIENTO INFORMADO
Para Investigación del Virus del Papiloma Humano

Se me ha solicitado participar en un proyecto de investigación que estudia la EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) PARA LA PREVENCIÓN DEL CÁNCER DE CERVICO-UTERINO EN MUJERES MAYORES DE 30 AÑOS DE LA REGIÓN COSTA DEL ECUADOR facilitando una muestra citológica que previo a un test de Papanicolaou, presente por lo menos células atípicas para ser incluida en la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH). Los Papillomavirus Humanos están asociados con alteraciones en células del cuello del útero y puede provocar cáncer cérvicouterino. Los resultados obtenidos con las técnicas moleculares serán analizados en paralelo con los datos clínicos y epidemiológicos de las pacientes estudiadas para determinar las relaciones entre los hallazgos virológicos y las variables clínicas y epidemiológicas analizadas en la población estudiada, y su extrapolación a la comunidad femenina en general.

YO ENTIENDO QUE:

- A) No existen riesgos en este procedimiento de toma de muestra de hisopado cervicouterino.
- B) Los posibles beneficios que tendré en este estudio son: Se podrá establecer un mejor diagnóstico de la enfermedad lo que permitirá un seguimiento adecuado y se mejorará la calidad de vida de pacientes infectadas por VPH con lesiones pre-malignas ya que se focalizará el tratamiento invasivo solamente a las mujeres con lesiones malignas.
- C) Cualquier pregunta que yo quisiera hacer en relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por: Ac. César Bedoya Piloso MSc. Director del Proyecto, Dr. Carlos Mosquera Martínez, Coordinador de Investigación y Diagnóstico Microbiológico del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y Manuel González Jefe del Subproceso de Virología del INSPI.
- D) Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelada y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial, a menos que mi identidad sea solicitada por ley.
- F) Mi consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzado u obligado.

Fecha: día ____ mes ____ año 201 ____

Nombre y Apellidos del Paciente

_____ Firma _____

JULIAN CORONEL 905 Y ESMERALDAS
CASILLA 3961 PAGINA WEB www.inh.gob.ec
E-MAIL: investigacionydoc@inh.gob.ec
TELF. (593) 4 – 2282281 EXT. 232

Anexo D

Comité de Bioética Hospital Dr. Francisco de Ycaza Bustamante



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
DIRECCIÓN PROVINCIAL DE SALUD DEL GUAYAS

Guayaquil, 12 de abril de 2013

Señor Doctor
CÉSAR BEDOYA
Investigador Principal
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA "INSPI"
Presente

De nuestra consideración:

El Comité de Bioética institucional del Hospital del Niño "Dr. Francisco de Ycaza Bustamante", en la sesión del 11 de marzo de 2013, luego del análisis pormenorizado del Proyecto de Investigación "Epidemiología Molecular del Virus de Papiloma Humano para la prevención del Cáncer de Cérvico-Uterino en mujeres de la Región Litoral del Ecuador" SENESCYT PIC-12-HN-001, resolvió aprobarlo.

El Comité solicita a los responsables de la ejecución del Proyecto que presenten los informes del avance del mismo, efectos adversos y demás pormenores que se adviertan en su desarrollo. Un delegado de este organismo supervisará el trabajo.

Hacemos propicia la oportunidad para expresarle nuestros sentimientos de consideración y alta estima.

Atentamente,


Dr. Antonio Aguilar Guzmán
PRESIDENTE


Dr. Francisco Pareja Morante
SECRETARIO

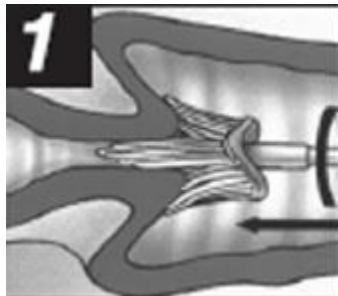
c.c.: Comité de Bioética

Anexo E

Cobas®PCR Cell Collection Media.-

Una pequeña guía para la recolección y transporte de muestras.

Múltiples dispositivos para la recolección de muestras son comúnmente usados en cobas®PCR.



Obtener:

- Inserte el cepillo hasta el cérvix.
- Presione suavemente y gire el cepillo en dirección de las manecillas del reloj cinco veces.
- Retire el cepillo.



