

MARCADORES MOLECULARES Y EPIDEMIOLÓGICOS EN LA INFECCIÓN POR
VPH EN MUJERES SISBENIZADAS DE LOS ESTRATOS 1, 2 Y 3 DEL MUNICIPIO
DE PASTO

CLAUDIA ANDREA SÁNCHEZ
KAREN SUÁREZ NARVÁEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2012

MARCADORES MOLECULARES Y EPIDEMIOLÓGICOS EN LA INFECCIÓN POR
VPH EN MUJERES SISBENIZADAS DE LOS ESTRATOS 1, 2 Y 3 DEL MUNICIPIO
DE PASTO

CLAUDIA ANDREA SÁNCHEZ
KAREN SUÁREZ NARVÁEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo:

Directora

MILENA GUERRERO FLÓREZ
Mg. Ciencias Microbiología

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2012

“Las líneas y conclusiones aportadas son responsabilidad exclusivas de sus autores”

Artículo 1ro N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Concejo Superior directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Milena Guerrero Flórez
Director

Jaqueline Mena Huertas
Jurado

Luz Estela Lagos
Jurado

San Juan de Pasto, Febrero de 2012

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Nariño por permitir formarnos como profesionales

Al CESUN, por la financiación de este trabajo de investigación. A su directora la Dra. María Clara Yépez, por su asesoría, su apoyo, respaldo y orientación en todo el proceso de este trabajo de investigación.

A la Empresa Social del Estado Pasto - Salud ESE, por su apoyo, su colaboración y el suministro de las muestras.

Al Departamento de Biología y su directora la Dra. Martha Sofía Gonzáles y a cada uno de sus docentes, por formarnos como biólogos, por compartir con nosotros sus conocimientos y el amor por la biología para nuestro desarrollo profesional.

A nuestra directora, Milena Guerrero, por su orientación, guía, apoyo y confianza en este trabajo de investigación. Por enseñarnos este camino y con quien hemos aprendido no solo lo escrito en los libros. Gracias por su cariño, su valiosa amistad y confianza.

A nuestros jurados de trabajo de grado, la profesora Luz Estela Lagos y la profesora Jacqueline Mena, por sus valiosas apreciaciones, aportes y orientación en todo el proceso de investigación.

A la Dra. Cristina Santacruz por su confianza y su respaldo durante todo el proceso de investigación y su interés en la vinculación de la investigación con los programas de salud, en beneficio de nuestro municipio.

Al Dr. Fabio Aristizábal, la Dra. Adriana García y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por su asesoría, su apoyo y su colaboración en la parte metodológica de la investigación.

Al Dr. Javier Salas, por su apoyo y orientación en el área de la ginecología.

A todas y cada una de nuestras pacientes, por su amable colaboración para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Al Dr. Arsenio Hidalgo por su valiosa asesoría en el análisis de los datos de esta investigación.

A Johanita Nieves y Luis Carlos Souza del CESUN, por su apoyo y su colaboración.

A nuestro amigos, Diana, Gabriela, Eliana, Sandra, Marcela, Isabel, Mónica, Juranny, Cesar, con quienes pasamos incontables horas de estudio y trabajo, por su amistad, su cariño, su fortaleza y por creer en nosotros.

A todos ellos "MUCHAS GRACIAS"

DEDICATORIA

A ti Dios, por ser mi sostén y guía en cada momento de mi vida
A mi abuelita, por ser el motor de mi vida
A mi familia, por ser mi fuerza y mi templanza, por creer en mí, consentirme y llenarme
de razones para continuar mi camino sin desfallecer
A Karen, por su amistad y por el trabajo en equipo que nos permitió llegar al final de
esta meta
A mis amigos, por su cariño, su comprensión, sus palabras y tantos momentos
compartidos
A mi profe Mile, por su confianza, sus enseñanzas y su apoyo incondicional

Claudia Sánchez

*“Quienes no pueden sentirse atraídos por nuevas experiencias, no podrán
desarrollarse más allá del punto en el camino donde descansan ahora”
Clarissa Pinkola Estés*

DEDICATORIA

A Dios por su gran amor. Porque todas las cosas proceden de Él, existen por Él y para Él.

A mis padres, Héctor Suárez y Gloria Narváez, por su amor, su sacrificio, su apoyo, su ejemplo, su comprensión, para ustedes que son la razón de mi vida, gracias por permitirme cumplir mis sueños

A mi hermana Ángela, por su compañía, su cariño, su apoyo, mi alegría.

A mi familia por su apoyo constante en esta etapa de mi vida.

A Claudia, por su amistad incondicional, por el tiempo compartido, por su comprensión para superar los momentos difíciles.

A mis amigos, por su compañía, sus palabras, sus consejos, su confianza, su fortaleza y por siempre creer en mí.

Karen Suárez Narváez

“Cuando Dios te tiene en proceso preparándote para algo, no tienes que preocuparte por reservar el espacio, nadie se adueñara de ese lugar hasta que estés listo”

RESUMEN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un patógeno transmitido sexualmente y es el principal agente causal del cáncer de cuello uterino (CCU), el cual, constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial. En Colombia el CCU es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres y el municipio de Pasto ostenta una de las más altas tasas de incidencia del país (27,39 por 100.000 habitantes). Actualmente, crece el interés a nivel nacional y mundial de tener un mejor entendimiento de la historia natural de la infección por VPH, que permitan mejorar las estrategias de control y diagnóstico temprano de la infección viral y evitar su posterior progresión a lesiones preneoplásicas y neoplásicas.

En el presente estudio, se realizó la detección y tipificación del VPH, mediante *Reverse line blot* - GP5+/GP6+, en muestras de cepillado cervical tomadas de 160 mujeres que acudieron a la toma de citología en 7 IPS del municipio de Pasto. Los resultados obtenidos se analizaron en conjunto con los resultados de la citología y con algunas variables poblacionales. El DNA del VPH fue detectado en 6.4% de las pacientes en estudio, los genotipos encontrados fueron: VPH 11, 45, 53, 54, 55, 56, 70 y 84, los tipos virales de alto riesgo representaron el 54.6% y los de bajo riesgo el 45.4%. De las mujeres positivas para VPH, el 90% de las pacientes presentaron infecciones con un solo tipo viral y el 10% infección múltiple. La edad, la infección por otros microorganismos, el número de gestas, el uso de anticonceptivos y los cambios celulares reactivos asociados a inflamación no constituyeron factores determinantes para adquirir o explicar la infección por el VPH en mujeres con citología normal. La infección viral fue más frecuente en mujeres menores de 37 años, con al menos una gesta previa y con algún grado de inflamación en el cérvix. Esta investigación es el primer acercamiento al estudio de la infección por VPH en las mujeres del municipio de Pasto.

Palabras claves: Virus del Papiloma Humano, Cáncer de cuello uterino, *Reverse line blot* - GP5+/GP6+, Pasto.

ABSTRACT

Human Papilloma Virus (HPV) is a sexually-transmitted pathogen well known for being the main cause of cervical cancer, which constitutes a major problem of public health worldwide. In Colombia, cervical cancer is the second cause of women mortality, and Pasto city shows one of the highest incidence rates into the country (27.39 per 100,000 inhabitants). Currently, there is a growing national and global concern in order to get a higher insight about the natural history of HPV infection, and enable improvement of early-diagnosis and control strategies of the viral infection avoiding further progression to pre-neoplastic and neoplastic lesions.

In the present study was performed the HPV-detection and typing by Reverse line blot - GP5+/6+, in cervical cell samples taken from 160 women who attended the cytology's taking in 7 IPS (health provider institutions) of Pasto city (Colombia). Such results were analyzed together with the cytologies and some population variables. The DNA of the HPV was detected in 6.4 % of the patients studied; meanwhile, the genotypes found were: HPV 11, 45, 53, 54, 55, 56, 70 and 84, the high-risk HPV types represented 54.6% and those of low-risk 45.4%. Into the women found positive for HPV, 90% had a single HPV infection and 10% of patients had a multiple HPV infection. Age, infection with other microorganisms, the number of pregnancies, the use of contraceptives and reactive cellular changes associated with inflammation were found to be not decisive factors for acquiring or explain HPV-infection into the group of women exhibiting normal cytology. The viral infection was more often for women under 37 years having at least one previous pregnancy together with some degree of cervix inflammation. This research constitutes the first approach to the study of the HPV infection in women of Pasto city.

Key words: Human Papilloma Virus, Cervical Cancer, Reverse line blot - GP5+/6+, Pasto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	21
1. OBJETIVOS.....	23
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
2. ESTADO DEL ARTE.....	24
2.1 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO (VPH).....	24
2.2 TIPOS DE VIRUS PAPILOMA HUMANO.....	25
2.3 HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER CERVICAL.....	26
2.4 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VPH.....	28
2.5 LESIONES ASOCIADAS CON EL VPH Y DESARROLLO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO.....	30
2.6 FACTORES DE RIESGO IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN ACÁNCER.....	31
2.7 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE LESIONES PRECANCEROSAS Y CÁNCER CERVICOUTERINO CONVENCIONALES Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	32
3. MATERIALES Y METODOS.....	35
3.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRAS.....	35
3.1.1 Sitios de muestreo.....	35
3.1.2 Criterios de inclusión.....	35
3.1.3 Criterios de exclusión.....	35
3.1.4 Consideraciones éticas.....	36
3.1.5 Tamaño de la muestra.....	36
3.1.6 Variables poblacionales contempladas en el estudio.....	36
3.2 CAPACITACIÓN DE PERSONAL PARA LA TOMA DE MUESTRAS.....	36
3.3 TOMA DE MUESTRAS Y TRANSPORTE.....	36

3.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	37
3.4.1 Muestras para citologías.....	37
3.4.2 Muestras para análisis molecular.....	37
3.4.3 Manejo de información.....	37
3.5 DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH.....	37
3.5.1 Análisis de calidad del ADN mediante amplificación por PCR del gen de -globina:.....	38
3.5.1.1 Reacción de amplificación del gen de -globina.....	38
3.5.1.2 Verificación de PCR/ -globina.....	39
3.5.1.3 Interpretación de resultados.....	39
3.5.2 Amplificación GP5+/BIO-GP6+ de VPH a partir de muestras positivas para el gen de -globina.....	39
3.5.3 Hibridación mediante <i>Reverse Line Blot (RLB)</i> de los productos de PCR GP5+/BIO-GP6+:.....	40
3.5.3.1 Activación de membrana.....	41
3.5.3.2 Hibridación de las oligosondas y los productos de PCR GP5+/BIO -GP6+.....	41
3.5.3.3 Incubación y lavados de la membrana.....	41
3.5.3.4 Revelado y/o detección.....	42
3.5.3.5 Reutilización de la membrana (<i>stripping</i>).....	42
3.5.3.6 Interpretación de resultados.....	42
3.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	43
3.6.1 Análisis descriptivo.....	43
3.6.2 Análisis de concordancia entre los resultados de citología y la detección molecular de VPH.....	43
3.6.3 Análisis de los resultados de la detección molecular de VPH y las variables poblacionales contempladas en el estudio.....	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN.....	44
4.1.1 Edad.....	44
4.1.2 Paridad.....	45
4.1.3 Anticonceptivos.....	45
4.1.4 Citología previa.....	45
4.2 RESULTADOS DE LA CITOLOGÍA CERVICOUTERINA.....	46
4.2.1 Clasificación general del estudio citológico:.....	46
4.2.2 Aspectos del cérvix.....	48
4.2.3 Cambios celulares reactivos.....	48
4.2.4 Infección por otros microorganismos.....	49
4.3 RESULTADOS DE DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH.....	50
4.3.1 Análisis de calidad del ADN mediante amplificación del gen de β -globina.....	50
4.3.2 Detección y tipificación de VPH mediante RLB:.....	51
4.3.2.1 Riesgo oncogénico de los tipos de VPH detectados.....	52
4.3.2.2 Infecciones múltiples por VPH.....	54
4.4 ANÁLISIS DE CONCORDANCIA ENTRE LOS RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO CITOLOGICO Y LA DETECCIÓN MOLECULAR DE VPH.....	55
4.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA DETECCIÓN MOLECULAR DE VPH Y LAS VARIABLES POBLACIONALES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.....	58
4.5.1 Análisis entre la edad y la infección por VPH.....	60
4.5.2 Análisis entre infección por otros microorganismos e infección por VPH.....	61
4.5.3 Análisis entre paridad e infección por VPH.....	62
4.5.4 Análisis entre uso de anticonceptivos e infección por VPH.....	63
4.5.5 Análisis entre cambios celulares reactivos asociados a inflamación e infección por VPH.....	64
CONCLUSIONES.....	65

RECOMENDACIONES.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	67
ANEXOS.....	77

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Organización del genoma del VPH.....	24
Figura 2. Representación de las lesiones intraepiteliales.....	26
Figura 3. A. Lesión de bajo grado, displasia leve. B. Lesión de alto grado. C. Carcinoma <i>in situ</i>	27
Figura 4. Diferentes formas de expresión de los genes del VPH en el epitelio escamoso humano y su correlación con la morfología.....	30
Figura 5. Mapa del municipio de Pasto con los sitios de muestreo.....	35
Figura 6. Anillamiento de los iniciadores PCO3 Y PCO4 en el gen de α -globina en humanos.....	38
Figura 7. Sitio de anillamiento de iniciadores GP5+ Y GP6+ en el genoma del VPH tipo 18.....	40
Figura 8. Representación de una autorradiografía de la genotipificación de HPV, Mediante <i>Reverse line blot</i>	42
Figura 9. Amplificación del gen de α -globina.....	51
Figura 10. Autorradiografía de la genotipificación de HPV mediante <i>Reverse line blot</i>	51

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clasificación de los tipos de VPH según datos obtenidos mediante estudios filogenéticos y epidemiológicos.....	25
Tabla 2. Secuencia de los iniciadores PCO3/PCO4.....	38
Tabla 3. Mezcla de reacción para la PCR HHB con los iniciadores PCO3 – PCO4....	38
Tabla 4. Secuencia de los iniciadores GP5+ / GP6+.....	39
Tabla 5. Mezcla de reacción para la PCR GP5+/6+.....	40
Tabla 6. Oligosondas tipo específicas de VPH usadas en la tipificación por RLB de los productos de PCR GP5+/Bio-GP6+.....	41
Tabla 7. Número de muestras tomadas en cada IPS (Pasto-Salud ESE).....	44
Tabla 8. Edad de la población de estudio.....	44
Tabla 9. Características ginecoobstétricas de la población de estudio.....	46
Tabla 10. Resultado citológico de las pacientes incluidas en el estudio.....	47
Tabla 11. Características clínicas de la población de estudio.....	50
Tabla 12. Distribución de la frecuencia de los tipos de VPH tipificadas por RLB.....	52
Tabla 13. Tabla de contingencia RLB-citología.....	55
Tabla 14. Distribución de frecuencias de VPH según las variables sociodemográficas y clínicas.....	59

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Consentimiento informado para participar en la investigación	77
ANEXO B. Anamnesis y formato de resultados de la citología.....	81
ANEXO C. Alineamiento iniciador GP6+.....	83
ANEXO D. Alineamiento iniciador GP5+.....	86
ANEXO E. Preparación de reactivos para <i>Reverse Line Blot</i> RLB.....	89
ANEXO F. Informe de citologías realizadas por Pasto Salud ESE 2009.....	90
ANEXO G. Incidencia cáncer de cérvix in situ – maligno Pasto 1998 - 2007.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: Adenocarcinoma
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AR: Alto Riesgo
ASCUS: Células Escamosas Atípicas de Significancia no Determinada
BR: Bajo Riesgo
CCI: Cáncer de cuello uterino invasivo
CCU: Cáncer Cérvico Uterino
DIU: Dispositivo intrauterino
ENDS: Encuesta Nacional de Demografía y Salud
ESE: Empresa Social del Estado
FDA: Administración de alimentos y medicamentos
HC2: Captura de Híbridos 2
HIS: Hibridación *in situ*
HSV: Virus *Herpes simplex*
HSV-2: Virus *Herpes simplex* tipo II
IARC: International Agency for Research on Cancer
INC: Instituto Nacional de Cancerología
IPS: Instituciones prestadoras de salud
LIEAG: Lesiones Intraepiteliales escamosas de Alto Grado
LIEBG: Lesiones Intraepiteliales escamosas de Bajo Grado
NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical
NIC I: Neoplasia intraepitelial cervical grado 1; displasia leve
NIC II: Neoplasia intraepitelial cervical grado 2; displasia moderada
NIC III: Neoplasia intraepitelial cervical grado 3; displasia severa
NPN: Negativo para Neoplasia
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORF: Open Reading Frames
SHC: Sistema del híbrido de captura
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
RLB: *Reverse line blot*
RPC: Registro poblacional de cáncer
TAE: Tasa Ajustada por edad
TBS: Sistema Bethesda
UV: ultravioleta
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH: Virus Papiloma Humano

GLOSARIO

ADENOCARCINOMA: Cáncer que se inicia en las células que revisten ciertos órganos internos y que tienen propiedades glandulares (secretorias).

AGENTE ETIOLOGICO: Agente causal de una enfermedad.

AGENTE CAUSAL: un agente es un factor que está presente para la ocurrencia de una enfermedad, por lo general un agente es considerado una causa necesaria pero no suficiente para la producción de la enfermedad.

ANOVULATORIO: Sustancia o medicamento que impide la ovulación durante el ciclo menstrual.

ATROFIA: Consiste en una disminución importante del tamaño de la célula y del órgano del que forma parte, debido a la pérdida de masa celular. Las células atroficas muestran una disminución de la función pero no están muertas.

BIOPSIA: Extracción de células o tejido para ser examinados por un Patólogo.

CÁNCER: El término «cáncer» es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de los límites normales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer.

CÁNCER IN SITU: Carcinoma que no invade la membrana basal del epitelio (preinvasivo) y que no presenta la propagación de células malignas desde el sitio de origen hasta los tejidos vecinos.

CÁNCER INVASOR DE CUELLO UTERINO: Cáncer que se ha diseminado desde la superficie del cuello uterino hasta lo más profundo de éste a otras partes del cuerpo.

CÁNCER CERVICAL: Cáncer que se forma en los tejidos del cérvix o cuello del útero

COILOCITO: Es la manifestación clásica de la infección por VPH en la célula. Fue descrito por primera vez por Koss y Durfee en 1956. El coilocito es una célula epitelial escamosa, más comúnmente superficial e intermedia, aunque también puede verse en células parabasales y metaplásicas. Esta célula presenta cambios típicos tanto en su núcleo como en su citoplasma, pierde los bordes angulados usuales de la célula escamosa superficial y su forma tiende a ser redondeada y ovoide.

COLPOSCOPIA: Técnica en la cual se examina la vagina y la superficie del cuello uterino bajo un microscopio iluminado o colposcopio para ver indicios de células precancerosas o cáncer.

CRIBADO: Aplicación de pruebas con el fin de detectar una neoplasia en una persona sin manifestaciones clínicas.

CONDILOMA ACUMINADO: Papiloma acuminado, Crestas genitales. Es una enfermedad de transmisión sexual (ETS) causada por el VPH. Se caracteriza por el crecimiento de verrugas blandas en forma de coliflor en los genitales o en la región anal.

CUELLO UTERINO: El extremo cilíndrico inferior del útero que forma un canal angosto que conecta al útero con la vagina.

DIFERENCIACIÓN CELULAR: grado de especialización de las células neoplásicas. Una célula neoplásica indiferenciada, es una célula más primitiva que aquellas del tejido del cual proviene.

DISPLASIA: El término displasia se refiere a los cambios degenerativos o patológicos, que presentarán las células en su camino hacia células neoplásicas o tumorales.

EFEECTO CITOPÁTICO: Se denomina efecto citopático a los cambios bioquímicos y moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, visibles a microscopía óptica, causados durante el ciclo de replicación viral.

ENDOCERVIX: es la porción del cuello uterino que se encuentra inmediatamente después del orificio cervical externo. Está constituido por un epitelio cilíndrico secretor de moco, formando una capa de células única.

ESTUDIO MÚLTICENTRICO: Estudios clínicos controlados que son planeados y ejecutados por distintas instituciones cooperantes para estimar la magnitud de ciertas variables y resultados en una población de pacientes.

EVERSIÓN O ECTROPIÓN: Es una condición en la cual el ectocervix es cubierto por el epitelio columnar, hacia la unión escamocolumnar. Esta condición está presente aproximadamente en el 25% en mujeres adultas jóvenes.

EXOCERVIX O ECTOCÉRVIX: Es la parte que se ve más fácilmente del cuello uterino a través de la vagina en una colposcopia. Está rodeado por los fondos de saco vaginales. Está recubierto por un epitelio escamoso estratificado rosado, de múltiples capas celulares.

FACTOR DE RIESGO: Cualquier circunstancia que puede aumentar la posibilidad de que se presente una enfermedad. Algunos ejemplos de factores de riesgo como: los biológicos, ambientales, de comportamiento, socio-culturales, económicos, pueden sumarse unos a otros y aumentar el efecto aislado de cada uno de ellos produciendo un fenómeno de interacción.

FALSO NEGATIVO: Es un error por el cual al realizar una exploración física o una prueba complementaria su resultado es normal o no detecta la alteración, cuando en realidad hay una enfermedad en el paciente.

FALSO POSITIVO: es un error por el cual al realizar una prueba complementaria su resultado indica una enfermedad, cuando en realidad no la hay.

HISTERECTOMÍA: Operación en la que se extrae el útero (matriz).

HOSPEDERO: es un persona o animal vivo, que en circunstancias naturales permite la subsistencia o el alojamiento de un agente infeccioso

INCIDENCIA: Es la medida del número de casos nuevos, llamados casos incidentes, de una enfermedad originados de una población en riesgo de padecerla, durante un periodo de tiempo determinado. La incidencia es un indicador de la velocidad de ocurrencia de una enfermedad u otro evento de salud en la población y, en consecuencia, es un estimador del riesgo absoluto de padecerla.

INFECCIÓN: es la entrada y desarrollo o multiplicación de un agente infeccioso en el organismo de una persona o animal

INFECCIÓN SUBCLÍNICA O ASINTOMÁTICA: es la presencia de un agente infeccioso en un hospedero sin que aparezcan signos o síntomas clínicos manifiestos. Solo pueden identificarse por métodos de laboratorio o por la manifestación de reactividad positiva a pruebas cutáneas específicas.

INMUNIDAD: Es el estado de resistencia generalmente asociado con la presencia de anticuerpos y citoquinas que poseen acción específica sobre el microorganismo responsable de una enfermedad infecciosa específica o sobre sus toxinas.

LIEAG: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Displasia moderada a grave, diagnosticada mediante colposcopia y biopsia. Si se confirma con la colposcopia, tales cambios celulares pueden evolucionar a cáncer y deben eliminarse mediante un tratamiento.

LIEBG: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. Células ligeramente anormales, diagnosticadas con una colposcopia. En la mayoría de los casos, estos tipos de células cervicales anormales desaparecen por si solas sin tratamiento.

METAPLASIA: Cambio o reemplazo de un tipo de epitelio por otro. Es decir, la transformación o reemplazo de un tejido adulto en otro de la misma clase.

MULTÍPARIDAD: Mujer que ha dado a luz dos o más hijos

NEOPLASIA: Multiplicación progresiva de células en condiciones que no permitirían la multiplicación de las células normales. La neoplasia puede ser benigna o maligna.

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical. Término utilizado por los patólogos para clasificar la severidad de la displasia.

NIC I: Un tercio del revestimiento epitelial contiene células anormales. Se considera de grado bajo, también denominado displasia leve.

NIC II: Dos tercios del revestimiento epitelial contienen células anormales. Se denomina displasia moderada.

NIC III: Todo el espesor del epitelio contiene células anormales. Se considera de grado alto, se denomina también displasia severa.

NULÍPARA: Mujer que no ha dado luz a ningún hijo

PRUEBA DE PAPANICOLAU: Procedimiento mediante el cual se raspan células del cérvix para examinarlas al microscopio. Se usa para detectar cáncer y cambios que pueden resultar en cáncer. Esta prueba puede mostrar también estados no cancerosos, como infecciones o inflamación.

PREVALENCIA: Es la medida del número total de casos existentes, llamados casos prevalentes, de una enfermedad en un punto o periodo de tiempo y en una población determinados, sin distinguir si son o no casos nuevos. La prevalencia es un indicador de la magnitud de la presencia de una enfermedad u otro evento de salud en la población.

TASA AJUSTADA POR EDAD (TAE): indica el número teórico de enfermos que tendría una población predeterminada, si los riesgos que actúan en la población real para producir la enfermedad actuarán en la población teórica de referencia, habitualmente compuesta de 100.000 habitantes para cada género.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino (CCU) es un problema de salud pública a nivel mundial, es la segunda neoplasia maligna más frecuente en mujeres y la quinta causa de muerte por cáncer (García *et al.*, 2010; Brebi *et al.*, 2009). Estudios previos han reportado que el 83% de todos los casos de cáncer cervical registrados son observados en los países en vía de desarrollo y han proyectado que este porcentaje probablemente se incremente a 90% para el 2020 (Segovia y Mendoza 2009; Correnti *et al.*, 2011). En Colombia, la incidencia ajustada por edad de cáncer cervicouterino es de 36.4 por 100.000 habitantes y la tasa de mortalidad ajustada por edad es de 18.2 por 100.000 habitantes (INC 2007). En el municipio de Pasto, la incidencia de neoplasia maligna del útero fue de 27,39 por 100.000 habitantes y de neoplasia in situ de cuello del útero fue de 30,30 por 100.000 habitantes según el Registro Poblacional de Cáncer de Pasto durante el periodo 2003-2007.