Lavar:

- Lave el cepillo lo más rápido posible en el vial de solución empujando el cepillo en la parte inferior del frasco 10 veces.
- Agite vigorosamente el cepillo para poder liberar el material.



Ajustar:

- Ajuste la tapa hasta que quede completamente cerrado.

Precaución:

La muestra será rechazada si hay exceso de sangre (más de 2% v/v). Este espécimen tiene un color rojo o marrón oscuro en el medio de muestreo cobas® PCR Cell Media Collection.

Anexo F

Casos de cáncer in situ y cáncer invasor de cuello de útero en los períodos de 2010-2013.

Casos Nuevos de Cáncer In Situ de Cervix en Mujeres - SOLCA																	
Años	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	>90	TOTAL
2010	1	4	21	27	35	34	21	24	17	16	16	12	6	4	1		239
2011		4	9	23	27	18	15	18	7	9	10	7	3	1			151
2012		1	7	21	13	18	13	11	6	5	3	5	2	1		1	107
2013		1	12	20	21	19	7	9	10	8	12	7	2	3	1		132
	1	10	49	91	96	89	56	62	40	38	41	31	13	9	2	1	629

Ilustración 2 Casos de Cáncer In Situ de Cérnix en mujeres-SOLCA, en los años 2010 hasta 2013. Tomado: Solca-Ecuador, 2014

Casos Nuevos de Cáncer Invasor de Cervix en Mujeres - SOLCA																	
Años	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	>90	TOTAL
2010		2	9	23	30	43	51	60	50	43	45	27	22	9	9		423
2011			5	14	26	41	49	48	40	39	41	25	25	8	5	2	368
2012		2	9	28	38	47	56	63	51	45	28	17	20	8	5	2	419
2013			11	18	29	50	43	31	36	32	33	29	23	15	6	1	357
		4	34	83	123	181	199	202	177	159	147	98	90	40	25	5	1567

Ilustración 3 Casos de Cáncer Invasor de Cérnix en mujeres-SOLCA, en los años 2010 hasta 2013. Tomado: Solca-Ecuador, 2014.

Anexo G

Sistema de clasificación Bethesda 2001 (Modificado)

Sistema Bethesda 2001	
Idoneidad de la muestra	Resultado/Interpretación
Satisfactorio para la evaluación (agrega un indicador de calidad: elementos de la ZT, flora, etc)	<u>Anomalías celulares intraepiteliales</u>
Parcialmente satisfactorio para la evaluación (Especifica causa: artefactos, ausencia de elementos)	Células escamosas
Insatisfactoria para la evaluación (especifica la causa)	Células escamosas atípicas:
Resultado/Interpretación	de significado incierto (ASCUS)
<u>Negativa para las lesiones intraepiteliales o malignidad</u>	no es posible excluir HSIL (ASCH)
Microorganismos	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL)
Trichomonas vaginalis	HPV y displasia leve/NIC1
Organismos fúngicos compatibles morfológicamente con Cándida	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LSIL)
Cambios en la flora sugestiva de vaginosis bacteriana	displasia moderada, severa, CIS/NIC2 y NIC3
Bacterias morfológicamente compatibles con Actinomyces	Carcinoma de células escamosas
Cambios celulares asociados con el virus herpes simple	Células glandulares atípicas:
Otros cambios no neoplásicos:	endometriales, endocervicales, NOS
Cambios reactivos asociados con:	Células glandulares atípicas probablemente neoplásicas:
Inflamación (incluye reparación típica)	endocervical, NOS
Radiación	Adenocarcinoma endocervical in situ
Dispositivo intrauterino (DIU)	Adenocarcinoma
Células glandulares post-histerectomía	Otros
Atrofia	Células endometriales en mujer ≥ 40 años
	Técnicas auxiliares: (p.ej. HPV)
	Recomendaciones: (opcional)
	Notas y sugerencias (opcional)

Ilustración 4 Sistema de clasificación citológica de lesiones cervicales Bethesda 2001. Tomado de: Sánchez, 2011.

Anexo H

Título: Protocolo de extracción para muestra de cepillado.