El Virus del papiloma humano (VPH) es considerado como el principal agente causal de las lesiones intraepiteliales y del cáncer de cuello uterino (Muñoz *et al.*, 2003). Se han descrito más de 100 tipos virales de VPH, de los cuales aproximadamente 40 infectan las superficies mucosas del epitelio ano-genital y son clasificados de acuerdo a su potencial oncogénico en tipos de alto riesgo y bajo riesgo (Brebi *et al.*, 2009; Segovia y Mendoza 2009; Roa *et al.*, 2009). Los tipos virales de AR se encuentran en 90%-100% de los carcinomas y lesiones preneoplásicas de alto grado y los tipos de VPH de BR generalmente están asociados con lesiones benignas o con muy bajo potencial de malignidad (Melo *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2010; Del Pino *et al.*, 2011). En Colombia, se ha detectado infección con los tipos de alto riesgo VPH 16 y 18, en mujeres con citología normal, principalmente en edades de los 15-25 años y más recientemente se ha identificado a VPH 58 en más del 77% de los casos, sin embargo, cabe resaltar que la prevalencia de los diferentes tipos virales puede variar en las distintas regiones geográficas (Hoory *et al.*, 2008).

En los tipos de cáncer atribuibles a la infección por VPH, los tumores se desarrollan en el epitelio, en general, varios años después de la infección inicial (Reigosa *et al.*, 2004; García *et al.*, 2010). El potencial oncogénico de los VPH, principalmente de los tipos de alto riesgo, radica en la capacidad de integrar su ADN al genoma de la célula hospedera y determinar la expresión continua de las oncoproteínas E6/E7; las cuales son capaces de interferir con las funciones de las proteínas p53 y pRb a nivel del ciclo celular favoreciendo la proliferación neoplásica, de tal manera que la prolongada expresión de los genes virales incluye la alteración de genes celulares, dando lugar a la regulación negativa de los genes supresores de tumores y los genes pro-apoptóticos (Hoory *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2010).

La presencia de tipos de VPH de alto riesgo es necesaria para inducir la progresión a carcinogénesis cervical, pero no es una causa suficiente, deben existir otros factores relacionados con las células hospederas, hábitos del hospedero y su medio ambiente, tales como: alteraciones genéticas, deterioro de la función inmune, exposición a agentes carcinógenos como la luz ultravioleta (UV), co-infección con enfermedades de transmisión sexual, uso prolongado de anticonceptivos orales, multiparidad elevada y tabaquismo (Molano *et al.*, 2002; Molijn *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2011). En muchos casos, no es claro como estos factores contribuyen al desarrollo de los tumores malignos, se considera que posiblemente pueden aumentar el riesgo para el

establecimiento de infecciones genitales, influir en la disminución de la inmunidad local o sistémica, estimular el crecimiento o inducir mutaciones en el tejido infectado con VPH (Hoory *et al.*, 2008).

La citología cérvico-uterina es el método preventivo más empleado en la detección de alteraciones celulares causadas por la infección de VPH. Una evaluación citológica anual de manera óptima permitiría prevenir hasta un 70% de las neoplasias cervicales (Castellanos, 2003; Ruiz *et al.* 2008). Sin embargo, a pesar de todas las ventajas de la citología, su evaluación está basada en parámetros subjetivos y requiere una alta experticia por el personal de salud encargado, lo que genera una proporción importante de falsos positivos y falsos negativos, atribuidos a lecturas incorrectas y a errores en la toma de la muestra (Melo *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006). Además, una de las limitaciones más relevantes de este método, es que solo permite sugerir la presencia de una infección por VPH, pero no es posible hacer la detección directa del virus, establecer si hay infección mixta viral y los genotipos correspondientes, información que podría ser relevante en el manejo de las lesiones cervicales y cáncer de cuello uterino desde una perspectiva clínica práctica (Ruiz *et al.*, 2008; Segovia y Mendoza 2009; Cañadas *et al.*, 2006). Es por esto que existe la necesidad de emplear marcadores más sensibles y específicos que mejoren los programas de tamizaje de cáncer cervical (Serrano *et al.*, 2006; Consuegra *et al.*, 2004).

El uso de las técnicas de biología molecular disponibles actualmente, ha permitido la detección, genotipaje y evaluación de la carga viral de VPH a partir de muestras clínicas, aun si la infección es asintomática, favoreciendo la intervención oportuna en aquellas mujeres con alto riesgo de desarrollar cáncer cervical (Gravitt *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2008; Geraets *et al.*, 2011). Los modelos más recientes de carcinogénesis sugieren que la detección del ADN viral por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es uno de los métodos más sensibles y específicos para la detección del VPH, reduciendo de esta manera los falsos negativos obtenidos con las técnicas convencionales (Reigosa *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2005; Cañadas *et al.*, 2006). Una de las técnicas basadas en la PCR más recientemente utilizadas para genotipificar el VPH es el *Reverse Line Blot* (RLB). Esta técnica utiliza los iniciadores denominados GP5+/GP6+, los cuales amplifican la región L1 de 37 tipos del VPH que habitualmente infectan el tracto anogenital (Brebí *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2010).

En este contexto, en la presente investigación se realizó un análisis de asociación entre marcadores moleculares y poblacionales en la infección por VPH en mujeres del Municipio de Pasto, con el fin de obtener información acerca de la prevalencia de la infección viral, los genotipos circundantes y la influencia de otros factores poblacionales que podrían permitir un mejor entendimiento de la dinámica viral en la historia natural de la infección por VPH en la población de estudio. Para ello se realizó la detección y tipificación del VPH mediante la técnica *Reverse line blot* - GP5+/GP6+, en conjunto con la citología cervicouterina convencional y con la información poblacional recolectada de las pacientes incluidas en el estudio.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar la asociación entre marcadores moleculares y poblacionales en la infección por VPH, en mujeres sisbenizadas de los estratos 1, 2 y 3 del Municipio de Pasto.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar y tipificar VPH a partir de muestras de cepillado cervical mediante *Reverse line blot* - GP5+/GP6+.
- Analizar los resultados de la detección molecular de VPH con los resultados de la citología cervicouterina.
- Determinar la asociación entre la presencia de VPH con la edad y algunas características clínicas y ginecoobstétricas para explicar la infección por VPH.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO (VPH)

El Género Papillomavirus, integrado en la Familia Papillomaviridae, es un grupo de virus conocido desde la antigüedad y descrito por primera vez en los años 30. Los papilomavirus son virus pequeños y sin envoltura; las partículas virales tienen un diámetro de 52 a 55 nm y un coeficiente de sedimentación de 300 S. La cápside viral es icosaédrica y está organizada en 72 capsómeros. Cada uno de estos capsómeros está constituido por dos proteínas estructurales, ambas codificadas por el virus, que se unen y estabilizan la cápside mediante puentes disulfuro. La proteína mayor L1, que tiene un peso molecular de 55 Kd, representa el 80% del total de la cápside, cada capsómero presenta 5 copias idénticas. La proteína menor L2, que está en menor proporción que L1 tiene un peso molecular de aproximadamente de 75 Kd. Su genoma está formado por diez regiones codificadoras o de transcripción (ORF), que se designan tempranas E1-E8 y tardías L1-L2, y una no codificadora (NCR o URR), ver figura 1 (Suárez *et al.*, 2006; Arteaga, 2007; Chang *et al.*, 2010; García J. *et al.*, 2010).

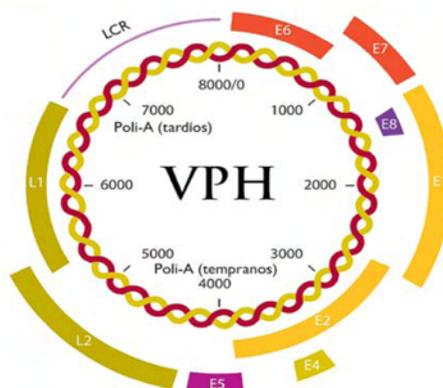


Figura 1. Organización del genoma del VPH.
Fuente: López y Lizano, 2006

Los genes de expresión temprana son expresados en las células no diferenciadas de la epidermis. A partir de un promotor temprano (PE) se generan las proteínas virales tempranas: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que son proteínas no estructurales, relacionadas con el control de la replicación, la transcripción y la expresión genética del virus. Su expresión está estrechamente regulada tanto por factores celulares específicos de tejido, como por las propias proteínas virales. Los papilomavirus son muy específicos de las especies que infectan y tienen un tropismo muy definido por las células del tejido epitelial estratificado queratinizado. Las primeras capas proporcionan un reservorio celular para las capas superiores pero también un perfecto espacio para la propagación viral (Montoya, 2001; Arteaga, 2007; Chuang *et al.*, 2008).

El papel oncogénico del papilomavirus humano (VPH) fue sugerido por primera vez a principios del año 1976 y el primer VPH genital fue identificado en 1978. En el año 1981, se detectó la presencia de ADN de VPH en neoplasias siendo descrita la capacidad de las proteínas virales E6 y E7 de VPH 16, para immortalizar y transformar queratinocitos humanos en el año 1989. De esta manera, reconocer su importancia

médica y la mejora de las herramientas para el análisis de papilomavirus ayudaron a que resurgiera el interés por su estudio (Consuegra *et al.*, 2004; Arteaga, 2007).

Estos virus son difíciles de cultivar rutinariamente en el laboratorio. Las pruebas serológicas experimentales no han demostrado ser lo suficientemente sensibles y específicas como sistemas de detección para uso clínico. La mayoría de los estudios básicos y clínicos han empleado una o más de las tres pruebas basadas en la homología de los ácidos nucleicos, permitiendo tanto la detección como el establecimiento del genotipo particular de VPH. Estos tres análisis son: hibridación *in situ* (HIS), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el sistema del híbrido de captura (SHC) (Cavazza y Correti 2004).

2.2 TIPOS DE VIRUS PAPILOMA HUMANO

La infección por el virus papiloma humano (VPH) es el principal factor etiológico de lesiones intraepiteliales y cáncer cervicouterino (CCU). Según la frecuencia de su asociación con cáncer y lesiones preneoplásicas, los distintos genotipos virales de VPH son clasificados en bajo y alto riesgo (BR y AR) oncogénico. Los tipos virales de AR se encuentran en 90% de los carcinomas y lesiones preneoplásicas de alto grado. Los tipos de VPH de BR generalmente están asociados con lesiones benignas o con muy bajo potencial de malignidad (Muñoz *et al.*, 2003; Brebi *et al.*, 2009).

El grupo de los tipos de alto riesgo está constituido por el VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 70, 73, 82 y el de los de bajo riesgo el VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81. Los tipos 26, 53 y 66 deben considerarse probables carcinógenos (Marat, 2006; Suárez *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2003). Las infecciones por tipos de alto riesgo siguen predominantemente un curso silente, tienden a establecer infecciones persistentes y generan alteraciones citológicas características englobadas mayoritariamente en el grupo de Neoplasia Cervical Grado 3 (NIC 2/3) o lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LIEAG) y cáncer cervical. En una proporción menor, las infecciones por VPH de bajo riesgo pueden inducir lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (NIC 1, LIEAG) (Montoya, 2001; Melo *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2010).

Existe otra clasificación de los VPH, desde el punto de vista filogenético, establecido con base en las secuencias de nucleótidos del genoma. Esta última, permite la clasificación de nuevos tipos de VPH, aun cuando no pueda establecerse con claridad su clasificación epidemiológica, ya que está siempre supeditada a estudios clínicos con un elevado número de muestras (ver tabla 1) (Muñoz *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2011).

Tabla 1. Clasificación de los tipos de VPH según datos obtenidos mediante estudios filogenéticos y epidemiológicos.

		Epidemiológica	
		Alto riesgo	Bajo riesgo
Filogenética	Alto riesgo	16, 18, 26, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 82	70
	Bajo riesgo	73	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP608

Fuente: Muñoz *et al.*, 2003

Teniendo en cuenta lo anterior el criterio de clasificación de los VPH, se basa en la secuencia nucleotídica del gen viral L1 que codifica para la proteína principal de la cápside y es una región altamente conservada; así, se establece un nuevo tipo viral cuando éste difiere en más de un 10% con la L1 de los tipos conocidos; un subtipo si esta divergencia oscila entre 2 y 10% y una variante intratípica cuando la divergencia es menor al 2% (Picconi *et al.*, 2000).

2.3 HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER CERVICAL

El cáncer cervicouterino (CCU) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en mujeres en todo el mundo con un rango de incidencia de 2.6 a 67.2 por 100.000 mujeres. La incidencia y la tasa de mortalidad estimada en América Latina y la región Caribe se encuentran entre las más altas en el mundo, con un rango 29.2 casos por 100.000 mujeres (Roa *et al.*, 2009; Correnti *et al.*, 2011). En Colombia la incidencia ajustada por edad de cáncer cervicouterino es de 36.4 por 100.000 habitantes y la tasa de mortalidad ajustada por edad es de 18.2 por 100.000 habitantes (INC 2007). En el Departamento de Nariño, de acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología para el periodo 2002 – 2006, la incidencia estimada es de 26.4 por 100.000 habitantes y la tasa de mortalidad de 10.9 por 100.000 habitantes. En el municipio de Pasto, según el Registro Poblacional de Cáncer (RPC), la incidencia de cáncer de cuello uterino es de 27,39 por 100.000 habitantes y de neoplasia in situ es de 30,30 por 100.000 habitantes.

El CCU, al igual que muchos otros cánceres, se desarrolla como resultado de múltiples alteraciones genéticas, epigenéticas e inmunológicas. Este se desarrolla principalmente en la zona de transformación del cuello uterino, que corresponde a la unión entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso del ectocervix, constituyendo un sitio de continuos cambios metaplásicos, los cuales son más activos en la pubertad y durante el primer embarazo y declinan después de la menopausia. El CCU puede clasificarse en dos tipos dependiendo del epitelio cervical afectado: el tipo escamoso o epidermoide que es el más frecuente y se encuentra en 90% de los casos y el adenocarcinoma (ACC), que afecta al epitelio glandular del cérvix y corresponde aproximadamente a 10% de los CCU (Brebí *et al.*, 2009).

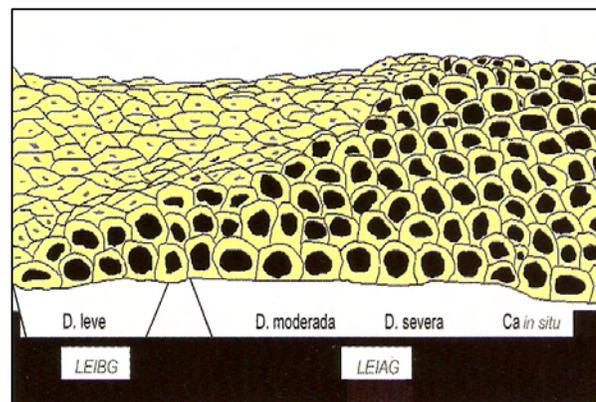


Figura 2. Representación de las lesiones intraepiteliales
Fuente: Alonso *et al.*, 2005

Previo al desarrollo del cáncer cervical pueden presentarse lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado. Las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG), también conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales grado 1 (NIC 1), corresponden a anomalías menores en las células, caracterizadas por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio. Las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG), se conocen como NIC II, cuando la displasia implica los dos tercios del epitelio inferior o NIC 3 si las anomalías nucleares afectan a más de dos tercios de todo el espesor del epitelio, ver figuras 2 y 3 (Reigosa *et al.*, 2004; López y Lizano 2006; Sarduy, 2008; Sideri *et al.*, 2011).

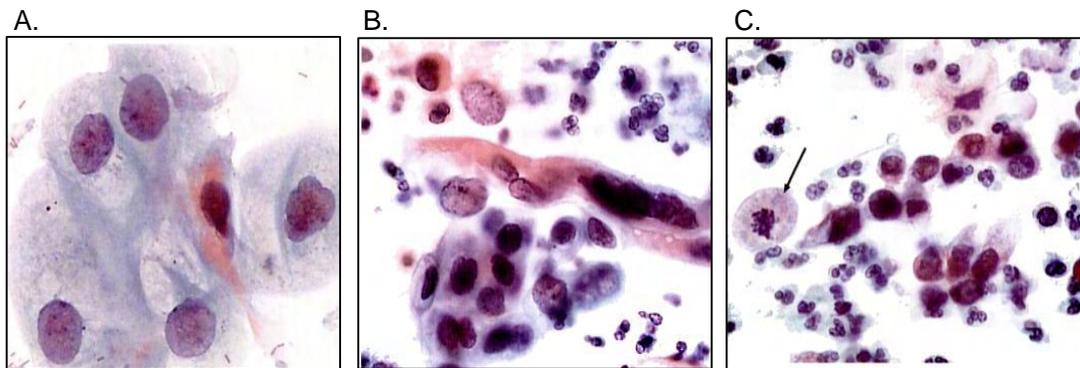


Figura 3. A. Lesión de bajo grado, displasia leve. Células con núcleos grandes e irregulares y citoplasma abundante. B. Lesión de alto grado: células dispuestas en grupos sincitiales, con núcleos irregulares e hiper cromáticos, en un fondo sin diátesis tumoral. C. Carcinoma *in situ* distribuido en células aisladas: escaso citoplasma, anomalías nucleares y presencia de mitosis atípicas (flechas). Fuente: Alonso *et al.*, 2005

De acuerdo con la historia natural de la oncogénesis de cuello uterino, el VPH es el principal factor etiológico de este tipo de cáncer y sus lesiones precursoras. Muchos principios moleculares de la transformación por VPH han sido bien estudiados, principalmente las múltiples funciones de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales incluyen la inhibición de las funciones normales de los genes supresores de tumores p53 and pRB. Sin embargo los mecanismos que determinan si la infección por VPH permanece latente o progresa a lesiones escamosas intraepiteliales o carcinoma de cérvix, aún no están totalmente claros (Arias *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011). En el proceso de la oncogénesis viral se cree que el paso fundamental es la integración del genoma del VPH al genoma del hospedero, debido a que con esta integración se interrumpe el ciclo de vida del virus y se rompe la continuidad del gen E2, seguida por la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7. Incapaces de producir más virus, los genes de VPH llevan a la célula a un estado proliferativo descontrolado, permanente y progresivo en ausencia de p53, lo que en conjunto puede producir y mantener alteraciones en genes celulares que desembocan en la formación de un tumor. De esta forma, el establecimiento del cáncer cervical es el resultado de varios eventos secuenciales, no necesariamente forzados, que inician con la infección por VPH y prevalecen con la expresión constitutiva de E6 y E7. Es posible que la inhibición de la expresión de E6 y E7 o la supresión de sus interacciones físicas con proteínas celulares podría bloquear su potencial transformante convirtiéndose así en blancos

potenciales para el desarrollo de terapias contra cáncer cervical (Marat, 2006; Turán *et al.*, 2007).

Los tipos de VPH 16 y 18 son los más comúnmente asociados con el cáncer cervical y causan el 70% de todos los cánceres de cuello uterino invasivo (CCI), los tipos VPH 52, 31, 33 y 45 representan el 30% de los casos de cáncer de cuello de útero. VPH 45 es el tercer tipo más frecuente después de VPH 16 y 18 y se asocia generalmente con adenocarcinoma (ADC) (Chang *et al.*, 2010; Correnti *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2011).

Además de la infección por VPH, numerosos mecanismos han sido sugeridos para explicar la relación entre el riesgo de desarrollar cáncer cervical y los diversos elementos asociados con las relaciones sexuales, entre ellos la edad del comienzo de las relaciones sexuales y la transmisión de agentes infecciosos (*Trichomonas*, *Gardnerella Herpes* y *Virus tipo II* (HSV-2)). De igual manera, las alteraciones genéticas, las hormonas endógenas femeninas, el estado inmunológico y factores ambientales pueden sumándose unos a otros, aumentar el efecto aislado de cada uno, incrementando la probabilidad de desarrollar la enfermedad (Molano *et al.*, 2002; Cruz y Bosques 2005).

No obstante el CCU, se trata de una patología altamente curable si se detecta a tiempo. Las lesiones preneoplásicas, son detectables mediante métodos de tamizaje, como la citología cervicouterina o por medio de la detección de agentes asociados al desarrollo de estas lesiones precancerosas como el Virus del Papiloma Humano (VPH) (García *et al.*, 2010).

Con respecto a las estrategias de prevención actualmente se están empleando en el ámbito mundial dos herramientas que podrían mejorar la capacidad de predecir y prevenir la aparición de lesiones malignas. En primera instancia, la implementación de técnicas moleculares para la detección de la infección por VPH y el desarrollo de vacunas recombinantes contra el virus. Se quiere entonces que el conocimiento previo del tipo de virus permita en conjunto con las demás pruebas (colposcopia y Papanicolaou) por un lado, prevenir el desarrollo de un futuro cáncer *in situ* o invasor y que el conocimiento de los factores coadyuvantes nos indique hacia dónde apuntar en materia educacional. Por otro lado, determinar las características epidemiológicas que ayuden a identificar los principales tipos de VPH que se encuentren en nuestra población, para de esta manera, trabajar en la búsqueda de vacunas que permitan prevenir la aparición o la colonización de tipos de virus de alto riesgo que eventualmente puedan ocasionar cáncer de cérvix (Consuegra *et al.*, 2004).

2.4 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VPH

La historia natural de la infección por VPH está relacionada tanto con la expresión viral, como con otros factores del hospedero que favorecen el establecimiento del virus y su prevalencia. En cuanto a la población afectada, se ha identificado que los grupos sociales con mayor prevalencia de infección por VPH corresponden a personas que practican la prostitución, reclusos asociados al consumo de drogas e individuos infectados por el VIH. Igualmente se ha identificado que la prevalencia de VPH está asociada a la edad, típicamente es más alta en las edades inmediatas al inicio de las

relaciones sexuales y responden al patrón de comportamiento sexual de la comunidad (Gillison y Shah 2003; Turan *et al.*, 2007; Hoory *et al.*, 2008).

Por otra parte, las características de la infección por VPH están también relacionadas con el tipo viral. El grupo de VPH asociados a alto riesgo neoplásico tienden a establecer infecciones persistentes y a progresar con mayor frecuencia que los tipos de riesgo bajo (Arteaga, 2007).

Se cree que el virus entra al organismo a través de pequeños cortes o abrasiones de la piel o las mucosas. El virus debe llegar a la capa basal del epitelio o a células de metaplasia escamosa inmadura. Dependiendo de una variedad de factores, que aún no son muy claros, la infección puede permanecer latente o volverse productiva (Herrera y Restrepo 2003; Martel y Franceschi 2009).

De acuerdo al tiempo en que los genes virales se expresan, son designados como *tempranos* o *tardíos*. Los genes *tempranos* (E1, E2, E4, E5, E6, E7) son regulatorios no estructurales y están relacionados con el control de la replicación del ADN viral y la expresión genética del virus. Los genes *tardíos* (L1 y L2) se expresan en las fases finales de la infección y codifican proteínas estructurales relacionadas con el ensamblaje de las partículas virales (proteínas de la cápside). La transcripción de estos genes parece estar mediada por reguladores celulares de la transcripción, producidos sólo cuando la célula escamosa se diferencia (célula intermedia y superficial), lo que explica su baja concentración en lesiones intraepiteliales de alto grado o en carcinomas invasivos (Doorbar, 2005; Álvarez, 2006; López y Aristizábal 2006; Thierry, 2009).

Los mecanismos de transformación son complejos y al parecer varían de un virus a otro. El principio general consiste en que dos o más proteínas tempranas cooperan para dar un fenotipo transformado. En la mayoría de VPHs la proteína E2 se une a la región del promotor temprano y regula la expresión de E6/E7; la pérdida de E2 es por lo tanto el primer paso en la transformación y es lo que ocurre cuando sucede la integración viral, al romperse el punto de transcripción de los genes E1 y/o E2, lo que resulta en una sobreexpresión de los genes E6/E7 (Álvarez, 2006; Hoory *et al.*, 2008). Los genes E6 y E7 representan los principales genes transformadores del VPH, ver figura 4. En algunas lesiones VPH-positivas la proteína E6 al perder su regulación se une al p53 formando un complejo trimérico junto con la proteína-asociada-E6 y lo degrada por la vía de la ubiquitina. Al reducir la efectividad de p53 como regulador del ciclo celular, las células pueden pasar a la fase S del ciclo con daños cromosomales que pueden ser reproducidos en esta fase. E7 se une al p107, a la ciclina A y al pRb, que regula la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S e inhabilita su función normal, perdiendo así un factor regulador importante en la proliferación celular y estimulando la producción de la maquinaria replicativa de la célula en la ausencia de una progresión normal de G1 a S. Este fenómeno es diferente según el tipo de virus que haya infectado la célula: en general los productos de E6/E7 de cepas de alto riesgo se unen a estas proteínas celulares de manera más eficiente que las de cepas de bajo riesgo (Melo *et al.*, 2005; Hoory *et al.*, 2008; Martel y Franceschi 2009; Ding *et al.*, 2010).

Todo lo anterior va a influenciar finalmente la evolución de la infección al immortalizar las células epiteliales llevándolas a una inestabilidad genética que les permite adquirir

una acumulación gradual de cambios celulares específicos, requeridos para la tumorigénesis y que van a reflejar el largo período de tiempo que se describe entre el inicio de la infección y la aparición de lesiones invasivas del cérvix (Álvarez, 2006; Rivera *et al.*, 2006; Hoory *et al.*, 2008).