Fuente: Quiagen Qiamp DNA Mini Kit

1. Programar el termoblock a 56°C. antes de empezar la extracción.
2. Verificar AW1 y AW2 que estén preparados según indicaciones del fabricante y que Buffer AL no esté precipitado.
3. Se toma 1ml de la(s) muestra(s) y se centrifuga a 8000rpm o 6000 g durante 5 min. Este paso se repite hasta que la concentración de Pellet sea adecuada para la extracción (100ul de células acumuladas aproximadamente).

Paso opcional: Si la muestra es abundante, colocar la muestra en tubos Falcón de 15 ml y centrifugar a 4°C por 10 min a 7000rpm, hasta quedarme con un solo pellet.

4. Decantar hasta sólo dejar el Pellet.
5. Se coloca 20µl de Proteinasa K en la muestra y 200µl de de PBS.
6. Colocar 20µl de RNasa A (100mg/ml) y mezclar e incubar por 15 min a 37°C (No viene en el Kit).
7. Colocar 200µL Buffer AL. Se realiza Vortex para homogeneizar.

Nota 1: No colocar la proteinasa K y el Buffer AL en el mismo instante.

Nota 2: Si el pellet de células es muy abundante, la colocación de la proteinasa K, el PBS y el Buffer AL deberán ser aumentados de manera proporcional, como ejemplo: 30ul, 300ul y 300ul respectivamente.

8. Se incuba en el termoblock con una ligera agitación a 56 °C, por un tiempo mínimo de 10 minutos.

Nota 1: Se puede dejar en periodos de tiempo un poco largos, pero esto no va a mejorar o afectar el producto que se desea obtener.

9. Centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapa.
10. Adicionar 400 µl de etanol al 100% a la muestra y mezclar por 15 segundos en el vortex. Brevemente centrifugar para remover las gotas de la tapa.
11. Cuidadosamente colocar 700 µl de la mezcla en la columna, cuidando de no topar los bordes del tubo. Tapar la columna, colocarla dentro del tubo de 2ml y centrifugar a 8000 rpm o 6000g por 1 min.
12. Colocar la columna en un tubo limpio y descartar el filtrado.
13. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar 500 µl de Buffer AW1 sin topar los bordes del tubo, tapar la columna.
14. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
15. Colocar la columna en un tubo limpio y descartar el filtrado.

16. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar 500 μ l de Buffer AW2, sin topar los bordes del tubo. Tapar la columna.
17. Centrifugar a 14000 rpm por 3min.
18. Colocar la columna en un tubo limpio de 2ml y descartar el filtrado.
19. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min y descartar el filtrado.
20. Colocar la columna en un tubo limpio eppendorf de 1.5 ml.
21. Adicionar 50 a 100 μ l de Buffer AE e incubar a temperatura ambiente por 1 min y luego centrifugar a 8000 rpm por 1min.
22. Colocar el ADN extraído para conservación a -20°C en corto plazo

Anexo IComponentes para PCR punto final β -globina:(a) Primers de β -Globina a utilizarse

Primer	Secuencia(5'-3')	nucleótidos	Amplicón
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	20	110 bp
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	20	110 bp

(b) Concentración y volumen a utilizarse en el premix de PCR β -globina.

Reactivos	Concentración	Concentración	Volumen
	Inicial	Final	
H2O	Ajustar al Volumen final de 25ul.		
Buffer de PCR	10x	1x	2.5 μ l
MgCl	50mM	1.5mM	0.75 μ l

dNTPs	10mM	0.2mM	1.25µl
PF/BGfor	10µM	0.2µM	0.5µl
PR/BGrev	10µM	0.2µM	0.5µl
Taq	5U/µl	0.4µ	0.08µl
ADN		100ng/175ng	
Volumen Final			25µl

(c) Ciclaje utilizado para PCR punto final de β -globina

Ciclaje de PCR Punto Final		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
95 °C	5 min	1x
95 °C	1 min	40x
55 °	1 min	
72 °C	1 min	

72 °C	10 min	1x
4 °C	∞	1x

Amplicón Esperado: 110pb

Tomado de: Kit Invitrogen "Platinum Taq DNA Polymerase"

(b) Concentración y volumen a utilizarse en el premix de PCR MY11/09.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen
H ₂ O	Ajustar al Volumen final de 25ul.		
Buffer de PCR	10x	1x	2.5µl
MgCl	50mM	1.5mM	0.75µl
dNTPs	10mM	0.2mM	1.25µl
PF/MY11	10µM	0.2µM	0.5µl
PR/MY09	10µM	0.2µM	0.5µl
Taq	5U/µl	0.4µ	0.08µl
ADN		100ng/175ng	
Volumen Final			25µl

(c) Ciclaje utilizado para PCR punto final de MY11/09.