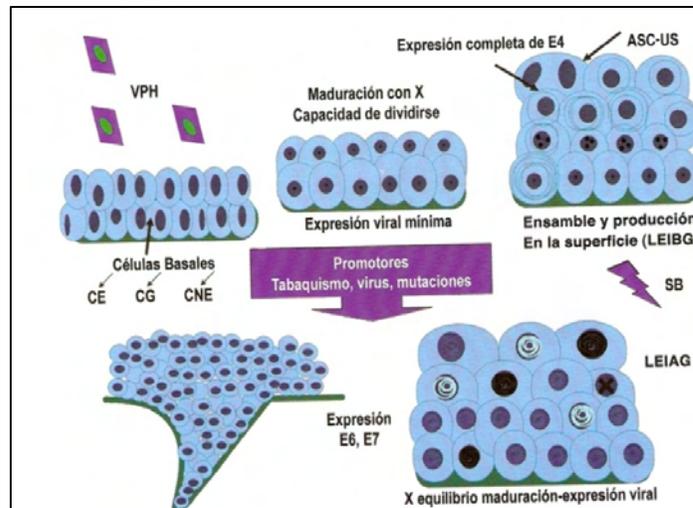


Figura 4. Diferentes formas de expresión de los genes del VPH en el epitelio escamoso humano y su correlación con la morfología. VPH virus del papiloma humano, CE células escamosas, CG, células glandulares, CNE células neuroendocrinas, SB Sistema Bethesda, LEIBG lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, LEIAG lesión intraepitelial escamosa de alto grado, ASCUS células escamosa de significado indeterminado, E6/E7 regiones codificantes. Fuente: Alonso *et al.*, 2005

2.5 LESIONES ASOCIADAS CON EL VPH Y DESARROLLO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO

Las infecciones con cepas de VPH de alto y bajo riesgo ocurren principalmente en mujeres jóvenes (entre 15 y 25 años) y aproximadamente el 80% de éstas son transitorias, sólo un porcentaje menor evoluciona hasta lesión intraepitelial. La progresión de la infección cervical está influenciada por el tipo de VPH que la cause: lesiones cervicales asociadas con VPH de bajo riesgo (6,11) siguen casi siempre un curso benigno y generalmente producen una lesión plana y con menos frecuencia una lesión exofítica (condiloma acuminado) con la morfología típica de la coilocitosis (Rivera *et al.*, 2006; Schelover *et al.*, 2006; Castellsagué, 2008; Hoory *et al.*, 2008).

Las cepas de alto riesgo (16 y 18) están fuertemente relacionadas con lesiones de alto grado; al parecer el tiempo durante el cual este tipo de infección se manifiesta como una lesión de bajo grado es muy corto. Se ha encontrado que los pacientes en los que las lesiones progresan a lesión intraepitelial de alto grado (>85%) contienen VPH tipo 16. Además, al encontrar VPH tipo 16 o 18 en epitelio escamoso citológicamente normal, le da a la paciente un riesgo variable pero muy alto, aproximadamente 100 veces mayor, de desarrollar lesiones intraepiteliales de alto grado. Se han visto porcentajes de progresión de hasta 51% en lesiones intraepiteliales de bajo grado

asociadas a VPH de alto riesgo (Herrera y Restrepo 2003; Roberts *et al.*, 2006; Turan *et al.*, 2007; Hausen, 2009).

En general, el tiempo de evolución desde la aparición de una lesión detectable hasta un carcinoma invasivo preclínico es de 12-13 años en promedio, por lo tanto la progresión de la lesión intraepitelial al cáncer es lenta; pero, en algunos casos se desarrolla una lesión invasiva sin evidencia de una lesión precursora (Hoory *et al.*, 2008).

Sin embargo, no todas las pacientes con infección por cepas de alto riesgo y lesiones intraepiteliales de alto grado desarrollan cáncer. Se han encontrado porcentajes de regresión de 33- 43% en estas pacientes y en las mujeres que presentan infección con cepas de bajo riesgo se encontraron porcentajes de regresión entre 25 y 65%. Así, las lesiones asociadas con tipos de VPH de bajo riesgo pueden persistir pero muy rara vez progresarán a carcinoma invasivo, mientras que una mayor proporción de lesiones asociadas a cepas de alto riesgo persistirán o progresarán a cáncer, aunque esto no sólo depende de la acción viral sino de la edad y el estado inmune de la paciente, de otros factores desconocidos y de eventos genéticos adicionales cuyo riesgo de ocurrencia incrementa en función del grado de la lesión (Herrera y Restrepo 2003; Hoory *et al.*, 2008).

2.6 FACTORES DE RIESGO IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN A CÁNCER

Es evidente que aunque la infección por VPH con los tipos de alto riesgo es necesaria para la carcinogénesis cervical, no es suficiente, pues existen otros factores que conllevan a la progresión de cáncer de cuello de útero, relacionados con el hospedero y el medio ambiente en el que este se desarrolla. Se ha encontrado que factores tales como el embarazo, la paridad elevada, edad de inicio de relaciones sexuales, comportamiento sexual, infección bacteriana, infecciones víricas, estímulos hormonales, predisposición individual, estado inmunológico, higiene, alteración del pH local, uso prolongado de anticonceptivos orales, el tabaquismo y mala nutrición pueden estar asociados de forma independiente con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de cuello uterino. Aun no es claro, como algunos de estos factores inciden en el desarrollo de tumores malignos, se considera que posiblemente, incrementan el riesgo de establecimiento de la infección genital, disminuyen la inmunidad local o sistémica, estimulan el crecimiento de tejido infectado con el VPH o inducen mutaciones en el tejido infectado (Castellsagué y Muñoz, 2003; Cruz y Bosques 2005; López y Aristizábal 2006; Segovia y Mendoza 2009).

En el embarazo, se han reportado recurrencias frecuentes de condilomas, con incremento en su tamaño, multifocalidad y regresión espontánea luego del parto. En estos casos existe un gran riesgo de transmisión vertical al recién nacido y desarrollo de papilomatosis laríngea. En algunos estudios comparativos entre fumadores y no fumadores, se encontró que en el cuello uterino de las primeras presentaban niveles más altos de una sustancia cancerígena que en los no fumadores. Algunos estudios también revelan la predisposición genética en el riesgo de cáncer de cuello uterino, y aunque no en todos los estudios se ha encontrado resultados positivos, parece que alelos específicos de ciertos genes de respuesta inmune están asociados con la protección de la susceptibilidad a la infección con el VPH. De esta manera el estado inmune tiene un impacto significativo sobre la capacidad de detectar la infección o sobre la progresión de la infección por el VPH, encontrándose una incidencia 17 veces

mayor de infección genital por el virus en pacientes inmunosuprimidos. En el caso de mujeres VIH-positivas, varios estudios han encontrado una prevalencia mayor de infecciones por VPH en estas pacientes comparadas con mujeres seronegativas, con cifras que oscilan entre 57 y 73% contra 13-43% respectivamente. El factor de riesgo relacionado con el número de compañeros sexuales, ha disminuido su incidencia, teniendo en cuenta que el uso del condón ha contribuido como una medida preventiva para infecciones de transmisión sexual (Carrero *et al.*, 2008; Hoory *et al.*, 2008; Sarduy, 2008; Martel y Franceschi 2009; Sarid *et al.*, 2011).

2.7 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE LESIONES PRECANCEROSAS Y CÁNCER CERVICOUTERINO CONVENCIONALES Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR

En la actualidad se dispone de tecnologías de tamizaje, que pueden clasificarse de acuerdo con el enfoque morfológico o molecular, cuyo propósito es reconocer las anomalías citológicas o tisulares y marcadores moleculares, consistentes con un NIC o cáncer cervicouterino. Entre las tecnologías más relevantes se encuentran: la citología de PAP, citología de base líquida Thin-layer, citología automatizada, inspección visual con ácido acético (IVA), prueba de VPH para el tamizaje, Captura de híbridos y técnicas moleculares basadas en la hibridación de sondas para la tipificación del VPH (Alonso *et al.*, 2005)

En Colombia, la detección de signos morfológicos por infección de VPH y el tamizaje de lesiones precancerosas y de cáncer de cuello uterino, se realiza mediante la citología cérvicouterina, introducida hace más de medio siglo por George Papanicolaou. A pesar de todas las ventajas de la citología, su evaluación está basada en parámetros subjetivos, lo que genera una proporción importante de falsos positivos y falsos negativos en aproximadamente un 20-30% de los frotis examinados, atribuidos a lecturas incorrectas y a errores en la toma de la muestra (Melo *et al.*, 2005; Farfán, 2009)

Técnicas como la citología en fase líquida, han mejorado los resultados del tamizaje, pero la interpretación de los cambios celulares y el diagnóstico aún se basan en criterios morfológicos clásicos y no existe hasta el momento un progreso significativo en la identificación objetiva de células displásicas. Además, las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y las lesiones intraepiteliales de alto grado (LEIAG), en la mayoría de los casos regresan espontáneamente y sólo en aproximadamente el 1% de las LEIBG y un 10% de las LEIAG persisten y progresan a cáncer. Por esta razón existe la necesidad de encontrar marcadores más sensibles y específicos que mejoren los programas de tamizaje de cáncer cervical (Serrano *et al.*, 2006).

Dado que la citología de cuello uterino no es diagnóstica, se requiere de la evaluación histológica para establecer un diagnóstico definitivo de las lesiones preneoplásicas o neoplásicas, los métodos empleados corresponden a la biopsia y la colposcopia. Para determinar un diagnóstico definitivo y dirigir el tratamiento pertinente se debe tener en cuenta una adecuada correlación entre la citología, las biopsias y la colposcopia (Mogollón, 2004, Segovia y Mendoza 2009).

Las técnicas convencionales tienen la desventaja de que no permiten la detección y tipificación directa del VPH, considerado como el principal agente etiológico del cáncer

de cuello uterino. Es por ello, que dada la importancia de la infección por VPH se ha propuesto la detección viral en los programas de cribado de cáncer cervical en algunos países y es una técnica aprobada recientemente por la Organización Mundial de la Salud - OMS para la tamización primaria de esta enfermedad (Melo *et al.*, 2005; Cañadas *et al.*, 2006). En este sentido, la citología puede ser complementada con métodos moleculares para detectar el VPH de alto riesgo, dichos métodos se han constituido como una herramienta de clasificación importante, mostrando una sensibilidad y valor predictivo negativo de cerca del 100% para los grados de neoplasia cervical intraepitelial vaginal 2-3 (NIC2 y NIC3) respectivamente, permitiendo un mejor diagnóstico y seguimiento de los procesos malignos asociados a este virus (Ruiz *et al.*, 2008; Del Pino *et al.*, 2011; Geraets *et al.*, 2011).

Con el fin de detectar y tipificar el VPH se han desarrollado diferentes técnicas moleculares altamente sensibles y específicas, sin embargo, hasta el momento no se dispone de una técnica *Gold estándar* que permita obtener óptimos resultados para todos los tipos de VPH existentes y por tanto son frecuentes ciertas variaciones entre los reportes de las diferentes investigaciones (Molano *et al.*, 2010).

Actualmente se han descrito muchos ensayos comerciales para la detección de VPH, entre los cuales se destacan: *Southern blot*, hibridación *Dot Blot*, secuenciación y enzimoimmunoensayo, captura de híbridos ((Hybrid capture 2 (Quiagen)), *Reverse line blot* (RLB), enzimas de restricción (PCR-RLFP) y PCR en tiempo real (Brebí *et al.*, 2009). También están disponibles una serie de pruebas clínicamente validadas como PCR-EIA GP5+ /6, PapilloCheck (Greiner Bio-One) y no-clínicas validadas, tales como la prueba de AMPLICOR VPH (Amplicor, Roche), la SPF10-DEIA (Labo Biomedical Products), la prueba de VPH Cervista (Hologic) y una amplia gama de ensayos, como INNO-LiPA HPV Genotyping (Innogenetics), SPF10 HPV LiPA (Labo Biomedical Products) y Luminex® xMAP®, algunos de los cuales serán descritos brevemente más adelante (Geraets *et al.*, 2011).

En ese sentido, se destaca la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como el método más sensible para la detección y tipificación del VPH. Se han descrito diferentes protocolos con iniciadores consenso dirigidos a los genes L1 y E6/E7, que permiten tanto la detección de VPH, como la tipificación de un gran número de genotipos virales prevalentes en el tracto anogenital (Coutlée *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008).

A continuación se presentan algunas de las técnicas utilizadas en la detección y tipificación del VPH:

- Captura de híbridos: La prueba de Captura de híbridos 2 (HC2) (QIAGEN, Gaithersburg, EE.UU.) es un método aprobado por la FDA y se encuentra disponible en el mercado. HC2 utiliza la amplificación de la señal quimioluminiscente de la hibridación del ADN con un coctel de sondas, para la detección simultánea de 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) (Geraetsb *et al.*, 2009; Farfán, 2009). Para la detección de displasia moderada o alta, la sensibilidad es del 85% al 90% y una especificidad del 70% al 75%. Esta prueba proporciona información acerca de la presencia de algún tipo de VPH de alto riesgo, pero no específica a qué tipo de VPH corresponde (Del Pino *et al.*, 2011).

- Cuantificación de la expresión intracelular ARNm E6/E7: La detección intracelular de ARNm de los dominios E6/E7 del genoma del VPH es un nuevo método, en cuanto a pruebas de detección VPH. La integración de estos oncogenes en el ADN del hospedero es un evento molecular significativo, previo al desarrollo de la displasia. Por tanto, en comparación con otros métodos, esta prueba muestra una mayor especificidad para la detección de displasias en poblaciones normales (Reynolds, 2011).

- Inmunocitoquímica para p16/Ki67: La inmunocitoquímica de un panel combinado p16 (CINtec Laboratorios MTM, Heidelberg, Alemania), sirve como biomarcador sustituto para la infectividad del VPH en la neoplasia cervical. La proteína P16, juega un papel en el mecanismo de regulación del ciclo celular. Esta se asocia con el retinoblastoma mediando el control del ciclo celular y su aumento en las células infectadas por VPH de alto riesgo (Reynolds, 2011).

- Ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Cobas 4800 es un sistema de detección de VPH basado en una PCR (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA), este sistema ha sido recientemente validado por Stoler y colaboradores. Esta prueba utiliza la PCR para detectar un pool de 14 serotipos de ADN de VPH de alto riesgo al tiempo, con sondas específicas para VPH 16 y 18 (Reynolds, 2011).

- Reverse Line Blot (RLB): Es un ensayo basado en hibridización reversa, que permite la identificación de 37 genotipos de VPH utilizando un sistema miniblatter y una membrana de hibridización, previa amplificación de las muestras por PCR GP5+/GP6+. RLB es un ensayo no radioactivo y la membrana puede ser lavada y reutilizada hasta 15 veces sin pérdida de señal (Van de Brule *et al.*, 2002). Además, RLB es una técnica, eficiente, eficaz y económica, mucho más sensible y específica que las técnicas realizadas mediante enzimas de restricción y *dot-blot* y puede emplearse en el campo investigativo, tanto en estudios de corte transversal como estudios de cohorte (Brebí *et al.*, 2009; Farfán, 2009).

- Genotipificación mediante Luminex® xMAP®: Esta técnica descrita recientemente, tiene un principio similar al RLB, con la diferencia que los iniciadores han sido mejorados y se han incluido 8 iniciadores sentido adicionales y 2 antisentido, denominados BSGP5+/BIO-BSGP6+, de igual manera, un juego de iniciadores para globina denominados MS3/MS10. Esto con el propósito de detectar 11 tipos virales más que RLB, 48 tipos virales en total. La detección mediante Luminex® xMAP®, es una técnica basada en arreglos con perlas, altamente automatizada y sensible, que permite evitar errores en la interpretación de resultados (García *et al.*, 2010).

Recientemente han sido aprobadas por la FDA, pruebas como Cervista VPH HR, que detecta 14 tipos de VPH de alto riesgo y Cervista HPV 16/18, que genotipifica VPH 16 y 18 (Reynolds, 2011).

MATERIALES Y METODOS

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRAS

Se incorporaron al estudio mujeres en edad reproductiva entre los 18 y 60 años de edad activas y no activas sexualmente, sisbenizadas y carnetizadas de los estratos 1, 2 y 3, a las cuales se les tomó una muestra de cepillado cervical de acuerdo a la norma técnica vigente.

3.1.1 Sitios de muestreo

De las 23 IPS pertenecientes a Pasto-Salud ESE, se seleccionaron 7 al azar, distribuidas en cuatro zonas: occidente, sur, oriente y norte de acuerdo con la división del municipio considerada por Pasto – Salud ESE, ver figura 5. El periodo de muestreo estuvo comprendido entre los meses de noviembre de 2010 y febrero de 2011.

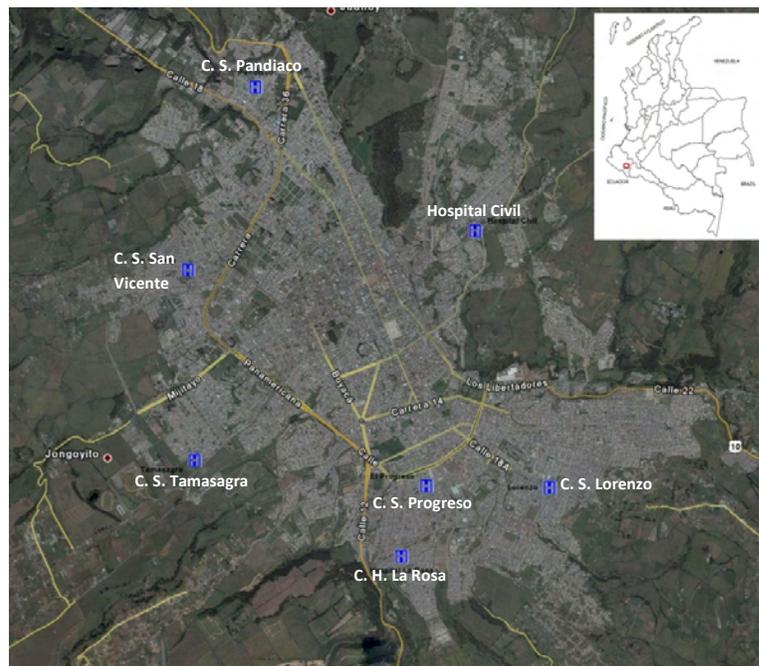


Figura 5. Mapa del municipio de Pasto con los sitios de muestreo.

Fuente: Google Earth

3.1.2 Criterios de inclusión

Mujeres de 18-60 años de edad, que acudieron a la toma de citología durante el periodo de muestreo y que aceptaron de forma voluntaria participar en el estudio a través de la firma de un consentimiento informado.

3.1.3 Criterios de exclusión

Mujeres no sisbenizadas, de régimen contributivo, histerectomizadas y con carcinoma cervical.

3.1.4 Consideraciones éticas

En el desarrollo de esta investigación se tuvieron en cuenta los aspectos éticos y legales de la investigación en seres humanos, como se estipula en la Resolución N^o 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia.

Las mujeres incluidas en el estudio, aceptaron participar de forma voluntaria a través de la firma de un consentimiento informado, ver anexo A. El consentimiento informado fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Nariño y en el consta que las pacientes recibieron la información correspondiente y que se resolvieron todas las inquietudes existentes. Así mismo, se les realizó la anamnesis a través de formularios debidamente validados, ver anexo B.

3.1.5 Tamaño de la muestra

El marco de muestreo se obtuvo teniendo en cuenta el nivel de cobertura de citologías para el municipio de Pasto en los años 2008-2009, según información suministrada por la Empresa Social del Estado seccional Pasto (Pasto – Salud ESE). Se calculó un tamaño de muestra al 95% de confianza con el 5% de error de 616 mujeres de esa población y para efectos del presente trabajo, se tomó al azar un 25% de ese tamaño de muestra, correspondiente a 160 mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión. La población restante, será analizada en un estudio posterior.

3.1.6 Variables poblacionales contempladas en el estudio

- Clínicas: Resultado citológico
- Demográficas: Edad
- Variables de laboratorio: Detección y tipificación molecular de VPH

3.2 CAPACITACIÓN DE PERSONAL PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Para la ejecución de esta investigación, fue necesario realizar una capacitación sobre los objetivos del estudio, la recolección de la información poblacional, la firma de los consentimientos informados, la codificación de las muestras, la localización anatómica para la toma de la muestra de cepillado endocervical, el manejo y transporte de las mismas. La capacitación fue dirigida al personal de Pasto Salud ESE, principalmente a los directores operativos de las redes norte, oriente, sur y occidente y a las enfermeras jefes del Programa de detección temprana de cáncer de cérvix, quienes fueron las responsables de la toma de citologías en los diferentes puntos de muestreo seleccionados para nuestro estudio. La capacitación estuvo orientada por un médico y un ginecólogo pertenecientes a Pasto Salud ESE.

3.3 TOMA DE MUESTRAS Y TRANSPORTE

Para la recolección de muestras se contó con la colaboración de personal debidamente capacitado, perteneciente a la Empresa Social del Estado – Pasto Salud ESE, fueron ellos los encargados de realizar el registro, la recolección de información (anamnesis), la firma del consentimiento informado, la toma de muestras y la valoración clínica e interpretación de las citologías de las pacientes incluidas en el estudio.

A aquellas mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión, se les tomó una muestra de cepillado cervical mediante procedimientos estándar. A partir de esta muestra se cumplió con dos propósitos, el primero obtener el extendido para la lectura

de la citología y el remanente de la muestra de cepillado cervical se resuspendió inmediatamente en 750µl de buffer fosfato salino 1X y timerosal al 0.05% para la tipificación molecular de VPH.

Una vez tomadas las muestras, fueron transportadas al laboratorio de Medicina de la Universidad de Nariño, para su almacenamiento a 4°C. Posteriormente, estas muestras se transportaron en frío, al laboratorio de farmacogenética del Cáncer del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, donde se realizó el análisis de calidad de ADN mediante amplificación por PCR del gen de globina, la detección y tipificación del VPH mediante *Reverse Line Blot* (RLB).

3.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.4.1 Muestras para Citologías

Con la muestra de cepillado cervical se realizó un extendido en placa de vidrio para su posterior coloración y lectura de citología cérvicouterina convencional. La lectura y clasificación de la citología fue realizada por un patólogo especialista asignado por Pasto Salud ESE, según el sistema Bethesda 2001 en uno de cinco grupos: negativo para neoplasia (NPN), células escamosas atípicas de significancia no determinada (ASCUS), Lesiones intraepiteliales de Bajo Grado LIEBG, lesiones intraepiteliales de alto grado LIEAG y cáncer de cuello uterino (Solomon *et al.*, 2002). La responsabilidad de los resultados de las citologías, estuvo a cargo del personal de Pasto Salud ESE.

3.4.2 Muestras para análisis molecular

Tanto la lisis celular como la detección directa mediante PCR del gen de β -Globina y la tipificación molecular de VPH mediante la técnica de *Reverse Line Blot* de las 160 muestras de cepillado cervical (UDN1-UDN160) se realizaron en el laboratorio de Farmacogenética del Cáncer del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Para los análisis de biología molecular, todos los procedimientos se desarrollaron a partir de un lisado celular. Para realizar la lisis, las células cervicales remanentes en el cepillado cervical, previamente resuspendidas en buffer fosfato salino y timerosal, se homogenizaron y se llevaron a 90°C en plancha de calentamiento durante 10 minutos. Seguidamente las muestras se llevaron primero a 4°C y luego a -20°C, donde permanecieron almacenadas hasta su uso.

3.4.3 Manejo de información

Con la información de los registros de muestreo, la información poblacional recolectada y los resultados de citología suministrados por Pasto Salud ESE, se elaboraron las bases de datos de las pacientes incluidas en el estudio en formato Excel®. En las bases de datos se almacenó la información de las variables de análisis, tales como edad, clínicas, ginecoobstétricas, resultados de citología, resultados de la calidad del ADN mediante amplificación del gen de β -globina, resultados de tipificación de VPH por RLB y codificación.

3.5 DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH

Previo a la realización de la reacción de amplificación de interés, con el fin de confirmar la calidad del ADN de las muestras recolectadas, se realizó la amplificación de un fragmento del gen de β -globina. Posteriormente a todas las muestras positivas

para este gen, se les realizó una reacción de PCR, utilizando los iniciadores GP5+/Bio-GP6+ y a partir de los productos amplificados se llevó a cabo una hibridación en fase sólida y revelado no radiactivo mediante la técnica *Reverse line blot*. A continuación se describe la metodología desarrollada:

3.5.1 Análisis de calidad del ADN mediante amplificación por PCR del gen de α -globina

El gen de α -globina es constitutivo de toda célula eucariota, es un marcador que permite verificar presencia o ausencia de ADN e inhibidores en lisados celulares (Aguayo *et al.*, 2002). Con el fin de confirmar la calidad del ADN, a partir de la suspensión celular de las muestras del remanente de cepillado cervical, se realizó la amplificación de un fragmento de 110 pb del gen constitutivo de α -globina (HHB), con los iniciadores PCO3/PCO4, ver tabla 2 (García *et al.*, 2010).

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores PCO3/PCO4.

Iniciador	Secuencia (5'--3')	Fragmento amplificado
PCO3 (sentido)	ACACAACCTGTGTTCACTAGC	110 pb
PCO4 (antisentido)	CAACTTCATCCACCTTCACC	

La selección de estos iniciadores se realizó teniendo en cuenta los reportes de Saiki *et al.*, 1985 y García *et al.*, 2010, además de una confirmación bioinformática de la región de anillamiento de los iniciadores y el gen de la α -globina en humanos, ver figura 6:



Figura 6. Anillamiento de los iniciadores PCO3 Y PCO4 en el gen de α -globina en humanos (Posición 13 ntA a 123 ntG). Fuente: Esta investigación

3.5.1.1 Reacción de amplificación del gen de α -globina: Las condiciones de reacción así como las condiciones de amplificación utilizadas en la PCR para α -globina se desarrollaron de acuerdo con la metodología descrita por García *et al.*, 2010, ver tabla 3. La preparación de la mezcla de reacción se realizó bajo óptimas condiciones de asepsia y bioseguridad.