Ciclaje de PCR Punto Final		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
95 °C	5 min	1x
95 °C	1 min	40x
57 °	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1x
4 °C	∞	1x

Amplicón Esperado: 450 bp

Tomado de: Kit Invitrogen "Platinum Taq DNA Polymerase"

Anexo K

Protocolo Anyplex II HPV 28

Título: Multiplex qPCR para detectar HPV

Tomado de: Seegene Inc.

Tabla IV Componentes del Kit Anyplex II 28 HPV.

Symbols	Contents	Volume	Description
PRIMER	4X HPV28 A TOM	500 µL	TOCE Oligo Mix (TOM) - Amplification and detection reagents
PRIMER	4X HPV28 B TOM	500 µL	TOCE Oligo Mix (TOM) - Amplification and detection reagents
PREMIX	4X Anyplex PCR Master Mix (with UDG)	500 µL X 2	- DNA Polymerase - Uracil DNA glycosylase (UDG) - Buffer containing dNTPs
CONTROL +	HPV28 PC1	100 µL	Positive control (PC) - Mixture of pathogen clones

CONTROL +	HPV28 PC2	100 µL	Positive control (PC) - Mixture of pathogen clones
CONTROL +	HPV28 PC3	100 µL	Positive control (PC) - Mixture of pathogen clones
Water	RNase-free water	1000 µL X 2	Ultrapure quality PCR grade Negative control (NC) - Sterilized water as negative control

Pasos a seguir:

- Toma de muestra de cepillado cervical (Revisar Anexo 5)
- Cuantificación ADN mediante Nanodrop 200(Thermo Scientific)
- PCR β-globina para comprobar la presencia de ADN (Revisar Anexo 6)
- Extracción de ADN de HPV con primers MY11/09 (Revisar Anexo 7)
- Positivos HPV realizar la reacción del kit, que se detalla a continuación:

Tabla V Volumen necesario de cada uno de los componentes para la preparación de la reacción para detectar infecciones múltiples.

Volumen	Descripción
5 μ L	4X HPV28 A TOM or B TOM
5 μ L	4X Anyplex PCR Master Mix (with UDG)
5 μ L	RNase-free wáter
5 μ L	Sample's nucleid acid
20 μ L	Total volumen of PCR reaction

Nota: Para ejecutar la reacción de control positivo, preparar tres tubos de PCR para cada conjunto, seis tubos de PCR en total;

Para un conjunto, primer tubo con PC1, segundo tubo con PC2 y tercer tubo con PC3.

Para el grupo B, primero tubo con PC1, PC2 segundo tubo con y tercera tubo con PC3.

Positive control of A set

Name	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670			Quasar 705			Auto interpretation
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	IC	35	18	56	68	31	
PC1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	Positive Control (+)
PC2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	Positive Control (+)
PC3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	Positive Control (+)

Positive control of B set

Name	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670			Quasar 705			Auto interpretation
	26	69	73	42	82	53	43	54	70	IC	61	6	44	40	11	
PC1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	Positive Control (+)
PC2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	Positive Control (+)
PC3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	Positive Control (+)

Figura 6 Colocación de controles positivos en el Set A y Set B. Fuente:

Seegene Inc, 2013

- Seleccionar en el menú del software, la configuración de experimento.
- Definir el perfil térmico de la siguiente manera.

Segment	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50°C	4 min
2	1	95°C	15 min
3		95°C	30 sec
4	30	60°C	1 min
5		72°C	30 sec
6	1	55°C	30 sec
7*	1	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)	
8		95°C	30 sec
9	10	60°C	1 min
10		72°C	30 sec
11	1	55°C	30 sec
12*	1	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)	
13		95°C	30 sec
14	10	60°C	1 min
15		72°C	30 sec
16	1	55°C	30 sec
17*	1	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)	

Note: Plate Read on Segment 7.12 and 17. Fluorescence is detected at Melting.

- Seleccionar el volumen final de las reacciones: 20 µL

- Seleccionar los fluoróforos (FAM, HEX, Cal Red 610, 670 Quasar y Quasar 705) que será utilizado en el experimento.
- Una vez corrido el experimento, confirme los resultados de la curva.
- Exportar los datos y asegurarse de guardarlos en carpeta.
- Analizar los resultados:

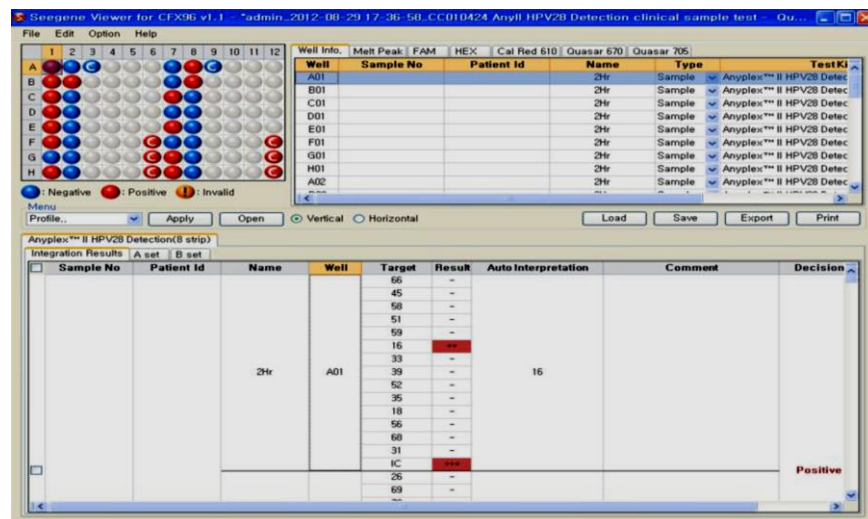


Figura 7 Resultados prueba Kit Anyplex II 28 HPV

Referencias bibliográficas:

1. Garcea RL, DiMaio D, Papillomaviruses T. The Papillomaviruses [Internet]. 2007. 419 p. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-36523-7>
2. Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. Virology [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;384(2):260–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>
3. Ferlay J, Steliarova-foucher E, Lortet-tieulent J, Rosso S. Cancer incidence and mortality patterns in Europe : Estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer [Internet]. 2013;49(6):1374–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
4. Eklund C, Zhou T, Dillner J. Global proficiency study of human papillomavirus genotyping. J Clin Microbiol. 2010;48(11):4147–55.
5. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, et al. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. Gynecol Oncol [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;121(1):32–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.12.005>

6. Morshed K, Polz-Gruszka D, Szymański M, Polz-Dacewicz M. Human Papillomavirus (HPV) – Structure, epidemiology and pathogenesis. *Otolaryngol Pol* [Internet]. 2014;8:4–10. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030665714001309>
7. Chan PKS, Ho WCS, Chan MCW, Wong MCS, Yeung ACM, Chor JSY, et al. Meta-Analysis on Prevalence and Attribution of Human Papillomavirus Types 52 and 58 in Cervical Neoplasia Worldwide. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(9):e107573. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0107573>
8. Tornesello ML, Buonaguro L, Izzo S, Lopez G, Vega X, Reyes CFM, et al. A pilot study on the distribution of human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants in cervical neoplastic lesions from ecuadorian women. *J Med Virol*. 2008;80(11):1959–65.
9. Lu-lu S, Qiong J, Hui L, Xian-rong Z, Zhi-qin S, Xue-mei C, et al. Population-based study on the prevalence of and risk factors for human papillomavirus infection in Qujing of Yunnan province, Southwest China. *Virol J*. 2012;9(1):153.
10. Gimenes F, Medina FS, De Abreu ALP, Irie MMT, Esquicati IB, Malagutti N, et al. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in Semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PLoS One*. 2014;9(6):1–9.
11. De Sanjose S, Quint WG V, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1048–56.
12. Liu X-X, Fan X-L, Yu Y-P, Ji L, Yan J, Sun A-H. Human papillomavirus prevalence and type-distribution among women in Zhejiang Province, Southeast China: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014;14(1):1–7. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/708>
13. Alemany L, Saunier M, Tinoco L, Quirós B, Alvarado-Cabrero I, Alejo M, et al. Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: A worldwide study in 597 samples. *Eur J Cancer*