Tabla 3. Mezcla de reacción para la PCR HHB con los iniciadores PCO3 – PCO4

Reactivo	Volumen μ l
Lisado celular	5
Buffer(1X)	2.5
dNTPs(200 μ M)	0.75
MgCl ₂ (3.5 mM)	3
Primer PCO3 (1 μ M)	0.75
Primer PCO4 (1 μ M)	0.75

Taq polimerasa (1.25 U)	0.3
Agua Ultra pura	12
Volumen de reacción final	25

Programación del termociclador: Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador My Cyclor™ (Biorad®) bajo el siguiente ciclo de amplificación: un paso de denaturación a 94°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada ciclo incluía un paso de denaturación a 94°C durante 30 segundos, un paso de anillamiento a 52°C por 30 segundos y un paso de elongación a 72°C durante 1 minuto. La extensión final a 72°C fue prolongada por 4 minutos.

3.5.1.2 Verificación de PCR/ β -Globina

Los productos de amplificación fueron verificados en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante Syber safe (1 μ l/ml), el cual se intercala entre las bases del ADN, formando complejos fluorescentes que permiten la visualización de las bandas de ADN. La corrida electroforética se llevó a cabo en el equipo Biorad® Power PAC 3000, con buffer TBE 1X, durante una hora a 80V, 50A y 100mA. La visualización del gel se realizó con luz UV en un fotodigitalizador de geles con el software Quantity One de Biorad® (García *et al.*, 2010).

3.5.1.3 Interpretación de resultados

Las muestras se consideraron positivas para el gen de β -Globina cuando se observó una banda del tamaño esperado, compatible con el marcador de peso molecular GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (10-300bp) y el resultado de la muestra fue interpretado como negativo en ausencia de banda de tamaño esperado. Para garantizar la calidad en la lectura de resultados y la ausencia de contaminación se utilizó como blanco agua destilada estéril.

3.5.2 Amplificación GP5+/Bio-GP6+ de VPH a partir de muestras positivas para el gen de β -globina

A partir de la suspensión celular de las muestras positivas para el gen de β -globina (HHB), se realizó la amplificación de un fragmento de aproximadamente 150 pb de la región L1 del VPH utilizando los iniciadores GP5+ y GP6+ marcado con biotina (Van Den Brule *et al.*, 2002). Las secuencias de los iniciadores utilizados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de los iniciadores GP5+ / GP6+.

Iniciador	Secuencia (5'--3')	Fragmento amplificado
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTA	150 pb
GP6+	GAAAAATAAAGTAAATCATA	

Este juego de iniciadores se empleó teniendo en cuenta varias publicaciones en las cuales son reportados, como: Gravitt *et al.*, 2000; Van den Brule *et al.*, 2002; Molano *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003; Geraets *et al.*, 2009; Arias *et al.*, 2010; García *et al.*, 2010. Además se realizó una confirmación bioinformática de la región de anillamiento de los iniciadores en el genoma de diferentes tipos de VPH y un alineamiento con la herramienta Megablast del NCBI. En la figura 7 se presenta el sitio de anillamiento de los iniciadores GP5+ y GP6+ en el genoma del Virus del Papiloma humano tipo 18.



Figura 7. Sitio de anillamiento de iniciadores GP5+ Y GP6+ en el genoma del VPH tipo 18.
 Fuente: Esta investigación.

Reacción de amplificación GP5+/6+: Las condiciones de reacción así como las condiciones de amplificación utilizadas en la PCR GP5+/6+ se desarrollaron de acuerdo con la metodología descrita por García *et al.*, 2010. La preparación de la mezcla de reacción se realizó en óptimas condiciones de asepsia y bioseguridad. La concentración y volumen de los componentes de la reacción de amplificación se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la PCR GP5+/6+

Reactivo	Volumen μ l
Lisado celular	5
Buffer (1X)	2.5
dNTPs(200 μ M)	0.5
MgCl ₂ (1.5 μ M)	1.5
Iniciador GP5+ (1 μ M)	0.125
Iniciador bio-GP6+ (1 μ M)	0.125
Taq polimerasa (1.25 U)	0.4
Agua ultra pura	14.85
Volumen de reacción final	25

Programación del termociclador: Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador My Cycler™ (Biorad®) bajo el siguiente ciclo de amplificación: un paso de denaturación a 94°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada ciclo incluía un paso de denaturación a 94°C durante 1 minuto, un paso de anillamiento a 40°C por 2 minutos y un paso de elongación a 72°C durante 30 segundos. La extensión final a 72°C fue prolongada por 4 minutos.

3.5.3 Hibridación mediante *Reverse Line Blot (RLB)* de los productos de PCR GP5+/Bio-GP6+

Para la detección y tipificación del Virus del Papiloma Humano en los productos de PCR GP5+/Bio-GP6+ obtenidos previamente, se utilizó la técnica de *Reverse Line Blot (RLB)*, siguiendo la metodología descrita por Van den Brule *et al.*, 2002. Este método está basado en un ensayo de hibridación reversa, usando un sistema Minibloter® 45 de Immunetics®, en el que se unen covalentemente oligosondas que presentan grupos amino a una membrana que presenta grupos carboxilo, las oligosondas acopladas permiten detectar 37 tipos virales de VPH. La secuencia de las oligosondas tipo específicas del VPH se muestran en la tabla 6. A continuación se describen los pasos a seguir en la hibridación mediante *Reverse Line Blot (RLB)*:

Tabla 6. Oligosondas tipo específicas de VPH usadas en la tipificación por RLB de los productos de PCR GP5+/Bio-GP6+

Tipo VPH	Secuencia	Tipo VPH	Secuencia
6	TCCGTAACATCATCTTCCA	55	TCAGTCTCCATCTACAACAT
11	TCTGTGTCTAAATCTGCTAC	56	CAGAACAGTTAAGTAAATATG
16	CATTATGTGCTGCCATATC	57	CCACAGAACTAATTATAAAG
18	TGCTTCTACACAGTCTCCT	58	TATGCACTGAAGTAACTAAG
26	GTACATTATCTGCAGCATC	59	TCTACTACTGCTTCTATTCC
31	GCAATTGCAAACAGTGATAC	61	CCCCCCTGTATCTGAAT
33	TGCACACAAGTAACTAGTGA	66	AGCTAAAAGCACATTAATACTAA
34	TTTTAGTTTGTGTAGGTACA	68	CTGAATCAGCTGTACCAAT
35	CTGCTGTGCTTCTAGTGA	70	GAAACGGCCATACCTGCT
39	ATAGAGTCTTCCATACCTTC	72	AGCGTCTCTGTATCAGAA
40	AGTCCCCCACACCAACC	73	ACAGGCTAGTAGCTCTACT
42	TGGTGATACATATACAGCTG	82/MM4	ACTGCTGTTACTCAATCTG
43	TCTACTGACCCTACTGTG	83 (MM7)	TACACAGGCTAATGAATACA
44	TACTAGTGAACAATATAAGCA	84 (MM8)	TGCTACCAACACCGAATCA
45	TAATTTAACATTATGTGCCTC	82/IS39	TGCTACTCCATCAGTTGC
51	TGCTGCGGTTTCCCAA	CP6108	CTTCCCAGTCTGCCACA
52	GAATACCTTCGTCATGGC	71 (CP8061)	TGCTACCAAAAAGTGTGAG
53	TGTCTACATATAATTCAAAGC	81 (CP8304)	GCTACATCTGCTGCTGC
54	CACGCAGGATAGCTTTAAT		

Fuente: Van den Brule *et al.*, 2002

3.5.3.1 Activación de membrana: Con el fin de que las oligosondas tipo específicas del VPH se unieran covalentemente a la membrana de nylon Biodyne C, cargada negativamente, fue necesario su activación usando 16% (p/v) de EDAC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; Sigma, St.Louis, Mo.]. Posteriormente, la membrana se colocó en un sistema miniblatter (MN 45; Immunetics) y se depositaron en líneas paralelas las 37 oligosondas descritas en la tabla 6, después de un minuto de incubación, los canales del miniblatter se aspiraron y la membrana se inactivó usando 100 mM NaOH, seguido por un lavado con SSPE 2x (SSPE 1X 0.18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ Y 1 mM EDTA [pH 7.7]) suplementado con SDS 0.1%.

3.5.3.2 Hibridación de las oligosondas y los productos de PCR GP5+/Bio-GP6+: Para llevar a cabo la hibridación, se procedió a diluir 10µl de los productos obtenidos en la PCR GP5+/Bio-GP6+ en 140µl de la solución de hibridación SSPE 2x (1x SSPE contiene 0.18M NaCl, 10mM NaH₂PO₄ y 1mM EDTA pH 7.4) y 0.1% SDS, esta muestra fue denaturada a 99°C y seguidamente pipeteada en cada canal del miniblatter de forma perpendicular a las líneas de las oligosondas previamente activadas en la membrana. Como control positivo de RLB se utilizó una mezcla de los productos de PCR de los plásmidos de VPH 16 y VPH 18 (pertenecientes al grupo de farmacogenética del Cáncer de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá). La hibridación se realizó a 42°C durante 1 hora en el horno de hibridación Roller-Bloth Hybridiser HB-3D® Techne®.

3.5.3.3 Incubación y lavados de la membrana: Una vez hibridados los productos de PCR con las oligosondas, se realizaron dos lavados a la membrana con SSPE 2X 0.5% SDS a 52°C para eliminar cualquier pegado inespecífico. Posteriormente, para detectar las señales de la hibridación, se incubó la membrana por 45 minutos a 42°C, con el conjugado estreptavidina peroxidasa (Roche®)(dilución 1:4000), el cual se une a

todos aquellos sitios donde haya biotina y por tanto donde se haya producido la hibridación. Seguidamente se realizaron dos lavados en SSPE 2X 0.5% SDS por 10 minutos a 42°C en el tubo de hibridación Schott® y dos lavados en SSPE 2X por 5 minutos a temperatura ambiente en cubetas de plástico.

3.5.3.4 Revelado y/o detección: La detección de la hibridación entre las muestras denaturadas y las oligosondas, se realizó con el kit ECL™ líquido (GE® Healthcare UK, Amersham™), basado en el marcaje con peroxidasa y la detección por quimioluminiscencia, para ello la membrana fue incubada durante 2 minutos con 10 ml de ECL. Seguidamente la membrana se colocó sobre una película de autoradiografía (Amersham Hyperfilm™ ECL™) en un cassette toda la noche. Después de transcurrido el tiempo de exposición adecuado, la película se reveló en el equipo Medical Film Procesador modelo SRX-100 A Konica Minolta Medical y Graphic, Inc. Todo el proceso de revelado se realizó en cuarto oscuro.

3.5.3.5 Reutilización de la membrana (*Stripping*): Para el uso repetido de la membrana, se realizaron dos lavados en SDS 1% a 50°C por 30 min, seguido por una incubación en 20mM EDTA a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se almacenó en 100 ml de EDTA 20mM a 4°C hasta su posterior uso.

3.5.3.6 Interpretación de Resultados: Una muestra se consideró positiva para un tipo determinado de VPH, cuando se observó en la película, un punto de hibridación definido (*Spot*) entre las sondas para cada tipo viral y el producto de PCR y una muestra se consideró positiva para una infección múltiple por VPH, cuando se observó en la película dos o más puntos de hibridación, ver figura 8.

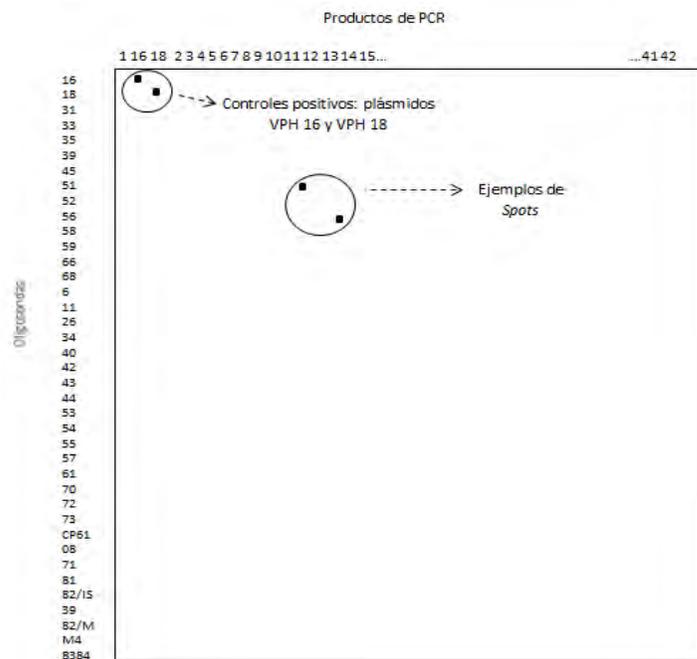


Figura 8. Representación de una autorradiografía de la genotipificación de VPH, mediante Reverse line blot. En la figura se observan en forma horizontal, los productos de PCR y en

forma vertical las sondas oligonuclótidas complementarias a cada tipo viral. Donde se interceptan las sondas con un tipo viral se genera una hibridación evidenciada con un *spot*.

Fuente: Esta investigación

3.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó una base de datos en el programa Microsoft Excel® edición 2010, con la información de cada una de las pacientes incluidas en el estudio. Los datos registrados fueron recolectados a partir de la anamnesis, formatos de resultados de citología, amplificación del gen de -Globina y detección y tipificación de VPH mediante RLB.

3.6.1 Análisis descriptivo. La unidad de análisis la constituyó cada una de las mujeres ingresadas al estudio. El procesamiento de la información de la edad, variables clínicas, variables ginecoobstétricas, clasificación general del estudio citológico y los resultados de detección y tipificación de VPH, se realizó mediante un análisis descriptivo, univariado, construyendo tablas de distribución de frecuencias y porcentajes.

3.6.2 Análisis de concordancia entre los resultados de citología y la detección molecular de VPH. Se realizó un análisis de concordancia con el índice Kappa usando el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows, entre el número de muestras positivas y negativas para anormalidad en las células epiteliales obtenidas en la citología y el número de muestras positivas y negativas para VPH detectadas por RLB.

3.6.3 Análisis de los resultados de la detección molecular de VPH y las variables poblacionales contempladas en el estudio. Para determinar la asociación entre la presencia de VPH y variables como la edad, cambios celulares reactivos asociados, infección por otros microorganismos, paridad y uso de anticonceptivos, se realizó un análisis bivariado con el estadístico Chi – cuadrado (X^2) en el programa SPSS 15.0 para Windows, con un nivel de confianza del 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

Se incorporaron al estudio 160 mujeres que acudieron a la toma de citología en 7 IPS del Municipio de Pasto, a las cuales se les tomó una muestra de cepillado cervical de acuerdo a la norma técnica vigente. En cada IPS se tomó entre 39 y 41 muestras, como se indica en la tabla 7.

Tabla 7. Número de muestras tomadas en cada IPS (Pasto-Salud ESE)

Zona	Sitio de muestreo	Nº de muestras
Occidente	Centro de Salud San Vicente	31
	Centro de Salud Tamasagra	8
Sur	Centro de Salud Lorenzo	39
Oriente	Centro Hospitalario La Rosa	39
	Centro de Salud El Progreso	2
Norte	Hospital Civil	32
	Centro de Salud Pandiaco	9
Total muestras tomadas		160

Fuente: Esta investigación

A partir de la información consignada en el formato de ingreso de las pacientes, realizamos el análisis descriptivo de edad, citología previa, uso de anticonceptivos y número de embarazos, encontrando los siguientes resultados:

4.1.1 Edad

La edad de las mujeres incluidas en el estudio estuvo entre 18 y 60 años, para su análisis las mujeres se distribuyeron en cinco grupos de edad, encontrando una frecuencia por edad más alta en el rango de 18 - 27 años y una baja frecuencia en el rango 58 años, como se muestra en la tabla 8. Estos resultados se relacionan con los datos proporcionados por Pasto Salud ESE, con respecto a la toma de citología por edad en las 23 IPS correspondientes al municipio de Pasto, en los que se observa que las mujeres entre los 20 y 39 años asisten con mayor frecuencia al examen citológico y esta frecuencia disminuye con la edad. Esta tendencia también ha sido reportada en estudios previos en los que se relaciona la cobertura de la citología en Colombia y algunos factores sociodemográficos, en los que se ha encontrado que las mujeres jóvenes en edad reproductiva, tienen mayor probabilidad de realizarse la citología cervicouterina con respecto a mujeres mayores (Piñeros *et al.*, 2007; Figueroa, 2011).

Tabla 8. Edad de la población de estudio

Edad (años)	Frecuencia	Porcentaje (%)
18 – 27	49	30,6
28 – 37	48	30,0
38 – 47	41	25,6
48 – 57	19	11,9
58	3	1,9

Fuente: Esta investigación

4.1.2 Paridad

Respecto a la paridad, el 13.1% de las mujeres en estudio eran nulíparas y el 86.9% ha estado por lo menos una vez en embarazo, de este porcentaje el 53.8% tienen 1 y 2 gestas y el 33.1% 3 o más gestas, como se presenta en la tabla 9. Estas cifras están dentro de lo reportado para el departamento de Nariño según la Encuesta Nacional de Demografía y Salud – ENDS 2010, que indica que las mujeres nariñenses tienen entre 2 y 3 hijos. Además ENDS 2010, muestra que la tasa de fecundidad deseada es de 1 a 2 hijos y que cuatro de cada ocho mujeres que tienen dos hijos vivos ya no quieren tener más y/o se han realizado la ligadura de trompas. De acuerdo con la Norma Técnica para la atención en planificación familiar a hombres y mujeres, Colombia ha logrado un descenso rápido de su fecundidad, posiblemente debido a la rápida urbanización, el aumento de la escolaridad y el mayor uso de los métodos anticonceptivos por parte de la comunidad.

4.1.3 Uso de Anticonceptivos

Con relación al uso de anticonceptivos, el 56.9% de las pacientes planifican y los métodos más empleados son el dispositivo intrauterino - DIU, los anovulatorios y la ligadura de trompas o Pomeroy, ver tabla 9. La encuesta Nacional de Demografía y Salud 2010 establece que el 61% de las mujeres colombianas entre 15 y 49 años usa algún método anticonceptivo y este porcentaje se incrementa a 84% en las mujeres nariñenses casadas o que viven en unión libre. De los métodos encontrados en este estudio el más frecuente fue la ligadura de trompas, el cual se consolida como el primer método de planificación familiar con un 25% entre todas las mujeres y 39% entre mujeres nariñenses casadas o en unión libre (ENDS 2010). La decisión de utilizar un método anticonceptivo está relacionada con la facilidad de comprarlo o de que sea suministrado por las entidades de salud, además la elección del método está asociada con la edad, de manera que las mujeres adolescentes y nulíparas prefieren métodos flexibles como las píldoras o los inyectables, las mujeres jóvenes con un hijo, prefieren usar el dispositivo intrauterino o implantes, en tanto que las mujeres maduras y/o multíparas generalmente utilizan métodos permanentes (Gómez y Pardo, 2010).

4.1.4 Citología previa

De las 160 mujeres en estudio, el 73.1% se habían realizado el examen citológico previamente, el 25.6% asistían por primera vez a la toma de citología y el 1,2% No sabe - no responde, ver tabla 9. Estos resultados son similares a los reportados por Piñeros *et al* en 2007, en los que obtuvo que el 75.8% de las mujeres nariñenses entre 25 y 69 años de edad se han realizado una citología en los últimos tres años. Sin embargo, aunque el porcentaje de cobertura de la citología se ha incrementado en los últimos años, la información proporcionada en el Plan Nacional para el control de cáncer en Colombia 2010-2019, indica que en nuestro país la relación entre la cobertura de citología y mortalidad por cáncer de cuello uterino no ha sido la esperada, sugiriendo dificultades en la calidad y seguimiento del examen citológico, diagnóstico definitivo y tratamiento oportuno de lesiones cervicales precancerosas y cáncer (Ministerio de la Protección Social, 2010).

Tabla 9. Características ginecoobstétricas de la población de estudio.

Característica	Frecuencia	Porcentaje (%)
Gestas		
Ninguno	21	13.1
1 – 2	86	53.8
3	53	33.1
Uso de anticonceptivos		
Diu	15	9,4
Anovulatorios	19	11,9
Pomeroy	46	28.8
Otro	10	6.2
Ninguno	60	37,5
No sabe/no responde	10	6,2
Citología previa		
Si	14	8,8
Si – Normal	79	49,4
Si – Infección	13	8.1
Si – inflamación	11	6.9
No	41	25,6
No sabe/no responde	2	1,2

Fuente: Esta investigación

4.2 Resultados de la citología cervicouterina

A partir de la información consignada en el formato de resultados de la citología de las pacientes incluidas, realizamos el análisis descriptivo de la clasificación general citológica, aspectos de cérvix, cambios reactivos asociados e infección por otros microorganismos. Los resultados encontrados se presentan a continuación:

En la evaluación de la calidad de las muestras, se obtuvo que el 100% de las placas fueron satisfactorias para ser procesadas y examinadas en el examen citológico. En el 86.9% de las muestras se observó la zona de transformación o células endocervicales, 13.75% presentaron fondo hemorrágico leve y 0.6% extendido grueso. De acuerdo con el Sistema Bethesda la calidad de la muestra indica si estas tienen la cantidad suficiente de material exocervical y endocervical para la lectura (Solomon *et al* 2002).

Es de gran relevancia tener en cuenta esta información debido a que la mayoría de falsos negativos e inconsistencias obtenidas en la citología se deben a errores en la toma de la muestra, aun en laboratorios con rigurosos controles de calidad (Molijn *et al.*, 2005; Serrano *et al* 2006).

4.2.1 Clasificación general del estudio citológico

De las 160 pacientes, 4 de ellas presentaron anormalidad en las células epiteliales (2.5%) y 156 presentaron diagnóstico negativo para lesión intraepitelial o normalidad

celular (97.5%). En la tabla 10, se presentan los resultados de la lectura e interpretación de la citología para células escamosas.

Tabla 10. Resultado citológico de las pacientes incluidas en el estudio

Resultado	Frecuencia	Porcentaje (%)
NIC 1	2	1,2
ASC-US	2	1,2
Negativa para lesión intraepitelial	156	97,6
Total	160	

Fuente: Esta investigación

De las 4 pacientes con anomalía en las células epiteliales, dos (1.2%) presentaron células escamosas atípicas de significado indeterminado - ASCUS. Esta cifra es menor a la reportada por Dane *et al.*, en 2009, que indica que los ASCUS son detectados en el 5-10% de las mujeres que asisten al tamizaje de la citología. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el diagnóstico de ASCUS no está bien estandarizado y varía sustancialmente en los estudios publicados debido a la considerable variación intra e inter-observador en su definición (Farfán *et al.*, 2010). En los ASCUS se observan anomalías celulares más marcadas que las atribuibles a cambios reactivos, pero que cuantitativa o cualitativamente no llegaron a un diagnóstico definitivo de lesión escamosa intraepitelial (Solomon *et al.*, 2002). Algunos de los casos en los que se presenta este diagnóstico se deben a la lectura de extendidos citológicos gruesos, en los cuales las células no pueden ser evaluadas correctamente, también puede tratarse de la presencia de células maduras intermedias, metaplasia atípica o muestras de mujeres postmenopáusicas. Así mismo algunos cambios morfológicos catalogados como ASCUS pueden observarse cuando en la infección por VPH el proceso de integración y expresión de los oncogenes virales es incompleta y las células provenientes de la superficie tienen un crecimiento nuclear menos trascendente (Alonso *et al.*, 2005). En general, el diagnóstico de ASCUS es el más controvertido dentro de la clasificación del Sistema Bethesda (TBS) para reporte citopatológico, ya que incluye lesiones de difícil caracterización y con escasa especificidad.

Para tener claridad con respecto a los aspectos morfológicos y realizar un correcto manejo clínico de las pacientes con este diagnóstico, es necesario realizar estudios complementarios que permitan definir la razón de los cambios celulares diagnosticados, ya que, aunque en algunos casos puede tratarse de lesiones insignificantes o de alteraciones relacionadas con infecciones sencillas, en otros puede estar involucrado con el desarrollo de lesiones escamosas intraepiteliales (Wensveen *et al.*, 2003). Uno de los estudios complementarios que podría emplearse y ha sido aceptado como alternativa para el seguimiento de ASCUS por la American Society for Cervical and Colposcopy, es la detección y tipificación de ADN del VPH, que permite definir la presencia del virus y si es de alto o bajo riesgo oncogénico, contribuyendo a minimizar los falsos negativos de la citología (Lang *et al.*, 2005; Castellsagué *et al.*, 2008; Reynolds, 2011).

Por otra parte, las otras dos pacientes (1.2%) con anomalía en las células epiteliales, presentaron Neoplasia intraepitelial cervical grado 1 – NIC I, también llamada Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado - LIEBG. Esta cifra es menor a la

reportada en estudios previos como el de Serrano *et al.*, en 2006 que encontró en 68/281 (24.2%) mujeres en estudio LIEBG y García *et al.*, en 2010 que encontró que 56 pacientes (35%) tenían NIC I. Estas diferencias posiblemente se deban a variaciones propias de la población de estudio incluida en cada investigación. El diagnóstico histopatológico de NIC I se caracteriza por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio; estas formas celulares se diferencian y maduran, mostrando anormalidades menores de la célula (López y Lizano 2006; Sarduy, 2008). Generalmente las lesiones intraepiteliales de bajo grado son manifestaciones transitorias de la infección por VPH y en algunos casos pueden curarse espontáneamente sin tratamiento alguno (Solomon *et al* 2002; Cavazza y Correnti 2004).

De acuerdo con los resultados de la citología, en ninguna de las pacientes se encontró diagnóstico de NIC 2, NIC 3 o cáncer cervical.

4.2.2 Aspectos del cérvix

Este parámetro se midió a través de la observación directa del cuello uterino en el momento de la toma de la citología, encontrándose que 51.9% de las mujeres presentaron cérvix anormal, 46.9% un cérvix sano y en el 1.9% no se notificó el resultado. En las mujeres en las que se observó anormalidad, es posible que el resultado se relacione con cambios de aspecto asociados con la coloración localizada, irritación de la superficie del cuello uterino, la presencia de lesiones ulceradas relacionadas con infecciones de transmisión sexual, la presencia de verrugas o condilomas causadas por el VPH o la presencia de secreciones coloreadas, sanguinolentas o purulentas. La gravedad de las lesiones observadas es considerada por el personal responsable de realizar el examen físico durante la toma de la muestra para la citología, quien informa si es necesario remitir a las pacientes de inmediato al ginecólogo sin esperar los resultados del examen (Alonso *et al.*, 2005; López y Aristizábal 2006).

4.2.3 Cambios celulares reactivos.

Se encontraron cambios reactivos asociados a inflamación leve en el 59.4% de las muestras, inflamación moderada en el 30.6% e inflamación severa en 3.1% de las muestras. La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico frente al daño o lesión tisular producida por agentes físicos, químicos o biológicos, en el examen citológico se valora de acuerdo con la cantidad de leucocitos polimorfonucleares presentes en la placa y le corresponde al citopatólogo que lee la placa determinar la gravedad de la inflamación. Con respecto al alto porcentaje de inflamaciones leves obtenido, se debe tener en cuenta que cierto grado de inflamación en la citología es normal y es reportado con frecuencia en los resultados de este examen. Las principales causas de la inflamación en el cuello uterino son: el parto, la irritación debida a un dispositivo intrauterino, la obtención previa de biopsias, criocirugía, termocauterio, asas diatérmicas y rayo láser. La detección de inflamaciones también puede asociarse con infecciones del tracto genital inferior por *C. trachomatis*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, virus *Herpes simplex* o vaginosis bacteriana, así mismo, en una gran proporción de pacientes, se ha encontrado que uno de los factores de riesgo asociados a la presencia de procesos inflamatorios, corresponde a lesiones intraepiteliales causadas por la infección con el VPH. Además en algunas

mujeres en etapa de la menopausia, se pueden presentar cuadros inflamatorios asociados con la atrofia del epitelio genital, debido a la ausencia parcial o total del estímulo estrogénico y a que el epitelio se adelgaza y es más vulnerable a todo tipo de infecciones. En algunos casos los cambios morfológicos de las células atróficas, se presentan con cambios nucleares y de coloración citoplasmática, en los que la cromatina y algunos detritos pueden mostrar una apariencia de núcleos grandes anormales, que pueden confundirse con lesiones neoplásicas (Duarte *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005).

De acuerdo con el sistema Bethesda dentro de los cambios celulares reactivos asociados a la inflamación también se incluyen los cambios de reparación típica, que corresponde al proceso en el cual hay regeneración del tejido lesionado después de una inflamación, en la que puede ocurrir la destrucción y pérdida tisular tanto del epitelio como del estroma del cérvix. La morfología de la regeneración tisular no es muy clara, por ello es de gran relevancia establecer los criterios morfológicos que se incluyen dentro de esta categoría, para evitar diagnósticos erróneos que conlleven a resultados falsos positivos/negativos de una lesión de mayor significado (Alonso *et al.*, 2005; López y Aristizábal 2006).

4.2.4 Infección por otros microorganismos

En los resultados de la citología se identificó la presencia de infección por microorganismos en un 28.8% de las pacientes, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 11. La aparición de estas infecciones cérvico-vaginales se debe a la presencia de microorganismos exógenos que generalmente provienen de la piel, de la vejiga urinaria, del recto y del ano, o que se transmiten por contagio venéreo. Respecto a estos resultados es necesario tener en cuenta que la citología si bien permite identificar morfológicamente algunos de los microorganismos causantes de infecciones cérvico - vaginales, no constituye un método ideal para su detección y estudio, para ello se deben emplear procedimientos microbiológicos como los cultivos especiales, detección de ADN e inmunofluorescencia, con los cuales se puede realizar un análisis más preciso de estas infecciones (Alonso *et al.*, 2005).

No obstante a partir de los resultados obtenidos cabe resaltar que la infección por flora sugestiva de vaginosis bacteriana fue la más frecuente, encontrada en el 15% de las mujeres en estudio, este tipo de infección es causada por una variedad de microorganismos entre los que se encuentran *Mobiluncus sp.*, *Micoplasma hominis* y *Gardnerella*, entre otros y es considerada como una de las afecciones más comunes que afecta a aproximadamente el 30% de las mujeres. En la mayoría de los casos, la vaginosis bacteriana no ocasiona complicaciones, pero puede incrementar la susceptibilidad de las mujeres a contraer infecciones más graves (Nyirjesy, 2008). El bacilo de Doderlein se observó en el 40.6% de las mujeres, sin embargo no se tuvo en cuenta dentro de los microorganismos causantes de infecciones cervico-vaginales, debido a que es uno de los principales constituyentes de la microbiota normal de esta área, en la que contribuye a mantener el equilibrio y mejorar la depuración biológica. Si llega a ocurrir la disminución o el incremento de bacilos de Doderlein, podría ocurrir una alteración en el ecosistema vaginal y el posible desarrollo de infecciones (Sánchez *et al.*, 2008).

Tabla 11. Características clínicas de la población de estudio.

Característica	Frecuencia	Porcentaje (%)
Aspectos de Cérvix		
Sano	75	46,9
Anormal	82	51,2
No Sabe	3	1,9
Cambios celulares reactivos asociados a inflamación		
Leve	95	59,4
Moderada	49	30,6
Severa	5	3,1
No sabe	11	6,9
Infección por otros organismos		
<i>Trichomonas vaginalis</i>	2	1,3
Consistente con <i>Cándida ssp.</i>	4	2,5
Flora sugestiva de vaginosis bacteriana	24	15,0
Bacterias compatibles con <i>Actinomicetos ssp.</i>	1	0,6
Cambios celulares consistentes con virus Herpes simple	2	1,3
Consistente con <i>Candida spp.</i> , bacilo de Doderlein	1	0,6
Vaginosis bacteriana, <i>Actinomicetos spp.</i>	1	0,6
Otros microorganismos	11	6,9
Bacilo de Doderlein (Flora normal)	65	40,6
Sanas	49	30,6

Fuente: Esta investigación

4.3 Resultados de detección y tipificación de VPH

4.3.1 Análisis de calidad del ADN mediante amplificación del gen de β -globina

De las 160 muestras en las que se evaluó la calidad del ADN, 149 resultaron positivas para el gen de la β -globina y fueron consideradas adecuadas para análisis de VPH, en tanto que las 11 muestras restantes no revelaron una banda clara y bien definida en el gel de agarosa para el gen de β -globina y no fueron incluidas en la amplificación por GP5+/6+ y tipificación por RLB. La exclusión que se debió hacer de las 11 muestras para el análisis por RLB, puede deberse a la presencia de ADN degradado o no amplificable en estos lisados celulares, indicando que no presentaban una calidad adecuada para continuar con el análisis molecular, por otro lado la ausencia de banda para el gen de β -globina también pudo estar relacionada con una cantidad muy baja de ADN en las muestras, teniendo en cuenta que la sensibilidad determinada para esta PCR visualizada con electroforesis en geles de agarosa es de aproximadamente 390 picogramos (Brebi *et al.*, 2009; García *et al.*, 2011). En la figura 9 se presenta un gel de agarosa en el que se observó la amplificación del gen de β -globina.

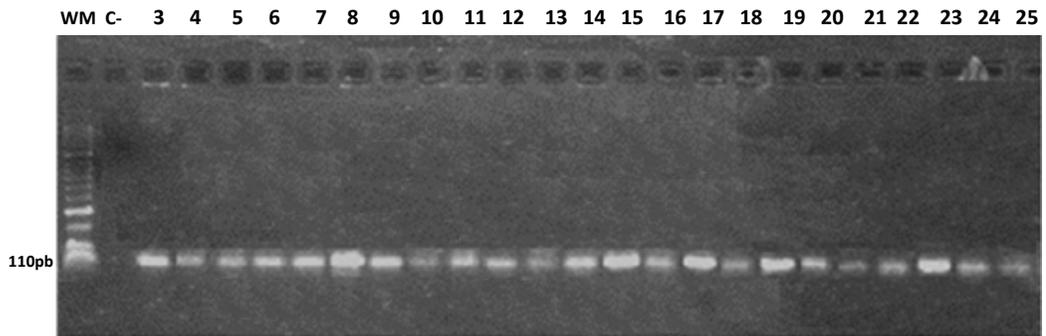


Figura 9. Amplificación del gen de β -globina. Línea 1 Marcador de peso molecular, línea 2 control negativo, líneas 3 - 25 muestras UDN56-UDN78. Fuente: Esta investigación

4.3.2 Detección y tipificación de VPH mediante RLB

En la literatura se ha reportado una gran cantidad de datos acerca de la prevalencia de la infección por VPH en mujeres a nivel mundial, que generalmente se presentan dentro del rango 2% - 44% (López y Lizano 2006; Orozco *et al.*, 2010). En nuestro estudio, la detección de muestras positivas para VPH en mujeres con citología normal fue de 6.4%, cifra mayor a la reportada por Jacobs *et al.*, en el 2000 que correspondió a 4.6% y menor a las cifras encontradas en estudios realizados en otras poblaciones de Colombia, como en la investigación de Molano *et al.*, en 2002 en la que se encontró una prevalencia de la infección por VPH de 18.2%, la realizada por Serrano *et al.*, en 2003 en la que se encontró una prevalencia de 14.9% y la que reporta Consuegra *et al.*, en 2004 de 18%.

La prevalencia de VPH encontrada (6.4%) confirma la presencia de infecciones por VPH entre la población general del municipio de Pasto. En la figura 10 se muestran los resultados de las muestras positivas para VPH.

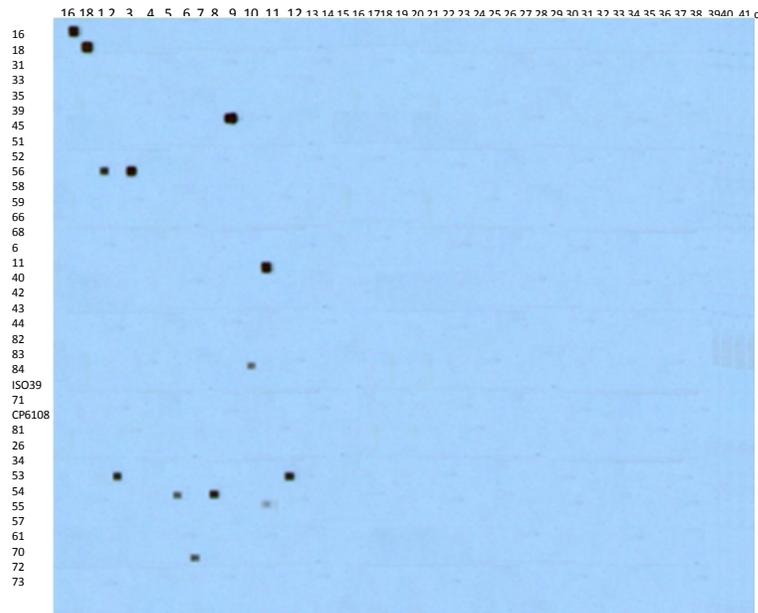


Figura 10. Autorradiografía de la genotipificación de VPH mediante *Reverse line blot*. columna 1 control VPH 16, columna 2 control VPH 18, columnas 3 - 14 muestras: UDN 10, UDN 21, UDN 25, UDN 30, UDN 79, UDN 81, UDN 82, UDN 84, UDN 86, UDN 102, UDN 124, UDN 142, columna 42 control negativo. Fuente: Esta investigación.

Los genotipos encontrados en este estudio correspondieron a VPH 11, 45, 53, 54, 55, 56, 70 y 84, en la tabla 12 se presentan la frecuencia de los tipos de VPH detectados y su potencial oncogénico. Estos resultados concuerdan con reportes previos realizados en otras regiones de Colombia, donde se ha documentado la detección de algunos de estos tipos virales, como el estudio realizado por Molano *et al.*, en 2002, donde reporta los tipos 56 (3.6%) y 70 (1.4%); el estudio realizado por Muñoz *et al.*, en 2004 que reporta VPH 11, 45, 56 y 70 y el estudio de García *et al.*, en 2011 que reporta la presencia de los tipos VPH 56 (3.8%), 45 y 70 (1.26%). Estudios previos indican que existe cierta variabilidad demográfica y geográfica en los tipos de VPH encontrados y su frecuencia, de tal manera que en algunos estudios realizados en Bogotá - Colombia los tipos de VPH más frecuentes fueron VPH 16, 58, 31 y 18 (Muñoz *et al.*, 2004), en otro VPH 56, 58 y 81 (Arias *et al.*, 2010) y en un tercer estudio realizado en Barranquilla los tipos virales más prevalentes fueron VPH 16, 18, 45 y 58 (Murillo *et al.*, 2009).

Tabla 12. Distribución de la frecuencia de los tipos de VPH tipificadas por RLB.

Tipo VPH	Riesgo Oncogénico	Frecuencia
45	Alto riesgo	1
53	Alto riesgo	2
54	Bajo riesgo	2
56	Alto riesgo	2
70	Alto riesgo	1
84	Bajo riesgo	1
11, 55	Bajo riesgo	1
TOTAL		10

Fuente: Esta investigación

Estas variaciones en la frecuencia de los tipos de VPH detectados entre diferentes regiones geográficas pueden deberse por una parte, al comportamiento endémico del VPH en poblaciones específicas y por otra, pueden estar relacionadas con los hábitos comportamentales de cada población, su exposición a los factores de riesgo y las condiciones genéticas de los hospederos (Melo *et al.*, 2003; Brebi *et al.*, 2009; Orozco *et al.*, 2010). También se debe tener cuenta algunas consideraciones metodológicas como la técnica de detección y tipificación molecular empleada y/o el número de pacientes incluidos en cada estudio.

4.3.2.1 Riesgo oncogénico de los tipos de VPH detectados

De los tipos virales encontrados, los tipos de VPH de bajo riesgo representaron el 45,4% de las muestras positivas. La infección por estos tipos virales puede causar cambios benignos de bajo grado en células cervicouterinas e infecciones subclínicas

que suelen ser transitorias y casi siempre se resuelven; por lo general en estas lesiones el ADN viral se encuentra localizado extracromosómicamente. En nuestro estudio, los tipos de VPH de bajo riesgo detectados corresponden a VPH 11, 54, 55 y 84, ver tabla 12, de estos, el tipo viral 11 es uno de los más documentados, ya que ha sido detectado en el 90% de las verrugas genitales o Condilomas, consideradas como la enfermedad de transmisión sexual viral más propagada en el mundo (Castellsagué *et al.*, 2008; Brebi *et al.*, 2009; Segovia y Mendoza 2009; Medina *et al.*, 2010).

En cuanto a la infección por los tipos virales de alto riesgo, estos representaron el 54.6% de las muestras positivas. La infección persistente con estos tipos virales puede ocasionar lesiones intraepiteliales de alto grado y carcinomas anogenitales y cervicales. En nuestro estudio, los tipos de VPH de alto riesgo detectados corresponden a VPH 45, 53, 56 y 70, ver tabla 12. La detección temprana de estos tipos virales es de gran relevancia, teniendo en cuenta que las mujeres quienes presentan infecciones con los tipos de VPH de alto potencial oncogénico tienen aproximadamente 100 veces más riesgo de desarrollar CIN III en comparación con las mujeres no infectadas (Molano *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2010). Esto se debe a que posiblemente en los tipos de VPH de alto riesgo, es más factible la integración del ADN viral al ADN del hospedero, ocasionando alteraciones en el ciclo celular, a través de la interferencia de las ciclinas y cdk's y a través de la inactivación de genes supresores de tumores como p53 y pRB, generando inestabilidad genética y favoreciendo la progresión de lesiones preinvasivas y el mantenimiento del fenotipo maligno, además es posible que los tipos de VPH de alto riesgo puedan inducir tumores malignos aun cuando su carga viral es baja (Burd, 2003; Ding *et al.*, 2010). Por otro lado, se considera que la respuesta inmune frente a estos tipos virales es más débil debido a la alta diversidad intratípica que poseen, que hace que puedan eludir con mayor facilidad la vigilancia inmunológica (Muñoz *et al.*, 2004).

De los tipos de VPH de alto riesgo detectados cabe destacar la importancia del tipo VPH 56 reportado como uno de los más frecuentes en todo el país y VPH 45, reportado como uno de los principales agentes etiológicos del cáncer cervical en mujeres jóvenes, además este tipo viral junto con VPH 18, con el cual se encuentra filogenéticamente muy relacionado, están implicados en el desarrollo de adenocarcinomas (Murillo *et al.*, 2009; Arias *et al.*, 2010; Correnti *et al.*, 2011).

En general, tener conocimiento de que los tipos de VPH 11, 45, 53, 54, 55, 56, 70 y 84 se encuentran entre las mujeres del municipio de Pasto, es de gran utilidad para la prevención de cáncer de cérvix en esta región, ya que podría contribuir al diseño de vacunas y protocolos de vacunación orientados a prevenir principalmente la infección de los tipos circundantes y evitar que eventualmente puedan ocasionar cáncer de cérvix, siendo más eficiente su efecto en nuestra población. Esto teniendo en cuenta que actualmente, las dos vacunas profilácticas autorizadas a nivel mundial, Gardasil® (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA) y Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Wavre, Belgium) protegen contra los tipos 6, 11, 16 y 18, por ser identificados como los más frecuentes, pero su eficacia es menor con respecto a los genotipos no incluidos en las vacunas. Además, algunos investigadores sugieren que si estas vacunas son efectivas en el control de la infección por los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18, es posible que los otros tipos virales circundantes que no son objetivo de la vacuna puedan incrementar su prevalencia y potencial oncogénico, presentándose nuevas infecciones aun en mujeres inmunizadas (Vanegas *et al.*, 2008, Correnti *et al.*,

2011; Weaver *et al.*, 2011). Es por ello que es necesario continuar con este tipo de estudios que complementen la presente investigación para identificar los tipos virales circundantes y caracterizar mejor la población del municipio de Pasto y de esta manera establecer las estrategias más eficaces para el control y prevención de la infección por VPH.

4.3.2.2 Infecciones múltiples por VPH

Entre el total de muestras positivas para VPH se evidenció un caso de infección múltiple con los tipos virales 11 y 55 (1/10 muestras, 10%). Este resultado es similar al obtenido en un estudio realizado por Segovia y Mendoza en 2009 en el cual observó 1/14 (7%) muestras positivas para infección por más de un tipo viral y similar a los reportes de Sijvarger *et al.*, en 2006, que indican la detección de un 11% de infecciones múltiples y difiere de otros estudios en los que se ha documentado porcentajes más altos, como el de Molano *et al.*, en 2010 que reporta un 17.5% de infecciones múltiples y el estudio de García *et al.*, en 2011, que reporta 29.5% de este tipo de infecciones. Estas variaciones encontradas en la frecuencia de infecciones múltiples por VPH, pueden ser consecuencia, por una parte de las diferencias de sensibilidad y especificidad de las técnicas empleadas en la detección y tipificación viral y por otro lado puede deberse a diferencias reales de la prevalencia de los tipos virales circundantes en la población de estudio y a factores de riesgo involucrados en la transmisión y persistencia de la infección por VPH propios de cada población (Molano *et al.*, 2002; Murillo *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010).

La presencia de infecciones múltiples puede estar relacionada con el hecho de que diferentes tipos de VPH comparten la misma vía de transmisión y que por tanto pueden ser transmitidos simultáneamente o que la infección por un tipo viral facilite la adquisición de otro, sin embargo, aún no hay claridad respecto al mecanismo biológico involucrado en la presencia de las infecciones múltiples (Thomas *et al.*, 2000; Segovia y Mendoza 2009; Weaver *et al.*, 2011). Así mismo, las implicaciones clínicas de la infección por más de un tipo viral tampoco están bien definidas, algunos estudios sugieren que las mujeres que presentan infecciones múltiples de VPH poseen mayor riesgo de desarrollar lesiones escamosas intraepiteliales, pero no está claro si esto se debe a la susceptibilidad del hospedero, reflejando una mayor tolerancia inmunológica a la infección por VPH, la interacción entre los virus o la probabilidad de progresión independiente en cada tipo viral (Burd, 2003; Cañadas *et al.*, 2006; López y Aristizábal 2006).

Por otro lado, de acuerdo con algunos estudios evolutivos, en la infección por más de un tipo de VPH, debe existir cierto tipo de competencia mediada por la selección de ciertos genotipos y la regulación de su representación cuantitativa, esta selección debe estar basada en la adaptación al ambiente o a la habilidad de producir progenie. Es por ello que se cree que si dos o más genotipos de VPH están presentes, es posible que uno de los tipos virales prevalezca más que los otros, en especial los tipos de alto riesgo oncogénico y que por tanto los tipos virales que se encuentren con un menor número de copias no puedan ser detectados, existiendo variaciones en los reportes correspondientes con la prevalencia de las infecciones múltiples a nivel mundial (Van Doorn *et al.*, 2006; Mas *et al.*, 2010).

4.4 Análisis de concordancia entre los resultados del diagnóstico citológico y la detección molecular de VPH.

El análisis de concordancia entre los resultados obtenidos mediante *Reverse Line Blot* y citología cervicouterina convencional, mostró un valor estadístico Kappa de -0.040, lo cual indica que no hay concordancia entre estas dos técnicas, sin embargo el p - valor obtenido fue de 0.587, por lo cual se infiere que los resultados no fueron estadísticamente significativos para determinar esta concordancia, esto posiblemente se deba a que el número de resultados positivos fue muy bajo, impidiendo concluir adecuadamente este análisis. Es de considerar que las pacientes incluidas en el estudio, no tenían ningún antecedente de lesiones escamosas intraepiteliales y/o infección por VPH, de manera, que aunque el número de resultados positivos no sean estadísticamente significativos, tienen una gran relevancia a nivel clínico. En la tabla 13 se presenta el número de muestras positivas y negativas para las dos técnicas.

Tabla 13. Tabla de contingencia RLB-citología

		Citología		Total
		Negativo	Positivo	
RLB	Negativo	135	4	139
	Positivo	10	0	10
Total		145	4	149

Fuente: Esta investigación

De las pacientes en estudio, el 6.7% (10/149) fueron VPH positivas con resultado negativo para lesión escamosa intraepitelial por citología. Este porcentaje es menor al reportado en estudios previos como el de Jacobs *et al.*, en el 2000 donde se detectó VPH en el 78% de muestras con citologías negativas. Reigosa *et al.*, en 2004 reportó en una población de mujeres con citología normal un 34.5% de infección por VPH. CONASIDA en 2007 documentó la detección de VPH en el 40% de casos sin lesión histológica.

La detección de VPH en pacientes con resultado citológico negativo puede atribuirse a que entre las mujeres que adquieren algún tipo de VPH, cerca del 40% pueden presentar infecciones subclínicas, principalmente en la etapa inicial de la infección, cuando ocurre el periodo de incubación del virus y durante el cual la mayoría de mujeres no desarrollan cambios morfológicos relacionados con el tipo viral adquirido (Reigosa *et al.*, 2004; López y Aristizábal 2006; Castellsagué *et al.*, 2008). La ausencia de estos cambios morfológicos puede deberse a que el VPH se encuentre en fase latente, en la cual la replicación viral no es productiva y el virus se establece con un número de copias reducido (30-50 copias por célula infectada), en forma extracromosomal, usando la maquinaria de replicación del ADN del hospedero para sintetizar su ADN una vez por ciclo celular. En este proceso además, está involucrada la expresión de los genes E1 y E2, que facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular, en tanto que los genes E6 y E7 no son expresados. Durante esta etapa el virus se distribuye a grandes zonas del epitelio sin que ocurran manifestaciones clínicas ni histológicas y se mantiene un número de copias bajo, impidiendo la activación de la respuesta inmune (Burd, 2003; Consuegra *et al.*, 2004; Doorbar, 2005; Rivera *et al.*, 2006). Las mujeres que presentan este tipo de infecciones asintomáticas, constituyen importantes reservorios del virus por periodos variables de tiempo y pueden transmitirlo, aun sin saberlo a otros individuos (Cruz y Bosques 2005).

Estos resultados también pueden estar relacionados con algunas limitaciones de la citología que en algunos casos no permite identificar la presencia de lesiones escamosas intraepiteliales. De acuerdo con los reportes presentados en el Plan Nacional para el control de cáncer en Colombia, un estudio realizado en cuatro departamentos del país mostró que el 49% de las citologías eran falsos negativos, siendo esta la más grande restricción de esta prueba. Así mismo, un reciente meta-análisis mostró que la sensibilidad promedio de la citología cervicouterina para detectar una neoplasia intraepitelial cervical o un cáncer de cuello uterino era de 51% y su especificidad promedio era de 98% (Alonso *et al.*, 2005). Los diagnósticos falsos negativos de la citología son atribuibles por una parte a errores en la interpretación de los frotis, considerando que cada lámina contiene de 50.000 a 300.000 células que deben ser analizadas y por otra a una inadecuada toma de muestra o inadecuada preparación de ella (Burd, 2003). En concordancia con estos casos, la utilización de métodos moleculares permite incrementar la sensibilidad de detección de infección por VPH, en nuestro estudio en particular, la técnica empleada RLB ha sido reportada como un método con alta sensibilidad y reproducibilidad (Melo *et al.*, 2003; Roa *et al.*, 2009).