- [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 Apr 17];50(16):2846–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804914008703>
14. Meloni A, Pilia R, Campagna M, Usai A, Masia G, Caredda V, et al. Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus Infection in Italian women with cervical cytological abnormalities. 2014;3.
 15. María E, Sánchez S. TESIS DOCTORAL Eva María Sánchez Sánchez. 2012;1–157.
 16. Regauer S, Reich O, Eberz B. Vulvar cancers in women with vulvar lichen planus: A clinicopathological study. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;71(4):698–707. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962214015461>
 17. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M, Tommasino M, Gheit T. Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultrasensitive HPV genotyping assay. *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):143–9.
 18. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H Zur, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;401(1):70–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>
 19. Moosa K, Alsayyad AS, Quint W, Gopala K, Deantonio R. An epidemiological study assessing the prevalence of human papillomavirus types in women in the Kingdom of Bahrain. 2014;1–8.
 20. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology* [Internet]. Elsevier; 2013;445(1-2):232–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.018>
 21. Guardado-Estrada M, Juárez-Torres E, Román-Bassaure E, Medina-Martinez I, Alfaro A, Benuto RE, et al. The Distribution of High-Risk Human Papillomaviruses Is Different in Young and Old Patients with Cervical Cancer. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(10):e109406. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0109406>

22. Chopjitt P, Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, Charoensri N. Prevalence of human papillomavirus type 16 and its variants in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand. *Int J Infect Dis*. 2009;13(2):212–9.
23. Iwasaki R, Galvez-Philpott F, Arias-Stella J. Prevalence of high-risk human papillomavirus by cobas 4800 HPV test in urban Peru. *Braz J Infect Dis [Internet]*. Elsevier Editora Ltda; 2014;18(5):469–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24835620>
24. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, et al. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012;86(12):6855–61.
25. Kukimoto I, Maehama T, Sekizuka T, Ogasawara Y, Kondo K, Kusumoto-Matsuo R, et al. Genetic variation of human papillomavirus type 16 in individual clinical specimens revealed by deep sequencing. *PLoS One*. 2013;8(11):1–14.
26. Paz-y-Miño C, Ocampo L, Narváez R, Narváez L. Chromosome fragility in lymphocytes of women with cervical uterine lesions produced by human papillomavirus. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992;59(2):173–6.
27. Huertas-Salgado A, Martín-Gámez DC, Moreno P, Murillo R, Bravo MM, Villa L, et al. E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology [Internet]*. Elsevier Inc.; 2011;410(1):201–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.039>
28. Zhang S, Guo L, Chen Q, Zhang M, Liu S, Quan L, et al. Prevalence of Human Papillomavirus 16 in Esophageal Cancer Among the Chinese Population : a Systematic Review and. 2014;15.
29. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):12180–4.
30. Soto Y, Torres G, Kourí V, Limia CM, Goicolea A, Capó V, et al. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus Infections in Cervical Samples From Cuban Women Older Than 30 Years. *J Low Genit Tract*

- Dis [Internet]. 2013;18(3):210–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270200>
31. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJC, Ronderos M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*. 2004;190(12):2077–87.
 32. Vaccarella S, Lortet-Tieulent J, Plummer M, Franceschi S, Bray F. Worldwide trends in cervical cancer incidence: Impact of screening against changes in disease risk factors. *Eur J Cancer* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;49(15):3262–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.04.024>
 33. Rogovskaya SI, Shabalova IP, Mikheeva I V, Minkina GN, Podzolkova NM, Shipulina OY, et al. Human Papillomavirus Prevalence and Type-Distribution , Cervical Cancer Screening Practices and Current Status of Vaccination Implementation in Russian Federation , the Western Countries of the former Soviet Union , Caucasus Region and Central Asia. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;31:H46–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.043>
 34. García-Espinosa B, Moro-Rodríguez E, Alvarez-Fernández E. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in histological sections of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma in Madrid, Spain. *BMC Cancer* [Internet]. 2012;12:533. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3519706&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 35. Pedianet. Introducción de la vacuna contra el virus del papiloma humano. 2012; Available from: http://www.scp.com.co/ArchivosSCP/boletines_Pedianet/pedianet_075/editorial.html
 36. Gao G, Chernock RD, Gay HA, Thorstad WL, Zhang TR, Wang H, et al. NIH Public Access. 2014;132(4):882–90.
 37. Münger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci*. 2002;7(November 2014):d641–9.