En las pacientes en quienes se detectó el VPH, la infección puede progresar a una expresión activa, con el efecto citopático viral concomitante, dependiendo de la interacción entre el virus y las células del hospedero, interacción que involucra al tipo de cepa infectante, la persistencia de la infección con un incremento en el número de copias virales, la continua expresión de determinados genes virales, la presencia de factores de riesgo y la respuesta inmune del hospedero (Ruíz *et al.*, 2008). Se ha sugerido que para que ocurra el desarrollo de lesiones intraepiteliales y posterior cáncer invasor, es necesaria la integración del genoma viral al genoma celular, con la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, que incrementan la proliferación celular no controlada con una mayor carga de mutaciones y favorecen la inhabilidad para reparar mutaciones en el ADN de las células del hospedero, evidenciándose una morfología displásica (Consuegra *et al.*, 2004; López y Aristizábal 2006; García J. *et al.*, 2010; Sarid *et al.*, 2011).

En las pacientes en las que se detectó el VPH, también puede ocurrir una regresión espontánea de la infección, mediada por la acción de anticuerpos neutralizadores contra el VPH como resultado de un sistema inmunológico competente, formando una barrera protectora que evite el desarrollo de neoplasias intraepiteliales cervicales. Por esta razón las mujeres con deficiencias inmunológicas son más susceptibles a presentar infecciones persistentes y a desarrollar lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas. También es posible que las mujeres en quienes se resuelva la infección por VPH, adquieran cierto grado de protección con respecto a reinfecciones con el mismo tipo viral, sin embargo aún hace falta profundizar en el estudio de la respuesta inmune del hospedero frente a la infección por el VPH (Reigosa *et al.*, 2004; Molijn *et al.*, 2005; Doorbar, 2005; Castellsagué *et al.*, 2008).

Por otra parte, en el 2.7% (4/149) de las pacientes en estudio, que fueron diagnosticadas con NIC I (2/149) y ASCUS (2/149) en el examen citológico, no se detectó VPH. Resultados similares han sido reportados en estudios previos, entre los que se evidencia una gran variación en los porcentajes de detección de ADN de VPH en este tipo de lesiones, Zuna *et al.*, en 2005 encontró que cerca del 2 – 11% de mujeres con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado eran VPH negativas,

así mismo Castellsagué *et al.*, en 2008 reportó que este virus no fue detectado en 50-80% de LIEBG y en 50% de ASCUS y Farfán *et al.*, en 2010 encontró que 70.5% de pacientes diagnosticadas con lesiones ASCUS o LIEBG en su citología fueron negativas para VPH. Estas variaciones en el porcentaje de VPH detectado en las lesiones escamosas intraepiteliales, posiblemente se deban a la calidad de la muestra, las técnicas moleculares empleadas, el número de mujeres incluidas y las características de la población de estudio (ALTS group, 2000). Así mismo las variaciones en la positividad para el VPH en pacientes con diagnóstico de ASCUS o NIC I, pueden variar debido a diferencias en la definición de las lesiones, Zuna *et al.*, en 2005 en un estudio realizado con 2371 pacientes, reportaron que el porcentaje más bajo de mujeres con LIEBG y VPH negativas se observó en las mujeres diagnosticadas con LIEBG a partir de la interpretación consenso de cuatro patólogos diferentes y este porcentaje se incrementó teniendo en cuenta la lectura citológica individual de cada patólogo.

Cabe resaltar que en las mujeres incluidas en este estudio no se encontró ningún caso con LIEAG o cáncer cervical, en las cuales, de acuerdo con la literatura, se ha detectado la presencia de VPH en el 99-100% de las mujeres diagnosticadas (Walboomers *et al.*, 1999; Castellsagué y Muñoz 2003; Molano *et al.*, 2010).

Las posibles explicaciones para este resultado, que incluye pacientes diagnosticadas en el examen citológico con anormalidad en las células epiteliales y en las que no se detectó VPH mediante la técnica de RLB, pueden estar relacionados, con el porcentaje de regresión que presentan las infecciones por VPH, que es mayor de 55% y que pudo ocurrir antes de la resolución de los cambios morfológicos. El proceso de regresión esta mediado por una respuesta de células T citotóxicas contra el VPH, sugiriendo un sistema inmune competente (Mogollón, 2004; Reigosa *et al.*, 2004; Dane *et al.*, 2009). También existen hipótesis que sustentan que en algunos casos especiales, los genes celulares involucrados en la carcinogénesis atribuida al VPH, podrían inducir de forma espontánea, mutaciones que conlleven al desarrollo de lesiones pre-cancerosas y cáncer aun sin estar presente el virus (Cruz y Bosques 2005).

Estos resultados también podrían atribuirse a la subjetividad de la interpretación citológica y/o a una clasificación incorrecta de los cambios observados no relacionados con la infección. Algunas investigaciones indican que numerosos cambios benignos y reactivos como atipia de células escamosas, cambios inflamatorios, atrofia, cambios regenerativos, presencia de glicógeno intracitoplásmico causada por el consumo de anticonceptivos orales o terapias hormonales y la deficiencia de ácido fólico, pueden confundirse con los coilocitos asociados a la infección por VPH y conllevar al diagnóstico de estos pseudocoilocitos como lesiones intraepiteliales (ALTS group, 2000; Wentzensen *et al.*, 2009). El porcentaje de falsos positivos en la detección de las lesiones intraepiteliales de bajo grado, depende de las variaciones en las definiciones citológicas y las diferencias en la interpretación de las placas citológicas por los diferentes grupos de patólogos (Zuna *et al.*, 2005).

La falta de concordancia de estos resultados también es posible debido a errores relacionados con la técnica molecular empleada, ya que incluso pruebas altamente sensibles en la detección del VPH, no lo son en un 100%. Reigosa *et al.*, en 2004 reporta que las pocas fallas de los métodos moleculares pueden deberse a que durante el almacenamiento del producto amplificado puede romperse el ADN viral. Por

otra parte, cabe la posibilidad de que estas infecciones sean consecuencia de tipos de VPH que no son detectados por la técnica empleada, ya sea porque no tiene las sondas correspondientes del tipo viral o por un bajo número de copias que no alcanzan a ser detectadas en la muestra (Schneider *et al.*, 2000; Molijn *et al.*, 2005; Zuna *et al.*, 2005; Molano *et al.*, 2010). Así mismo, es posible que no se pudiera detectar la infección por VPH en estas pacientes, debido a interrupciones o deleciones en el ADN del virus a la altura del ORF L1, que es la región hacia la cual están dirigidos los iniciadores empleados GP5+/GP6+, estas interrupciones pueden ocurrir cuando hay integración viral al genoma celular del hospedero, casos en los cuales resulta más útil emplear iniciadores dirigidos hacia la región E7. Estudios previos sugieren que el VPH 18 tiene un alto porcentaje de integración y que por esta razón es detectado con más frecuencia en los carcinomas de cuello uterino cuando se emplea iniciadores dirigidos hacia la región E7, pero no es detectable con análisis de L1. No obstante para inferir este tipo de análisis es necesario realizar estudios de integración (Molano *et al.*, 2010).

Por otro lado, el valor predictivo negativo calculado para la técnica empleada RLB fue de 97.1%, similar al reportado en literatura para los métodos basados en PCR para la detección de VPH, que es mayor a 95%. Teniendo en cuenta que este es un valor altamente significativo, se puede considerar que las mujeres con diagnóstico citológico de NIC y negativas para VPH tienen un riesgo reducido de persistencia o progresión de estas lesiones (Segovia y Mendoza 2009).

En este contexto, se puede inferir que para realizar un mejor análisis de los cambios morfológicos de las lesiones preinvasoras, infecciones subclínicas y el estudio del potencial oncogénico de los tipos de VPH en la población, resulta de gran utilidad utilizar conjuntamente técnicas de biología molecular, sensibles y específicas para la detección y tipificación de VPH, con las clásicas de exploración ginecológica (Cañadas *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2008; Twu *et al.*, 2011), de tal manera que se pueda realizar un diagnóstico certero, orientar de forma adecuada el manejo clínico de las pacientes, aumentar la eficacia en la detección temprana de las lesiones escamosas intraepiteliales y contribuir a resolver casos con falta de concordancia citológica (Segovia y Mendoza 2009). Además, es importante tener en cuenta, que la misma muestra tomada para la lectura de la citología, puede emplearse para la detección y tipificación molecular del VPH, sin necesidad de recurrir a procedimiento invasivos como las biopsias y facilitando la inclusión de pacientes sanas en estudios orientados a la detección temprana del cáncer de cérvix.

4.5 Análisis de los resultados de la detección molecular de VPH y las variables poblacionales incluidas en el estudio.

A partir del análisis bivariado, realizado con la información de las pacientes incluidas en este estudio y los resultados de la detección molecular de VPH obtenidos, se determinó que no hay interacciones estadísticamente significativas entre la presencia de VPH y variables como la edad, infección por otros microorganismos, el número de gestas, uso de anticonceptivos y cambios celulares reactivos asociados a inflamación (p -valor > 0.05), ver tabla 14. Estos resultados sugieren que ninguna de las variables incluidas puede explicar o predecir la infección por VPH en la población de estudio. Estudios recientes refieren que los factores de riesgo para adquirir la infección por VPH, están relacionados principalmente con el comportamiento sexual, como es la

edad de inicio de la vida sexual, alto número de parejas sexuales a lo largo de la vida, contacto sexual con individuos de alto riesgo, múltiples compañeros sexuales de la pareja y deficiencias del sistema inmune (Valdovinos 2008; Lizano *et al.*, 2009).

Cabe resaltar que, aunque no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las variables de estudio y la infección por VPH, es de gran relevancia analizar algunos patrones observados entre los resultados. Ya que, una vez adquirida la infección por el VPH, factores como la edad, la coinfección con otros microorganismos, el número de embarazos, el uso de anticonceptivos y la inflamación, pueden incrementar el riesgo de desarrollar LIEAG y cáncer de cuello uterino (Castellsagué *et al.*, 2008; Segovia *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010).

Tabla 14. Distribución de frecuencias de VPH según las variables sociodemográficas y clínicas

Características	Nº pacientes	Muestras positivas VPH	P-valor
Edad (años)			
18–27	49	3	0.187
28–37	48	6	
38–47	41	0	
48–57	19	1	
58	3	0	
Tipo de infección			
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1	0	0.998
Consistente con <i>Cándida ssp.</i>	4	0	
Flora sugestiva de vaginosis bacteriana	23	1	
Bacterias compatibles con <i>Actinomicetos ssp.</i>	1	0	
Cambios celulares consistentes con virus Herpes simple	2	0	
Consistente con <i>Cándida spp.</i> , <i>Bacilo de Doderlein</i>	1	0	
Vaginosis bacteriana, <i>Actinomicetos spp.</i>	1	0	
Otros microorganismos	11	1	
<i>Bacilo de Doderlein</i> (Flora normal)	58	4	
Sanas	47	4	
Gestas			
0	14	0	0.190
1 – 2	86	8	
3	49	2	
Uso de anticonceptivos			
Diu	15	3	0.198
Anovulatorios	17	0	
Pomeroy	42	2	
Otro	10	0	
Ninguno	57	4	
No sabe/no responde	8	1	

Cambios celulares reactivos asociados a inflamación			
Leve	86	4	
Moderada	48	5	0.245
Severa	5	1	
No sabe	10	0	

Fuente: Esta investigación

4.5.1 Análisis entre la edad y la infección por VPH

No se encontró una relación de dependencia estadísticamente significativa entre la infección por VPH y la edad de las pacientes (p -valor = 0.187), ver tabla 14, resultados similares fueron obtenidos por Orozco *et al.*, en 2010 que no encontró una asociación significativa entre estas dos variables. Sin embargo, cabe destacar que el 90% de los casos ocurrieron en las mujeres entre 18 y 37 años de edad, en particular en el rango entre 28-37 años. Esto concuerda con los reportes de literatura que indican que la infección por VPH es más frecuente en mujeres jóvenes menores de 40 años (Sánchez *et al.*, 2008; Sideri *et al.*, 2011; Weaver *et al.*, 2011). No obstante aunque este patrón epidemiológico es similar en todo el mundo, pueden existir diferencias asociadas con los hábitos comportamentales de cada región (Sijvarger *et al.*, 2006). Para el municipio de Pasto, el estudio realizado por Yépez *et al.*, en 2007 en el que reporta que el mayor número de casos de cáncer de cuello uterino se presenta en edades entre 35 a 39 años, sugiere infección por VPH a temprana edad y posterior progresión a cáncer, con un índice de supervivencia de cinco años.

La infección por VPH en mujeres jóvenes puede explicarse debido a que el virus se transmite principalmente a través de las relaciones sexuales y en las primeras etapas de la vida sexual hay una tendencia a tener mayor número de compañeros sexuales sin protección (Sánchez *et al.*, 2008). Además, la infección por VPH en mujeres jóvenes puede estar relacionada con cambios activos en la zona de transición o transformación, que son predominantes en etapas tempranas de la vida, donde también la vida sexual es más activa. La zona de transformación es originada por la migración fisiológica de la unión escamocolumnar hacia el endocérvix, remplazando el epitelio cilíndrico por el epitelio plano estratificado, en donde la susceptibilidad al riesgo de transformación maligna/célula blanco es probablemente mayor que en cualquier otro tejido sujeto al cáncer. Por lo general, este proceso representa una respuesta fisiológica a las hormonas y a la exposición del epitelio mucosecretor al ambiente ácido de la vagina (Alonso *et al.*, 2005; Cruz y Bosques 2005).

Por otra parte, en las mujeres que presentan una edad entre 38 y 47 años, no se detectó infección por VPH, esto puede asociarse con el hecho que la presencia de VPH disminuye con el paso de los años, posiblemente debido a una baja exposición al virus relacionado con un comportamiento sexual más estable o a la adquisición de inmunidad por infecciones previas (Muñoz *et al.*, 2004; Reigosa *et al.*, 2004).

En países como Chile, Colombia, Costa Rica y México se ha observado un segundo pico en la infección por VPH en mujeres peri y postmenopausicas (CONASIDA 2007; Flores, 2009). La edad correspondiente a esta etapa puede variar entre cada mujer, en México el segundo pico de infección por VPH fue observado en mujeres mayores de 45 años, en Colombia se observó en mujeres mayores de 50 años y en Costa Rica

después de los 55 años de edad (Muñoz *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005). En nuestro estudio la frecuencia de infecciones por VPH en el grupo de mujeres de 48 a 57 años fue del 10%. El ligero incremento de infecciones por VPH en mujeres alrededor de los 50 años, podría explicarse por la reactivación de infecciones por VPH latentes o a una mayor susceptibilidad a adquirir nuevas infecciones, esto debido a la disminución de la respuesta inmune, causada por cambios hormonales relacionados con la disminución de la función ovárica generada en la menopausia y/o por la susceptibilidad que presenta el cuello uterino de que una infección por VPH alcance el tejido basal y permanezca persistente, cuando el tejido escamocolumnar sufre metaplasia durante la menarquía (Muñoz *et al.*, 2004; Sierra *et al.*, 2006). Estudios relacionados con el sistema inmunológico indican que en las personas mayores se produce una disminución en la circulación de las células T maduras, como resultado de una disminución en la frecuencia de linfocitos CD8+, células T CD4+ productoras IL-2 y/o una disminución en la expresión de receptores de IL-2 (Molano *et al.*, 2002)

4.5.2 Análisis entre la infección por otros microorganismos y la infección por VPH

En este estudio se encontró que no hay interacciones estadísticamente significativas entre la infección con otros microorganismos y VPH (p-valor = 0.998), ver tabla 14. Respecto a estos resultados se debe tener en cuenta que la frecuencia de las infecciones detectadas a través del estudio citológico pudieran ser superiores a las reportadas, debido a la baja sensibilidad de la citología para detectar microorganismos. Estudios previos han evidenciado que la sensibilidad para detectar *Cándida* a través de la citología fue de 31%, para vaginosis bacteriana de 57% y para *Trichomonas vaginales* de 51%. Cabe resaltar que la citología no detecta otras infecciones de transmisión sexual que podrían presentar algún tipo de asociación con la infección por VPH, como por ejemplo el virus de inmunodeficiencia humana, *Chlamydia trachomatis* y la sífilis (Alonso *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2007).

En 10% (1/10) de las pacientes positivas para VPH se encontró coinfección con flora sugestiva de vaginosis bacteriana. En investigaciones previas la vaginosis ha sido asociada con una mayor susceptibilidad de la mujer a contraer enfermedades de transmisión sexual, entre las que se encuentran *Neisseria gonorrhoeae*, VIH, HSV y VPH. Watts *et al.*, en 2005 reportaron la asociación entre la vaginosis bacteriana y la prevalencia e incidencia de la infección por VPH, pero no con la persistencia de la infección viral y progresión de las lesiones escamosas intraepiteliales. Las mujeres con vaginosis pueden ser más susceptibles a la adquisición de nuevas infecciones por VPH o su reactivación, debido a un aumento en la producción de sialidasas, cambios en la barrera mucosa cervical, disminución de la producción de H₂O₂ causada por una disminución de los lactobacilos y cambios en la producción de citosinas. Así mismo las mujeres que presentan infección por el VPH pueden favorecer cambios en el ambiente vaginal que faciliten la infección por flora sugestiva de vaginosis bacteriana (Cruz y Bosques 2005; Watts *et al.*, 2005; Nyirjesy, 2008).

En otro 10% (1/10) de las pacientes positivas para VPH se encontró coinfección con otro microorganismo que no fue posible identificarlo morfológicamente en la citología, razón por la cual no se puede realizar un análisis preciso de su asociación con la infección por VPH.

Por otra parte en 40% (4/10) de las mujeres que fueron positivas para VPH se identificó la presencia del bacilo de Doderlein, resultado que se consideró normal, debido a que este microorganismo forma parte de la microbiota habitual del tracto vaginal y su detección en el examen citológico es frecuente. En este estudio, no se cuenta con información correspondiente a la cantidad de bacilos de Doderlein presentes, que en caso de ser mayor a lo establecido en los rangos normales, se podría correlacionar con la respuesta inmune del hospedero frente a la infección por agentes extraños como el VPH. Esto teniendo en cuenta que uno de los mecanismos de defensa naturales contra agresiones externas existentes en el cérvix es el mantenimiento del equilibrio de la microbiota normal, proceso en el cual está involucrado el bacilo de Doderlein (Sánchez *et al.*, 2008).

4.5.3 Análisis entre paridad e infección por VPH

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre el número de embarazos y la infección por VPH (p-valor = 0.190). Resultados similares fueron obtenidos por Lazcano *et al.*, en 2001, Burd, en 2003 y Muñoz *et al.*, en 2004, sugiriendo la posibilidad de que la asociación observada entre la infección por VPH y la multiparidad sea consecuencia del azar y no refleje eventos biológicos.

No obstante, es importante tener en cuenta que la infección por VPH predominó en un 100% entre las mujeres que habían tenido por lo menos una gesta, de este porcentaje el 80% corresponde a mujeres con 1 o 2 hijos y el 20% a mujeres con 3 o más hijos, ver tabla 14. En publicaciones previas se ha establecido que las mujeres VPH positivas con 2 o más embarazos de término, tienen un riesgo 80% mayor de presentar lesiones intraepiteliales que mujeres nulíparas o con menor número de hijos, las mujeres con tres o cuatro partos tienen un riesgo 2.6 veces más alto de aparición de cáncer cervicouterino y las mujeres con siete partos o más presentan un riesgo 3.8 veces mayor (Muñoz *et al.*, 2002; Castellsagué y Muñoz, 2003; Cruz y Bosques 2005). Piñeros *et al.*, en 2007 realizaron un estudio en el departamento de Nariño en el que encontró que 40.3% de las mujeres entre 25 y 49 años de edad, con cáncer de cuello uterino tenían más de 3 hijos nacidos vivos.

Las razones fisiológicas que expliquen la asociación entre la paridad elevada y la infección por VPH y progresión a lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas, aún no están claras. Algunos investigadores indican que no es el número de partos lo que incrementa el riesgo de aparición de neoplasias intraepiteliales, sino más bien los cambios nutricionales, los cambios hormonales, la depresión de la respuesta inmune y la presencia de microtraumas que ocurren durante el embarazo, lo que facilita la infección por VPH y posterior desarrollo de cáncer de cérvix (Castellsagué y Muñoz, 2003; Reigosa *et al.*, 2004; Sarduy, 2008). En este sentido, existen reportes que asocian un incremento en la prevalencia y persistencia de la infección por VPH de alto riesgo durante el embarazo en comparación con el periodo postparto (Muñoz *et al.*, 2004).

Se considera que la eversión o ectropión de la zona de transformación en el cuello uterino, que ocurre durante el embarazo o la presencia de un epitelio erosionado que puede presentarse tras los partos, pueden facilitar la adquisición de infecciones por VPH, esto teniendo en cuenta que las partículas infecciosas ingresan a las células basales a través de aberturas del epitelio estratificado y tales aberturas pueden ocurrir

en condiciones donde la piel presente alguna lesión o microtrauma (Doorbar, 2005). Así mismo, se cree que los cambios hormonales inducidos por el embarazo, que incluyen incremento de los niveles de estrógenos y progesterona, deben modular la respuesta inmune al VPH e influenciar el riesgo de persistencia o progresión de la infección (Castellsagué y Muñoz, 2003; Reigosa *et al.*, 2004). Además se ha comprobado que durante la gestación ocurre una disminución de los niveles de folatos en la sangre, los cuales junto con la vitamina B6, la vitamina B12 y la metionina se han asociado con los procesos de metilación del ADN, que a su vez se han asociado in vitro con la pérdida de la transcripción viral en los fenómenos de carcinogénesis (Sarduy, 2008).

Por otro lado, se ha determinado que en aquellas mujeres menores de 16 años y embarazadas, el riesgo de adquirir una infección viral es mayor, debido a que tanto la adolescencia como el embarazo son algunas de las etapas en las que se encuentra más activa la fase de transición en el epitelio, haciéndolo más vulnerable a las lesiones. En mujeres adultas la probabilidad de traumas en la zona de transformación en el periodo postparto no es frecuente y la influencia de la multiparidad es cuestionable. (Cruz y Bosques 2005; Sarduy, 2008).

4.5.4 Análisis entre el uso de anticonceptivos y la infección por VPH

No se encontró una relación de dependencia estadísticamente significativa entre el uso de algún método anticonceptivo y la infección por VPH (p -valor = 0.198). De las mujeres que presentaron infección viral, solo el 50% planifica, de este porcentaje el 20% se ha realizado la operación de ligadura de trompas y el 30% usa como método anticonceptivo el dispositivo intrauterino – DIU, ver tabla 14. Es posible que en las pacientes que usan el DIU, el riesgo de infección por VPH haya sido mayor, debido a que la irritación ocasionada por la presencia del dispositivo intrauterino, podría generar un medio más susceptible para la infección viral, sin embargo, aún no hay muchos estudios que respalden esta asociación (Alonso *et al.*, 2005).

En la población de estudio no se observó ningún caso en el que mujeres que usen anticonceptivos orales fueran VPH positivas. De acuerdo con los reportes de la literatura, el uso de anticonceptivos orales puede actuar como un cofactor en el desarrollo de cáncer de cuello uterino en mujeres VPH positivas, pero no hay evidencias de que exista alguna relación con la adquisición de la infección viral (Moreno *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; López y Lizano 2006). La tendencia a relacionar un mayor riesgo de progresión de las lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas con el uso prolongado de anticonceptivos orales, se ha considerado en base a estudios que indican que el genoma del VPH contiene un segmento de reconocimiento hormonal, que podría ocasionar una interacción entre los anticonceptivos orales y el virus y a los reportes que sugieren que las hormonas con receptores específicos para estrógenos y progesterona en el epitelio escamoso, pueden promover la integración del ADN viral al genoma celular del hospedero y la posterior expresión de sus oncogenes, ocasionando la progresión de las lesiones escamosas intraepiteliales (Molano *et al.*, 2005; Sarduy, 2008).

De acuerdo con los resultados obtenidos en estudios multicéntricos, el uso de anticonceptivos orales por menos de cuatro años no presenta relación con el desarrollo de cáncer de cuello uterino en mujeres portadoras de VPH, pero en las

mujeres que los han utilizado por más de cinco años el riesgo de progresión a cáncer invasivo puede ser hasta cuatro veces mayor y el de cáncer in situ 3 veces mayor (Castellsagué y Muñoz, 2003; Ortiz *et al.*, 2004; Sarduy, 2008). Cabe resaltar que en esta investigación no se cuenta con información correspondiente con el tiempo de consumo de los anticonceptivos orales, que permita realizar un análisis más profundo de la asociación con la infección por VPH.

4.5.5 Análisis entre cambios celulares reactivos asociados a la inflamación y la infección por VPH

En relación a la presencia de inflamación, se encontró que el 50% de las pacientes con VPH, presentaron inflamación moderada, el 40% inflamación leve y el 10% inflamación severa, ver tabla 14. En este estudio no se encontró una relación de dependencia estadísticamente significativa entre la gravedad de la inflamación y la detección de VPH (valor-p = 0.245), sugiriendo que el estado de este diagnóstico no permite predecir infecciones por el VPH, no obstante es de gran relevancia que todas las mujeres VPH positivas hayan presentado algún grado de inflamación, ya que en estudios previos se ha reportado que las mujeres con inflamaciones cervicales y que presentan VPH, tienen una tendencia significativamente positiva de presentar infecciones persistentes y tienen dos veces más riesgo de progresar a LIEAG (Castle *et al.*, 2001). Duarte *et al.*, en 2004 reportó que el 48.1% de las pacientes que presentaron citología inflamatoria severa también tenían lesión intraepitelial de bajo riesgo y encontraron tres casos de mujeres con inflamación severa y LIEAG.