38. Davy C, Doorbar J. Human Papillomaviruses [Internet]. 2005. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/1592599826>
39. D'Souza G, Cook RL, Ostrow D, Johnson-Hill LM, Wiley D, Silvestre T. Anal cancer screening behaviors and intentions in men who have sex with men. *J Gen Intern Med*. 2008;23(9):1452–7.
40. Mehta K, Gunasekharan V, Satsuka A, Laimins L a. Human Papillomaviruses Activate and Recruit SMC1 Cohesin Proteins for the Differentiation-Dependent Life Cycle through Association with CTCF Insulators. *PLOS Pathog* [Internet]. 2015;11(4):e1004763. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004763>
41. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;30(SUPPL.5):F55–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
42. Johannsen E, Lambert PF. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology* [Internet]. Elsevier; 2013;445(1-2):205–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.016>
43. Tamegão-Lopes B, Sousa-Júnior E, Passetti F, Ferreira C, de Mello W, Duarte Silvestre R. Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2014;9(1):25. Available from: <http://www.infectagentscancer.com/content/9/1/25>
44. Egawa N, Kawai K, Egawa K, Honda Y, Kanekura T, Kiyono T. Molecular cloning and characterization of a novel human papillomavirus, HPV 126, isolated from a flat wart-like lesion with intracytoplasmic inclusion bodies and a peculiar distribution of Ki-67 and p53. *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;422(1):99–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.011>
45. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim a., Herrero R, Bratti MC, et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(10):1021–7.
46. De D, Oms OPS, De D, Oms OPS. Directrices de la OPS/OMS.

47. Paengchit K, Kietpeerakool C, Wangchai W, Lalitwongsa S. Cervical Pathology in Cytology-Negative / HPV-Positive Women : Results from Lampang Cancer Hospital , Thailand. 2014;15(July 2013):7951–4.
48. Paengchit K, Kietpeerakool C, Lalitwongsa S. Prevalence and Genotype Distribution of HPV among Women Attending a Cervical Cancer Screening Mobile Unit in. 2014;15:6151–4.
49. Ozgul N, Tuncer M, Abacioglu M, Gultekin M. Estimating prevalence of genital warts in Turkey: Survey among KETEM-affiliated gynecologists across Turkey. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2011;12(9):2397–400.
50. Maglennon GA, Doorbar J. The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J* [Internet]. 2012;6:190–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3547330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
51. Ciencias CDE, Salud DELA, Antonio M, Sotomayor Y. Marco antonio yánez sotomayor. 2009;
52. Neoplasms M, Cervical A, Patients C. Multiple Neoplasms Among Cervical Cancer Patients in the Material of the Lower Silesian Cancer Registry. 2014;433–40.
53. Shi R, Devarakonda S, Liu L, Taylor H, Mills G. Factors associated with genital human papillomavirus infection among adult females in the United States , NHANES 2007 – 2010. 2014;7(1):1–8.
54. Seraceni S, Seta F De, Colli C, Savio R Del, Pesel G, Zanin V, et al. High prevalence of hpv multiple genotypes in women with persistent chlamydia trachomatis infection. 2014;9(1):1–7.
55. Moreira H. Frecuencia Del Virus Del Papiloma Humano Durante El Embarazo En Mujeres De 15 a 25 Años Atendidas En La Maternidad Enrique C. Sotomayor De Septiembre Del 2012 a Febrero Del. 2013;1–50. Available from: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1850/1/tesis_de_virus_papiloma_humano.pdf
56. Las DA, Que U, La AA, Del G, José O, Tercer EL, et al. PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA LA PREVENCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) CONSULTA DE GINECOLOGÍA DEL

HOSPITAL HERNÁNDEZ ” DE LOS MAGALLANES DE CATIA EN PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA LA PREVENCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH). 2005;

57. Larsson GL, Helenius G, Andersson S, Sorbe B, Karlsson MG. Prognostic impact of human papilloma virus (HPV) genotyping and HPV-16 subtyping in vaginal carcinoma. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;129(2):406–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.02.004>
58. Martín P, Kilany L, García D, López-García AM, Martín-Azaña M, Abraira V, et al. Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infect Dis*. 2011;11(1):316.
59. Ogembo RK, Gona PN, Seymour AJ, Soo- H, Park M, Bain PA, et al. Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes among African Women with Normal Cervical Cytology and Neoplasia : A Systematic Review and Meta-Analysis. 2015;(lcc):1–22.
60. Scarani P, Eusebi V. From the new moon to the full moon: anatomic pathology in Bologna from the 1500s to Armando Businco. *Pathologica*. 2009;101(2):53–75.
61. Song JS, Kim EJ, Choi J, Gong G, Sung CO. Significance of HPV-58 Infection in Women Who Are HPV-Positive, Cytology-Negative and Living in a Country with a High Prevalence of HPV-58 Infection. *PLoS One*. 2013;8(3).
62. Jariené K, Vaitkienė D, Bartusevičius A, Tvarijonavičienė E, Minkauskienė M, Nadišauskienė R, et al. Prevalence of human papillomavirus types 16, 18, and 45 in women with cervical intraepithelial changes: associations with colposcopic and histological findings. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2012;48(1):22–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481371>
63. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical : Manual para principiantes La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical Manual para principiantes.

64. Somma M, Querci M. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos Sesión n° 5 Electroforesis en gel de agarosa.
65. Dna HP V, Product T, Is I, For P, To PN, The P, et al. Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV DNA Test™ An In Vitro Nucleic Acid Hybridization Assay with Signal Amplification using Microplate Chemiluminescence for the Qualitative Detection of Human Papillomavirus (HPV). 2004;
66. Boehmer G, Wang L, Iftner A, Holz B, Haedicke J, von Wasielewski R, et al. A population-based observational study comparing Cervista and Hybrid Capture 2 methods: improved relative specificity of the Cervista assay by increasing its cut-off. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014;14(1):1–9. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/674>
67. Estrade C, Sahli R. Comparison of seegene anyplex II HPV28 with the PGMY-CHUV assay for human papillomavirus genotyping. *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):607–12.
68. Marks M a., Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE. Evaluation of any or type-specific persistence of high-risk human papillomavirus for detecting cervical precancer. *J Clin Microbiol*. 2012;50(2):300–6.
69. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N S, PJ VS. No Title. Worldw Distrib Hum papillomavirus types Cytol Norm women Int Agency Res Cancer HPV Preval Surv a Pool Anal [Internet]. 2005;360:991–8. Available from: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(05\)67069-9/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(05)67069-9/fulltext)
70. Shaltout MF, Sallam HN, AbouSeeda M, Moiety F, Hemeda H, Ibrahim A, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus among women older than 18 years in Egypt: a multicenter, observational study. *Int J Infect Dis* [Internet]. International Society for Infectious Diseases; 2014;29:226–31. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971214016609>
71. Vaca D. “ Identificación Del Virus De Papiloma Humano Mediante Pcr-Rflp Y Posterior Genotipificación En Muestras De Tejido Cervical Parafinado , Con Diagnóstico Histopatológico De Displasia Severa O

- Cáncer in Situ , Procedentes Del Hospital De Solca Núcleo Quito. Dep Ciencias La Vida. 2012;1–147.
72. Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(10):1–15.
 73. Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama a., Kondo K, Tsunoda H, et al. Human Papillomavirus Genotype Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3 and Invasive Cervical Cancer in Japanese Women. *Jpn J Clin Oncol* [Internet]. 2014;44(10):910–7. Available from: <http://jjco.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jjco/hyu112>
 74. Adler DH, Wallace M, Bennie T, Mrubata M, Abar B, Meiring TL, et al. Cervical Dysplasia and High-Risk Human Papillomavirus Infections among HIV-Infected and HIV-Uninfected Adolescent Females in South Africa. *Infect Dis Obstet Gynecol* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ido/2014/498048/>
 75. García L, Burgos R, Ruiz J, Valle J, Egas D, Valle É. Detección molecular y genotipificación del virus del papiloma humano en el Instituto Oncológico Nacional ION-SOLCA del Ecuador. *Rev Med*. 2005;11(2):114–7.
 76. Sources D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : 2008;