La relación entre las lesiones intraepiteliales y la presencia de inflamaciones pueden atribuirse a que la inflamación puede actuar como un factor de riesgo que favorece las condiciones necesarias para que la infección por VPH progrese a lesiones malignas, esto debido a que puede contribuir a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y a una disminución de la respuesta inmune (Castle y Giuliano 2003).

Por otra parte, también se ha reportado que una cuarta parte de los casos con cambios citológicos de regeneración, incluidos dentro de los cambios reactivos asociados a inflamación, pueden estar relacionados con lesiones intraepiteliales del cuello uterino y que con frecuencia estos cambios morfológicos se diagnostican como ASCUS (Alonso *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

El presente estudio indica la presencia de infección por VPH en mujeres con citología normal en el municipio de Pasto.

Los genotipos de alto riesgo encontrados en este estudio corresponden a VPH 45, 53, 56 y 70, y los tipos de bajo riesgo encontrados corresponden a VPH 11, 54, 55 y 84.

Los resultados obtenidos indican la presencia de un mayor porcentaje de tipos virales de alto riesgo 54.6% que de tipos virales de bajo riesgo 45.4%.

En el presente estudio se encontró que la edad, la infección por otros microorganismos, el número de gestas, el uso de anticonceptivos y los cambios celulares reactivos asociados a inflamación, no constituyeron factores determinantes que permitan explicar o predecir la infección por VPH en mujeres sanas.

La infección por VPH fue más frecuente en mujeres menores de 37 años, con al menos una gesta previa y con algún grado de inflamación en el cérvix.

Los resultados muestran que la detección y tipificación molecular de VPH permite identificar un grupo mayor de mujeres en riesgo de desarrollar cáncer cervical en comparación con el examen citológico, sugiriendo que los métodos moleculares pueden constituirse en un complemento a los programas convencionales de tamizaje del cáncer cervicouterino y en conjunto garantizar una detección temprana y eficiente de la infección por VPH.

La presente investigación confirma la presencia de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico, en mujeres del municipio de Pasto con resultados de citología normal, lo cual sugiere la necesidad de implementar métodos de diagnóstico y detección molecular en la población, con el fin de detectar tempranamente un mayor número de casos de infección por VPH que pueden pasar desapercibidos con los métodos convencionales.

RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone realizar un seguimiento a las pacientes VPH positivas, por parte de la entidad de salud, con especial atención en las pacientes en las que detectó infección por tipos de VPH de alto riesgo oncogénico, con el propósito de prevenir a tiempo la progresión de lesiones pre-neoplásicas, neoplásicas y cáncer de cérvix.

Continuar con este tipo de estudios, haciéndolo extensivo a un mayor número de mujeres del municipio de Pasto y de Nariño, con el fin de determinar los tipos circundantes en la región y determinar los factores de riesgo asociados.

En posteriores estudios relacionados con la detección y tipificación del VPH, incluir pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado y cáncer de cuello uterino, con el fin de realizar un mejor análisis de correlación entre la infección por VPH y el desarrollo de CCU.

En estudios futuros incluir otras técnicas de biología molecular para detectar y tipificar el VPH, que utilicen iniciadores no solo dirigidos a la región L1 sino también a la región E6/E7.

En futuras investigaciones sería de gran utilidad tener en cuenta otros factores asociados a la infección por VPH como: carga viral, estado de integración, edad de inicio de las relaciones sexuales, número de parejas sexuales a lo largo de la vida, número de compañeros sexuales de la pareja, estado del sistema inmune y estrato socioeconómico, para precisar un análisis epidemiológico más robusto de la población de estudio.

Las estrategias de manejo y control del cáncer de cuello uterino deben orientarse hacia la introducción de protocolos de vacunación que incluyan un amplio espectro de genotipos de VPH, en especial los identificados dentro de la población, con el fin de prevenir la infección por estos tipos virales de manera oportuna.

BIBLIOGRAFIA

Aguayo F., Meneses M., Corvalán A., Muñoz M., Koriyama C., Eizuru Y., Akiba S., Identificación de virus papiloma humano 16 (VPH-16) en carcinoma queratinizante de pulmón. *Rev. Chil. Enferm. Respir.* 18 (2002).

Alonso P., Lazcano E., Hernández M., Cáncer cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control. Editorial médica Panamericana. México 2005, 2da edición (2005). 385.p

ALTS Group, Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: Baseline data from a randomized trial, *J. Nat. Cancer Inst.* 92, 397 (2000).

Álvarez L., Ácidos nucleídos terapéuticos contra cáncer cervical: una alternativa viable. Diciembre (2006) 44-48.

Arias Y., Carrillo E., Aristizábal F., Human papillomavirus (HPV) detected in restored plasma DNA from women diagnosed with pre-invasive lesions and invasive cervical cancer. *Revista Colombia Médica.* 41 (2010) 148-54.

Arteaga A., Virus del papiloma humano situación actual, vacunas y perspectivas de su utilización. (2007).

Brebi P., Lli C., López J., García P., Melo A., Montenegro S., Leal P., Guzmán P., Roa J., Detección y tipificación de virus papiloma humano en adenocarcinoma de cuello uterino mediante reverse line blot, Región de La Araucanía, Chile. *Rev. Méd. Chile.* 137 (2009) 377-382.

Burd E., Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews.* 16, 1 (2003) 1-17.

Cañadas M., Lloveras B., Lorincz A., Ejarque M., Font R, Bosch F., De Sanjosé S., Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud Pública Mex.* 48 (2006) 373-378.

Carrero Y., Callejas D., Estévez J., Gotera J., Núñez J., Atencio R., Porto L., Monsalve F., Relación entre el Herpes simple tipo 2 y las lesiones preinvasivas de cuello uterino. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública* 23, 4 (2006).

Castellanos M., Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. *Revista de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional de México.* 46, 2 (2003).

Castellsagué X., Natural history and epidemiology of HPV and cervical cancer. *Gynecologic Oncology.* 110 (2008) 4 - 7.

Castellsagué X., Muñoz N., Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis – Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 31 (2003).

Castle P., Hillier S., Rabe L., Hildesheim A., Herrero R., Bratti M., Sherman M., Burk R., Rodriguez A., Alfaro M., Hutchinson M., Morales J., Schiffman., An association of cervical inflammation with High-Grade Cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (VPH). *Cancer Epidemiology, Biomarkers y Prevention*. 10 (2001) 1021-1027.

Castle P., Giuliano A., Genital tract infections, cervical inflammation, y antioxidant nutrients – Assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 31 (2003).

Cavazza M., Correti M., Pruebas moleculares para la detección del virus papiloma humano. Desafíos y posibilidades. *Dermatología Venezolana*. 42, 3 (2004).

Chang H., Lin C., Yang C., Liang Y., Yu W., The human papillomavirus -16 (HPV - 16) oncoprotein E7 conjugates with and mediates the role of the transforming growth factor-beta inducible early gene 1 (TIEG1) in apoptosis. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 42 (2010) 1831-1839.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Virus del papiloma humano: Información sobre el VPH para los médicos. (2007).

Chang H., Lin C., Yang C., Liang Y., Yu W., The human papillomavirus-16 (HPV-16) oncoprotein E7 conjugates with and mediates the role of the transforming growth factor-beta inducible early gene 1 (TIEG1) in apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 42 (2010) 1831–1839.

Chuang A., Chuang T., Chang S., Zhou S., Begum S., Westra W., Ha P., Koch W., Califano J., Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 10 (2008).

CONASIDA, División de Prevención y control enfermedades, Ministerio de Salud. Genotipificación del virus papiloma humano en consultantes de los centros de enfermedades de transmisión sexual (CETS) con diagnóstico de Condiloma Acuminado. (2007).

Consuegra C., Molina D., Egea E., Garavito G., El virus del papiloma humano (VPH), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. *Salud Uninorte*. Barranquilla – Colombia. 19 (2004) 3-13.

Correnti M., Medina F., Cavazza M., Rennola A., Ávila M., Fernández A., Human papillomavirus (HPV) type distribution in cervical carcinoma, low-grade, and high-grade squamous intraepithelial lesions in Venezuelan women. *Gynecologic Oncology*. 121 (2011) 527–531.

Cruz G., Bosques O., Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. *Rev. Cubana Obstet. Ginecol.* (2005).

Dane C., Batmaz G., Dane B., Cetin A., Screening properties of human papillomavirustesting for predicting cervical intraepithelial neoplasia in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion smears: a prospective study, *Ann. Diag. Pathol.* 13, 73 (2009).

Del Pino M., Rodríguez L., Alonso I., Torné A., Rodríguez A., Fusté P., Castillo P., Nonell R., Abu N., Ordi J., Clinical, colposcopic and pathological characteristics of cervical and vaginal high-grade lesions negative for HPV by Hybrid Capture 2. *Gynecologic Oncology.* xxx (2011) xxx-xxx.

Ding J., Doorbar J., Li B., Zhou F., Gu W., Zhao L., Saunders N., Frazer I., Zhao K., Expression of papillomavirus L1 proteins regulated by authentic gene codon usage is favoured in G2/M-like cells in differentiating keratinocytes. *Virology.* 399 (2010) 46–58.

Doorbar J., The papillomavirus life cycle, Review. *Journal of Clinical Virology* 32 (2005) 7–15.

Duarte H., Rubio J., Schmalbach J., Asociación de la citología cervico-vaginal inflamatoria con la lesión intraepitelial cervical en pacientes de una clínica de salud sexual y reproductiva en Bogotá, Colombia 1999 – 2003. *Rev. Salud pública.* 6, 3 (2004) 253-269.

Encuesta Nacional de demografía y salud – ENDS [en línea] 2010. [Fecha de consulta: 24 de octubre de 2011] Disponible en: <www.profamilia.org.co/encuestas/Profamilia/Profamilia/documentos/boletines/departamentales/Narino.pdf>

Farfán Y., Detección y genotipificación del virus de papiloma humano en mujeres con lesiones de significado indeterminado (ASCUS) en un programa de tamizaje en un hospital de la ciudad de Bogotá. Trabajo de grado para optar al título de: Magíster Scientiae en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Postgrado Interfacultades, Maestría en Microbiología (2009).

Farfán Y., García A., Arias Y., Morales O., Isaza M., Aristizábal F., Genotipificación del virus de papiloma humano en mujeres con hallazgo citológico de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL) o de significado indeterminado (ASC-US) en Bogotá, Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 39, 1 (2010) 42-54.

Figuroa N., Conocimiento, actitudes y prácticas de la citología cérvico uterina, en mujeres mayores de 15 años en condición de desplazamiento, en el barrio Las Flores; sector Caguan, Chipi y Tambos; del distrito de Barranquilla 2010. Tesis para optar el título de Magíster en Salud Pública. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Programa de maestría en Salud Pública (2011).

Flores M., Virus del Papiloma Humano de alto riesgo, aspectos epidemiológicos de la infección por el virus del papiloma humano. *Bioquímica* [en línea] 2009. [Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2011] Disponible en: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57613001028>>

García A., Schmitt M., Arregui A., Castillo M., Briceño I., Aristizábal F., Genotipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de cepillados cervicales de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá y evaluación de la concordancia de dos métodos basados en PCR. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 61, 4 (2010).

García J., Molina J., Blasco E., El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. *Invest Clin*. 51, 2 (2010) 193 – 208.

García A., Briceño I., Castillo M., Aristizábal F., Detection of gene amplification in MYCN, C-MYC, MYCL1, ERBB2, EGFR, AKT2, and human papiloma virus in samples from cervical smear normal cytology, intrepithelial cervical neoplasia (CIN I, II, III) and cervical cancer. *Colombia Médica*. 42, 2 (2011).

Geraets D., Heideman D., Koning M., Snijders P., Meijer C., Van Doorn L., Quinta W., High genotyping concordance between the digene HPV Genotyping RH Test and the Reverse Line Blot genotyping assay on GP5+/6+-PCR products. *Journal of Clinical Virology*. 46, 3 (2009) 16 – 20.

Geraets D., Lenselink C., Bekkers R., Van Doorn L., Quinta W., Melchers W., Universal human papillomavirus genotyping by the digene HPV Genotyping RH and LQ Tests. *Journal of Clinical Virology*. 50 (2011) 276 – 280.

Gillison M., Shah K., Role of Mucosal Human Papillomavirus in Nongenital Cancers. *J Natl. Cancer. Inst. Monogr*. 31 (2003) 57 – 65.

Gómez P., Pardo Y., Percepciones del uso de anticonceptivos en Bogotá (Colombia) 2009. Estudio cualitativo. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 61, 1 (2010) 34 – 41.

Gravitt P., Peyton C., Alessi T., Wheeler C., Coutlée F., Hildeshei A., Schiffman M., Scott D., Apple R., Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 1 (2000) 357 - 361.

Hausen H., Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account, Minireview, *Virology*. 384 (2009) 260 – 265.

Herrera H., Restrepo P., Revisión de tema: El Virus Del Papiloma Humano y su Relación Con La Neoplasia Cervical Humana. Departamento de Patología. Pontificia Universidad Javeriana. (2003)

Hoory T., Monie A., Gravit P., Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus. *Formos. Med. Assoc*. 107, 3 (2008) 198 – 217.

Instituto Nacional de Cancerología (INC). Recomendaciones para el tratamiento de las pacientes con citología reportada con células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) en Colombia. Bogotá: INC (2007).

Jacobs M., Walboomers J., Snijders P., Voorhorst F., Verheijen R., Franssen N., Distribution of 37 HPV types mucosotropic in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and lowrisk types. *Int. J. Cancer.* 87 (2000) 221 - 7.

Jacobs M., Zielinski D., Meijer C., Voorhorst F., de Schipper F., Ronsink A., Sneijders P., Walboomers J., A simplified and reliable HPV testing of archival Papanicolaou-stained cervical smears: application to cervical smears from cancer patients starting with cytological normal smears. *Br. J. Cancer.* 82 (2000) 1421 - 1426.

Lang A., Wikstrom I., Wilander E., Significance of hpv tests on women with cervical smears showing ascus, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 84, 1001 (2005).

Lazcano E., Herrero R., Muñoz N., Cruz A., Shah K., Alonso P., Hernández P., Salmeron J., Hernández M., Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int. J. Cancer.* 91, 3 (2001) 412 – 420.

López A., Lizano M., Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. México D.F. *Cancerología.* 1 (2006) 31 - 55.

López J., Aristizábal F., Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 35, 1 (2006) 5 - 32.

Marat L., Ácidos nucleicos terapéuticos contra cáncer cervical: una alternativa viable. *Cinvestav.* (2006).

Martel C., Franceschi S., Infections and cancer: Established associations and new hypotheses. *International Agency for Research on Cancer.* 70 (2009) 183 – 194.

Mas A., López C., Cacho I., Gómez J., Martínez M., Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *J. Mol. Biol.* 397 (2010) 865 – 877.

Medina M., Marinic K., Motta P., Sorrentino A., Giménez M., Detección y genotipificación de papilomavirus humano en hombres. *Piel (Barc., Ed. Impr.)* 25, 10 (2010) 561 – 564.

Melo A., Montenegro S., Hooper T., Capurro I., Roa J., Roa I., Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX región-Chile. *Rev. Méd. Chile.* 131 (2003) 1382 – 1390.

Melo A., Roa I., Montenegro S., Capurro I., Roa J., Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Rev. Méd. Chile.* 133 (2005) 639 - 644.

Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología, Empresa Social del Estado. Plan Nacional para el control del Cáncer en Colombia 2010-2019. Bogotá (2010).

Mogollón J., Concordancia diagnóstica entre la citología cervicovaginal, la biopsia de cérvix y la histerectomía en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical en el hospital Erasmo Meoz de Cúcuta, Colombia. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 55, 1 (2004) 23 – 29.

Molano M., Posso H., Weiderpass E., Van den Brule AJC., Ronderos M., Franceschi S., Meijer CJLM, Arslan A., Muñoz N., Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *British Journal of Cancer*. 87 (2002) 324 – 333.

Molano M., Posso H., Méndez F., Murillo R., Van den Brule A., Ronderos M., Muñoz A., Meijer C., Muñoz N., Historia natural de la infección por el virus del papiloma humano en una cohorte de Bogotá, D.C., Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. 9, 4 (2005) 209 – 226.

Molijn A., Kleter B., Quint W., Doorn L., Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections, Review. *Journal of Clinical Virology*. 32 (2005) 43 – 51.

Montoya H., Detección de papilomavirus humano tipos 16, 18, 35 y 58 en cáncer cervicouterino y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado en el occidente de México: correlación clínico molecular. *Ginecol. Obstet. Mex*. 69, 4 (2001) 137 - 142.

Moreno V., Bosch X., Muñoz N., Meijer C., Shah K., Walboomers J., Herrero R., Franceschin S., Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 359 (2002) 1085 - 1092.

Muñoz N., Méndez F., Posso H., Molano M., Van den Brule A., Ronderos M., Meijer C., Muñoz A., Incidence, Duration, and Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Colombian Women with Normal Cytological Results. *The Journal of Infectious Diseases*. 190 (2004) 2077 – 87.

Muñoz N., Bosch X., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K., Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med*. 348, 6 (2003) 518 - 527.

Muñoz N., Franceschi S., Bosetti C., Moreno V., Herrero R., Smith J., Shah K., Meijer C., Bosch X., Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 359 (2002) 1093 – 101.

Murillo R., Molano M., Martínez G., Mejía J., Gamboa O., HPV prevalence in Colombian women with cervical cancer: implications for vaccination in a developing country. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. (2009).

Ministerio de Salud – Dirección General de Promoción y Prevención. Norma Técnica para la atención en planificación familiar a hombres y mujeres de Colombia [en línea]. [Fecha de consulta: 24 de octubre de 2011] Disponible en: <<http://www.nacer.udea.edu.co/pdf/capacitaciones/hc/05pfamiliar.pdf>>

Nyirjesy P., Vulvovaginal Candidiasis and Bacterial Vaginosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 22 (2008) 637 - 652.

Orozco A., Carrillo A., Méndez A., Ponde S., Mohar A., Maldonado R., Guerra R., Flores O., Geographical variation in human papillomavirus prevalence in Mexican woman with normal cytology. *International Journal of Infectious Diseases.* 14 (2010) 1082 - 1087.

Ortiz R., Uribe C., Díaz L., Dangond Y., Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 55, 2 (2004) 146 -160.

Picconi M., Alonio L., Garcia A., Lizano M., Cervabtes G., Distefano A., Mural J., Variantes moleculares de virus papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinomas de cérvix. *Medicina.* 60 (2000) 889 – 894.

Piñeros M., Cendales R., Murillo R., Wiesner C., Tovar S., Cobertura de la citología de cuello uterino y factores relacionados en Colombia, 2005. *Rev. Salud Pública.* 9, 3 (2007) 327 – 341.

Reigosa A., Alvarez M., De Vasconcelo M., Cristina R., Salas W., Rebolledo V., Voldman A., Diagnóstico del virus Papiloma Humano en cuello uterino de mujeres que acuden a su consulta anual citológica. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud.* 8, 1 (2004).

Reynolds J., HPV: A look into new methods for high-risk testing. [En línea] 2011. [Fecha de consulta: 30 de octubre de 2011] Disponible en: <www.mlo-online.com>

Rivera R., Delgado J., Painel V., Barrero R., Larraín A., Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por Virus Papiloma Humano en el epitelio cervical. *Revista Chilena de Obstet Ginecol.* 71, 2 (2006) 135 - 140.

Roja J., García P., Gomez J., Fernández W., Gaete F., Espinoza A., Lepetic A., Suarez E., HPV genotyping from invasive cervical cancer in Chile. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 105 (2009) 150 – 153.

Roberts C., Tadesse A., Sands J., Halvorsen T., Schofield T., Dalen A., Skjeldestad F., Jansen K., Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assays. *Journal of Clinical Virology.* 36 (2006) 277 – 282.

Ruiz J., Burgos R., García L., Sinche M., Almeida F., Detección y genotipificación del Papiloma Virus Humano. Solca-Guayaquil. *Revista científica Colposcopia.* 1,1 (2008).

Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnheim N., Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis of diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230, 4732 (1985) 1350 – 1354.

Sánchez Y., Barrios M., Acosta R., Polo H., Relación citohistológica en mujeres con diagnóstico de papiloma virus humano. *Archivo médico de Camaguey*. 12, 6 (2008).

Sánchez G., Kleter B., Gheit T., Doorn L., de Koning M., Sanjosé S., Alemany L., Bosch X., Tommasino M., Muñoz N., Quint W., Clinical evaluation of polymerase chain reaction reverse hybridization assay for detection and identification of human papillomavirus type 16 variants. *Journal of Clinical Virology*. 51 (2011) 165 - 169.

Sarduy M., Neoplasia intraepitelial cervical. Preámbulo del cáncer cérvicouterino. Artículo de Revisión. La Habana, Cuba (2008).

Sarid R., Gao S., Viruses and human cancer: From detection to causality, *Mini-review. Cancer Letters*. 305 (2011) 218 – 227.

Schneider A., Hoyer H., Lotz B., Leistrizta S., Kühne-Heid R., Nindl I., Muller B., Haerting J., Durst M., Screening for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV. *Int. J. Cancer*. 89 (2002) 529 - 34.

Segovia E., Mendoza L., Tipificación del virus del papiloma humano en muestras cervicales de 15 mujeres atendidas en el Instituto Nacional del Cáncer, Año 2007. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 7, 1 (2009).

Serrano M., Correa M., Medina O., Melgarejo D., Bravo M., Tipificación del Virus del Papiloma Humano mediante secuencia directa en mujeres con citología normal. *Revista Colombiana de Cancerología*. 7, 4 (2003) 18 – 24.

Serrano M., Romero A., Sánchez M., Bravo M., Extracción de ADN, ARN y proteínas de células cervicales provenientes de cepillados cervicales tomados para citología cérvico-uterina. Artículos originales. *Rev. Colomb. Cancerol*. 10, 2 (2006) 117 - 124.

Sideri M., Igidbashian S., Boveri S., Radice D., Casadio C., Spolti N., Sandri M., Age distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology*. 121 (2011) 510 - 513.

Sierra C., Acosta M., Aristizábal L., Papilomavirus y factores asociados a noplasi intraepitelial cervical de alto grado en Cauca, Colombia. *Rev. Salud Pública*. 8, 1 (2006) 47 – 58.

Sijvarger C., Gonzáles J., Prieto A., Messmer A., Malliaci M., Alorio V., Teyssié A., Piccori M., Epidemiología de la infección cervical por virus papiloma humano en Ushuaia, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 38, 1 (2006) 19 – 24.

Solomon D., Davey D., Kurman R., Moriaty A., O'Connor D., Prey M., The Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 267, 16 (2002) 2114 - 19.

Sousa A., Mata G., Camejo M., Citología cervical de trabajadoras sexuales y mujeres del servicio de planificación familiar de la Unidad Sanitaria de Los Teques. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez*. 67, 4 (2007).

Suárez A., Gómez E., Aragón V., De la Garza P., Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales. *Rev. Esp. Quimioterap.* 19, 2 (2006) 161 – 166.

Thierry F., Minireview: Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. Papillomavirus Regulation and Cancer, Institute of Medical Biology, A*Star, 8A Biochemical Grove, Singapore 13648. *Virology.* 384 (2009) 375 – 379.

Turan T., Kalantari M., Cuschieri., Cubie H., Skomeda H., Bernard H., High-throughput Detection of Human Papillomavirus-18 L1 Gene Methylation, a Candidate Biomarker for the Progression of Cervical Neoplasia. *Virology.* 361, 1 (2007) 185 – 193.

Twu N., Yen M., Lau H., Chen Y., Yu B., Lin C., Type – specific human papillomavirus DNA testing with the genotyping array: a comparison of cervical and vaginal sampling. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and reproductive Biology.* 156 (2011) 96 – 100.

Vanegas V., Rubio A., Bedoya A., Sánchez G., Estructura molecular y antigénica de la vacuna contra el virus del papiloma humano 16 (VPH 16). *Acta biol. Colomb.* 13, 3 (2008) 37 – 48.

Van den Brule A., Pol R., Fransen N., Schouls L., Meijer C., Snijders P., GP5+/6+ PCR followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology.* (2002) 779 – 787.

Van Doorn L., Molijn A., Kleter B., Quint W., Colau B., Highly effective detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA by a testing algorithm combining broad-spectrum and type-specific PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44, 9 (2006) 3292 – 3298.

Watts H., Fazarri M., Minkoff H., Hillier S., Sha B., Glesby M., Levine A., Burk R., Palefsky J., Moxley M., Ahdieh-Grant L., Strickler H., Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected woman. *The Journal of infectious Diseases.* 191 (2005) 1129 – 39.

Weaver B., Shew M., Qadadri B., Tu W., Tong Y., Denski C., Fortenberry D., Brown D., Natural history of multiple human papillomavirus infections in female adolescents with prolonged follow-up. *Journal of Adolescent Health* 48 (2011) 473 – 480.

Wensveen C., Kagie M., Veldhuizen R., De Groot C., Denny L., Zwinderman K., Trimboos B., Detection of cervical intraepithelial neoplasia in women with atypical squamous or glandular cells of undetermined significance cytology: A prospective study. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 82, 9 (2003) 883 – 889.

Wentzensen N., Gravitt P., Solomon D., Wheeler C., Castle P., A study of amplicor for HPV DNA detection in the ASCUS-LSIL triage study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 5 (2009) 1341 - 1349.

Yépez M., Hidalgo Á., Burgos M., Guerrero N., Bolaños H., Efecto de la detección temprana de cáncer de cuello uterino en Pasto 1998 – 2005. *Revista Centro de Estudios en Salud*. 1, 8 (2007) 39 – 46.

Zuna R., Wang S., Rosenthal D., Jeronimo J., Schiffman M., Solomon D., Determinants of human papillomavirus – negative, low-grade squamous intraepithelial lesions in the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions triage study (ALTS). *American Cancer Society*. 105, 5 (2005).

ANEXOS

Anexo A. Consentimiento informado para participar en la investigación

	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN	POE: No 1	
	Elaborado por: Claudia Sánchez, Karen Suárez y Milena Guerrero F.	Pág 1	

“Marcadores Moleculares y Epidemiológicos en la Infección por VPH en Mujeres Sisbenizadas de los Estratos 1, 2 y 3 del Municipio de Pasto”

El presente estudio incluirá Mujeres Sisbenizadas y carnetizadas de los estratos 1, 2 y 3 del Municipio de Pasto, en edad reproductiva entre los 18 y 60 años de edad, activas y no activas sexualmente, no histerectomizadas y que no presenten carcinoma cervical.

Información del estudio: El VPH o Virus del Papiloma Humano, es considerado uno de los patógenos más comunes transmitidos sexualmente y es el principal agente causal del Cáncer Cérvico Uterino. El CCU es un tumor maligno que afecta la parte inferior del útero o matriz. Esta dolencia afecta a cerca de medio millón de mujeres en el mundo cada año y mata una mujer cada dos minutos. En el Municipio de Pasto, según el Registro Poblacional de Cáncer, durante el período 1.998 – 2002, el cáncer de cuello uterino ostenta una de las más altas tasas de incidencia.

Actualmente, la mortalidad por cáncer de cuello uterino se concentra en la población no asegurada y en zonas de escaso desarrollo social y económico. Esto se debe entre otras razones, a la poca eficacia de las metodologías de detección empleadas, el bajo impacto de las medidas de prevención y control para infecciones como VPH y en particular a la falta de información en las mujeres consideradas en alto riesgo.

Teniendo en cuenta lo anterior y a fin de dirigir alternativas destinadas al control de la infección y subsecuente enfermedad, la presente investigación plantea estudiar la asociación entre la presencia y el tipo de VPH, algunos indicadores epidemiológicos y el potencial desarrollo de cáncer de cuello uterino en mujeres sisbenizadas y carnetizadas de los estratos 1,2 y 3 del Municipio de Pasto.

Entre los resultados esperados: se podrá analizar la información poblacional junto con la molecular para explicar la infección por VPH, caracterizar la población de riesgo en el municipio de Pasto para la infección por VPH y posterior desarrollo de CCU, la implementación de una metodología molecular para la detección de VPH y generar recomendaciones a los entes encargados de vigilancia y control para el manejo de las pacientes en riesgo de desarrollar CCU en Pasto.

	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN	POE: No 1	
	Elaborado por: Claudia Sánchez, Karen Suárez y Milena Guerrero F.	Pág 2	

*Si usted decide participar en el estudio se le tomará una muestra de cepillado cervical. Para la toma de la muestra se contará con personal debidamente capacitado, así mismo se utilizarán materiales estériles bajo las condiciones de bioseguridad establecidas para éste tipo de procedimientos, de tal forma que el riesgo de afectar su salud es mínimo.

La participación en el estudio es voluntaria y el beneficio que recibirá está representado en la entrega de los resultados de las pruebas individualmente, guardando la confidencialidad de los resultados. La privacidad de la participación será protegida y los resultados serán publicados sin identificación. Si es su deseo podrá retirarse en cualquier momento del estudio.

Si durante la ejecución de éste proyecto apareciera información relevante sobre el tema del estudio, los responsables del proyecto estarán en disposición de ofrecerla a través de medios de comunicación en la Universidad de Nariño Sede Pasto. La participante no cancelará el valor de las pruebas, este costo será asumido por el régimen de aseguramiento al cual está vinculada la paciente.

Si usted decide participar, firmará éste consentimiento haciendo constar que recibió la información correspondiente y que se resolvieron todas las preguntas por lo cual acepta participar en el estudio, además autoriza para que los datos puedan ser utilizados en otros estudios y las muestras procesadas para otros proyectos.

Responsables del manejo de muestras e información incluida al estudio:

Milena Guerrero F.: MsC. Microbiología. Universidad de Nariño

Cristina Santacruz M.: MD. Pasto Salud-ESE

Karen Suárez: Estudiante de Biología. Universidad de Nariño

Claudia Andrea Sánchez: Estudiante de Biología. Universidad de Nariño

	CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	POE: No 1	
	Elaborado por: Claudia Sánchez, Karen Suárez y Milena Guerrero F.	Pág 3	

Yo, _____, identificada con c.c. _____ de _____, leí este documento, comprendí que es un estudio sobre la Asociación entre la presencia y el tipo de VPH con los marcadores moleculares y epidemiológicos y las lesiones en el cuello uterino, que mi participación consiste en donar una muestra de cepillado cervical, y contestar un cuestionario relacionado con mi historia clínica. Comprendí que los resultados de mis exámenes me serán entregados y en caso necesario el médico me remitirá a la IPS donde estoy afiliada. Entiendo que los costos de la consulta médica y de la citología serán asumidos por mi IPS. Manifiesto que estoy de acuerdo en que los resultados de esta investigación sean publicados guardando confidencialidad sobre mi identidad. Declaro que todas las preguntas que hice fueron contestadas y estoy de acuerdo en participar de manera voluntaria en el estudio y puedo retirarme en cualquier momento si es mi voluntad.

Firma de la participante

Fecha

Testigo

Fecha

Testigo

Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado a la Sra. _____, la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

	<p>CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO</p>	<p>POE: No 1</p>	
	<p>Elaborado por: Claudia Sánchez, Karen Suárez y Milena Guerrero F.</p>	<p>Pág 4</p>	

Investigador principal: _____

Sede donde se realizará el estudio: _____

Nombre del participante: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de esta investigación por las siguientes razones: (opcional)

Firma del participante

Fecha

Testigo

Fecha

Testigo

Fecha

Anexo B. Anamnesis y formato de resultados de la citología



HISTORIA CLINICA PREVENCIÓN CÁNCER DE CERVIX
SIS 033

NOMBRE: _____ HISTORIA CLINICA: _____

FECHA: DÍA _____ MES _____ AÑO _____ HORA: _____ NO DE LAMINA: _____

MOTIVO DE CONSULTA: _____

EDAD _____ AÑOS TOMA CITOLOGÍA VAGINAL: PRIMERA VEZ REPETIDA

OCUPACIÓN: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES: _____ PERSONALES: _____

TRAUMÁTICOS: _____ QUIRÚRGICOS: _____

TÓXICOS: _____ ITS: _____ GINECOLÓGICOS: MENARQUIA: _____ AÑOS

CON CICLOS REGULARES , IRREGULARES : _____ X _____ X _____, FECHA DE LA ÚLTIMA MENSTRUACIÓN: _____

SEXARCA: _____ AÑOS, _____ NUMERO DE PAREJAS SEXUALES: _____

MÉTODO DE PLANIFICACIÓN FAMILIAR: _____ TIEMPO: _____

FECHA ÚLTIMA CITOLOGÍA: / _____ / _____ RESULTADO DE LA CITOLOGÍA: _____

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS: G: P: A: C: V: M: FECHA DEL ÚLTIMO PARTO: _____

EXAMEN FÍSICO: PESO: _____ TALLA: _____ T.A.: _____ FC.: _____ FR: _____

CABEZA: _____, CARA: _____

CUELLO: _____

TÓRAX: _____

ABDOMEN: _____

GENITALES: _____

MIEMBROS INFERIORES: _____

ESPECULOSCOPIA: _____

I.DX.: _____

CONDUCTA: _____

PLAN: _____

FECHA PRÓXIMA CITA: DÍA _____ / MES _____ / AÑO _____

FIRMA DE LA USUARIA _____ FIRMA DEL PROFESIONAL _____

C.C. _____ C.C. _____

NÚMERO DE PLACA: _____ FECHA DE TOMA: DÍA _____ MES _____ AÑO _____ LLEGADA AL LABORATORIO: DÍA _____ MES _____ AÑO _____

IDENTIFICACION

TIPO DOC: _____ NO. DOC: _____ NOMBRE: _____
 FECHA NAC. (DD/MM/AAAA): ____/____/____ EDAD: _____ MUNICIPIO: _____ RESIDENCIA: _____
 DIRECCIÓN: _____ BARRIO: _____ TELÉFONO: _____
 AFILIACIÓN SGSSS: CONTRIBUTIVO SUBSIDIADO VINCULADO DESPLAZADO LEY 387 OTRO _____
 IPS: _____ N° DE HISTORIA CLÍNICA: _____

G	P	A	C	FUM	ESTA EMBARAZADA	ESQUEMA	CITOLOGÍA PREVIA:
					SI NO		<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
MÉTODO DE PLANIFICACIÓN						<input type="checkbox"/> PRIMERA VEZ	FECHA ÚLTIMA CITOLOGÍA DÍA _____ MES _____ AÑO _____ RESULTADO: _____
<input type="checkbox"/> DIU <input type="checkbox"/> OTRO _____ <input type="checkbox"/> ANOVULATORIOS <input type="checkbox"/> NINGUNO _____ PROCEDIMIENTOS GINECOLÓGICOS Y MANEJOS PREVIOS <input type="checkbox"/> HISTERECTOMÍA <input type="checkbox"/> RADIOTERAPIA _____ <input type="checkbox"/> HORMONOTERAPIA <input type="checkbox"/> OTRO _____						<input type="checkbox"/> 1-1 <input type="checkbox"/> 1-1-3 <input type="checkbox"/> 3-3 <input type="checkbox"/> FUERA DE ESQUEMA <input type="checkbox"/> DE CONTROL <input type="checkbox"/> REPETIDA EN EL AÑO	

ASPECTOS DE CERVIX

SANO AUSENTE ANORMAL
 OBSERVACIONES: _____ QUIEN TOMÓ LA CITOLOGÍA: _____
 CARGO DE QUIEN TOMO: _____

A. CALIDAD DE LA MUESTRA

RESULTADO DE LA CITOLOGÍA

SATISFACTORIA PARA EVALUACIÓN
 ZONA DE TRANSFORMACIÓN O CÉLULAS ENDOCERVICALES PRESENTES AUSENTES
 OTROS INDICADORES DE CALIDAD: _____
 INSATISFACTORIA PARA EVALUACIÓN
 MUESTRA PROCESADA Y EXAMINADA, PERO INSATISFACTORIA: _____
 MUESTRA RECHAZADA O NO PROCESADA DEBIDO A: _____

B. CLASIFICACION GENERAL

NEGATIVA PARA LESIÓN INTRAEPITELIAL O MALIGNIDAD
 ANORMALIDAD EN CÉLULAS EPITELIALES (VER INTERPRETACIÓN/RESULTADO)
 OTROS _____

INTERPRETACION Y RESULTADO

C. NEGATIVA PARA LESION INTRAEPITELIAL O MALIGNIDAD

D. OTROS RESULTADOS NO NEOPLASICOS

1. ORGANISMOS <input type="checkbox"/> TRICHOMONAS VAGINALIS <input type="checkbox"/> CONSISTENTE CON CÁNDIRA SPP <input type="checkbox"/> FLORA SUGESTIVA DE VAGINOSIS BACTERIANA <input type="checkbox"/> BACTERIAS COMPATIBLES CON ACTINOMICETOS SPP <input type="checkbox"/> CAMBIOS CELULARES CONSISTENTES CON VIRUS HERPES SIMPLE <input type="checkbox"/> BACILO DE DODERLEIN (FLORA NORMAL)	2. CAMBIOS CELULARES REACTIVOS ASOCIADOS A: INFLAMACIÓN (INCLUYENDO REPARACIÓN TÍPICA) <input type="checkbox"/> LEVE <input type="checkbox"/> MODERADA <input type="checkbox"/> SEVERA <input type="checkbox"/> RADIOTERAPIA <input type="checkbox"/> CONTRACEPCIÓN <input type="checkbox"/> CÉLULAS GLANDULARES POST-HISTERECTOMIZADAS <input type="checkbox"/> ATROFIA CON INFLAMACIÓN (VAGINITIS ATRÓFICA) 3. OTRAS <input type="checkbox"/> PRESENCIA DE CÉLULAS ENDOMETRIALES MUJERES > -40
--	---

ANORMALIDADES EN CÉLULAS EPITELIALES

E. CELULAS ESCAMOSAS

F. CELULAS GLANDULARES

<input type="checkbox"/> CÉLULAS ESCAMOSAS ANORMALES (ASC) <input type="checkbox"/> DE SIGNIFICANCIA INDETERMINADA (ASC-US) <input type="checkbox"/> NO PUEDE EXCLUIRSE LIE DE ALTO GRADO (ASC-H) <input type="checkbox"/> LESIÓN INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE BAJO GRADO (LSIL) <input type="checkbox"/> SUGESTIVO DE INFECCIÓN POR HPV <input type="checkbox"/> DISPLASIA LEVE (NIC I) <input type="checkbox"/> LESIÓN INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRADO (HSIL) <input type="checkbox"/> DISPLASIA MODERADA (NIC II) <input type="checkbox"/> DISPLASIA SEVERA (NIC III) <input type="checkbox"/> CON CARACTERÍSTICAS SOSPECHOSAS DE INVASIÓN <input type="checkbox"/> CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS	<input type="checkbox"/> CÉLULAS GLANDULARES ATÍPICAS (AGC) <input type="checkbox"/> CÉLULAS ENDOCERVICALES <input type="checkbox"/> CÉLULAS ENDOMETRIALES <input type="checkbox"/> SIN ESPECIFICAR <input type="checkbox"/> CÉLULAS GLANDULARES ATÍPICAS, POSIBLE NEOPLASIA <input type="checkbox"/> ENDOCERVICALES <input type="checkbox"/> SIN ESPECIFICAR <input type="checkbox"/> ADENOCARCINOMA ENDOCERVICAL IN SITU (AIS) <input type="checkbox"/> ADENOCARCINOMA 6. OTRA NEOPLASIA MALIGNA _____
---	--

OBSERVACIONES: _____

LEYÓ LA CITOLOGÍA: _____ FIRMA (SELLO): _____ REGISTRO: _____ FECHA (DD/MM/AAAA): ____/____/____

Anexo C. Alineamiento iniciador GP6+

Human papillomavirus type 35 isolate
QV31639, complete genome
Length=7908

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6723 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 6702

Human papillomavirus type 35 isolate
QV29782, complete genome
Length=7908

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6723 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 6702

Human papillomavirus type 16 isolate Mac-339
major capsid protein. (L1) gene, complete cds
Length=207

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 47 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 26

Human papillomavirus type 16 isolate Mac-284
major capsid protein (L1) gene, complete cds
Length=211

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 47 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 26

Human papillomavirus type 16 isolate
MI_91_03 L1 protein gene, partial cds
Length=1318

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct1060 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 1039

Human papillomavirus type 16 isolate
MI_598_09 L1 protein gene, partial cds
[gb|JF728162.1](#) Human papillomavirus type 16
isolate MI_771_02 L1 protein gene, partial cds
[gb|JF728169.1](#) Human papillomavirus type 16
isolate MI_494_05 L1 protein gene, partial cds
[gb|JF728171.1](#) Human papillomavirus type 16
isolate MI_34_10 L1 protein gene, partial cds
[gb|JF728172.1](#) Human papillomavirus type 16
isolate MI_368_08 L1 protein gene, partial cds
Length=1318

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1060 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 1039

Human papillomavirus type 16 isolate
MI_479_07 L1 protein gene, partial cds
Human papillomavirus type 16 isolate
MI_2024_10 L1 protein gene, partial cds
Human papillomavirus type 16 isolate
MI_1049_09 L1 protein gene, partial cds
Length=1318

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1060 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 1039

Human papillomavirus isolate B32-gp major
capsid protein L1 (L1) gene, partial cds
Length=147

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 142 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 121

Human papillomavirus isolate B26-GP major capsid protein L1 (L1) gene, partial cds
Length=144

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 139 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 118

Human papillomavirus isolate B14-GP major capsid protein L1 (L1) gene, partial cds
Length=147

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 142 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 121

Human papillomavirus isolate B4-GP major capsid protein L1 (L1) gene, partial cds
Length=143

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 142 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 121

Human papillomavirus type 45 isolate GR4 L1 capsid protein gene,
Length=365

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 172 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 151
Human papillomavirus type 45 isolate GR3 L1 capsid protein gene, partial cds

Length=365

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 172 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 151

Human papillomavirus type 16 isolate GR9 L1 capsid protein gene, partial cds
Length=381

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 177 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 156

Human papillomavirus type 16 isolate GR1 L1 capsid protein gene, partial cds
Length=381

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 177 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 156

Human papillomavirus type 16 strain 86C L1 protein (L1) gene, partial cds
Length=335

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 71 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 50

Human papillomavirus type 16 strain 42C L1 protein (L1) gene, partial cds
Length=335

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 71 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 50

Human papillomavirus type 16 strain 21C L1
protein (L1) gene, partial cds
Human papillomavirus type 16 strain 29C L1
protein (L1) gene, partial cds
Length=335

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 71 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 50

Human papillomavirus type 16 strain 07C L1
protein (L1) gene, partial cds
Human papillomavirus type 16 strain 17C L1
protein (L1) gene, partial cds
Human papillomavirus type 16 strain 19C L1
protein (L1) gene, partial cds
Length=335

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 71 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 50

Human papillomavirus type 16 isolate
Amazonian, complete genome
Length=7915

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6752 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 6731

Human papillomavirus type 16 isolate NC73-
H16 major capsid protein L1 (L1) gene, partial
cds
Length=144
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 48 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 69

Human papillomavirus type 16 isolate A42-H16
major capsid protein L1 (L1) gene, partial cds
Length=151

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 55 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 76

Human papillomavirus type 6 isolate Ir-RRP33
L1 protein (L1) gene, partial cds
Length=139
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 139 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 118

Human papillomavirus type 11 isolate Ir-RRP32
L1 protein (L1) gene, partial cds
Length=139

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 139 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 118

Human papillomavirus type 6 isolate Ir-RRP31
L1 protein (L1) gene, partial cds
Length=139

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 22
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 139 GAAAAATAAACTGTAAATCATA 118

Length=140

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22

Human papillomavirus isolate
06JAN_PHL_MY099_08 L1 capsid protein (L1)
gene, partial cds
Length=409

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 23 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 44

Human papillomavirus type 18 isolate N8 major
capsid protein L1 gene, partial cds
Length=146

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22

Human papillomavirus type 31 isolate N5 major
capsid protein L1 gene, partial cds
Length=147

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22

Human papillomavirus type 16 isolate N10
major capsid protein L1 gene, partial cds
Length=146

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006

Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
Human papillomavirus type 33 isolate IR-ESO-
HPV-33/2 L1 (L1) gene, partial cds
Length=103

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 24

Human papillomavirus type 31 isolate IR-ESO-
HPV-31 L1 (L1) gene, partial cds
Length=103

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 24

Human papillomavirus type 16 isolate IR-ESO-
HPV-16/11 L1 (L1) gene, partial cds
Length=144

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 23

Human papillomavirus type 16 isolate IR-ESO-
HPV-16/10 nonfunctional L1 (L1) gene, partial
sequence
Length=141

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| | |||| | || | || | || | || |
Sbjct 2 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 23

Human papillomavirus type 51 isolate 1 L1 (L1)
gene, partial cds
Length=144
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| | |||| | || | || | || | || |
Sbjct 2 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 23

Human papillomavirus type 33 isolate 3 L1 (L1)
gene, partial cds
Length=103
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| | |||| | || | || | || | || |
Sbjct 3 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 24

Human papillomavirus type 33 isolate 1
Length=138
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| | |||| | || | || | || | || |
Sbjct 2 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 23

Human papillomavirus type 16 isolate N12 L1
protein gene, partialcds
Length=142
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| | |||| | || | || | || | || |
Sbjct 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22

Human papillomavirus type 16 isolate N11
nonfunctional L1 protein gene, partial sequence

Length=141
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| | |||| | || | || | || | || |
Sbjct 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22

Human papillomavirus type 18 isolate F
nonfunctional L1 protein gene, partial sequence
Length=145
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.006
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| | |||| | || | || | || | || |
Sbjct 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22

Human papillomavirus type 16 isolate 12
Length=153
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.091
Identities = 21/22 (95%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 22
||| | |||| | || | || | || | || |
Sbjct 6 TTTGTTACTGTGGTAGATACTA 27

Anexo E. Preparación de reactivos para Reverse Line Blot

SSPE 20X (1000 ml) = 0.2M Na₂HPO₄ 2 H₂O: 35.6g + NaCl: 210.4g + EDTA: 7.4g

SSPE 2X (200 ml) = Tomar 20 ml SSPE 20X + 180 ml de agua destilada

SSPE 2X / 0.1% SDS (100 ml) = Tomar 10 ml SSPE 20X + 1 ml SDS 10% y aforar a 100 ml con agua destilada.

SSPE 2X / 0.5% SDS (200 ml) = Tomar 20 ml SSPE 20X + 10 ml SDS 10% y completar a 200 ml con agua destilada

SSPE 2X (200 ml) = Tomar 20 ml SSPE 20X y aforar a 200 ml con agua destilada.

NaHCO₃ 0.5M (250 ml) = Pesar 10.5gr NaHCO₃ en 240 ml de agua destilada, ajustar pH a 8.4 con NaOH 2M y aforar a 250ml. Esterilizar.

SDS 10% (250 ml) = Pesar 25gr SDS y aforar a 250ml en agua destilada

EDTA 0.5M (300 ml) = Pesar 93.05 gr EDTA + 300 ml de agua destilada y ajustar pH 8.0

EDTA 20mM (300 ml) = Tomar 12 ml EDTA 0.5M y aforar a 300 ml con agua destilada

NaOH 100mM (250ml) = Pesar 1g NaOH (pm = 39.997) y completara 250ml con agua destilada

EDAC 16% (10ml) = Tomar 1.6g EDAC +10 ml de agua destilada

Anexo F. Informe de citologías realizadas por Pasto Salud ESE 2009

INFORME DE CITOLOGIAS REALIZADAS POR IPS PERIODO 2009

ID	NOMBRE_IPS	TOTAL	10 A 19	20 A 29	30 A 39	40 A 49	50 A 59	60 Y +
A1	HOSPITAL CIVIL	1.910	216	538	472	414	181	89
A2	CENTRO DE SALUD PANDIACO	1.132	108	414	272	190	97	51
A3	PUESTO DE SALUD PRIMERO DE MAYO	957	94	259	253	213	93	45
A4	PUESTO DE SALUD MORASURCO	224	25	83	48	37	24	7
A5	PUESTO DE SALUD BUESAQUILLO	385	39	122	102	66	35	21
	NORTE	4.608	482	1.416	1.147	920	430	213
B1	CENTRO DE SALUD LORENZO	4.129	385	1.217	1.067	870	395	195
B2	PUESTO DE SALUD EL ENCANO	660	41	192	160	126	95	46
B3	PUESTO DE SALUD EL ROSARIO	977	89	303	251	196	95	43
B4	PUESTO DE SALUD LA LAGUNA	967	69	278	266	173	118	63
B5	PUESTO DE SALUD CABRERA	347	16	107	88	67	47	22
	ORIENTE	7.080	600	2.097	1.832	1.432	750	369
C1	CENTRO DE SALUD TAMASAGRA	2.772	172	741	797	613	314	135
C2	CENTRO DE SALUD SAN VICENTE	2.278	182	688	593	456	249	110
C3	PUESTO DE SALUD GENOY	250	28	72	66	60	14	10
C4	PUESTO DE SALUD OBONUCO	325	27	87	90	76	25	20
C5	PUESTO DE SALUD MAPACHICO	87	1	21	27	18	18	2
C6	PUESTO DE SALUD VILLA MARIA	67	5	26	14	10	8	4
C7	CENTRO DE SALUD LA CALDERA	199	19	49	52	32	27	20
	OCCIDENTE	5.978	434	1.684	1.639	1.265	655	301
D1	CENTRO HOSPITAL LA ROSA	1.828	153	522	496	390	180	87
D2	CENTRO DE SALUD LA ROSA	1.673	151	512	426	359	153	72
D3	PUESTO DE SALUD CATAMBUCO	953	72	294	256	196	94	41
D4	CENTRO DE SALUD GUALMATAN	207	5	71	66	35	19	11
D5	PUESTO DE SALUD STA BARBARA	773	43	232	229	154	77	38
D6	UNIDAD MOVIL	441	24	119	106	100	63	29
	SUR	5.875	448	1.750	1.579	1.234	586	278
	TOTAL ESE PASTO SALUD	23.541	1.964	6.947	6.197	4.851	2.421	1.161

OFICINA ASESORA DE COMUNICACIONES Y SISTEMAS

Anexo G. Registro Poblacional de Cáncer

Incidencia Cáncer de cérvix in situ-maligno Pasto 1998 - 2007

AÑO	Neoplasia maligna Cuello del útero				Neoplasia in situ Cuello del útero			
	CASOS	POBLACION	TASA CRUDA	TAE	CASOS	POBLACION	TASA CRUDA	TAE
1998-2007	537	1,915,294	28.04	27.76	457	1,915,294	23.86	22.38
1998-2002	263	912,651	28.82	28.12	131	912,651	14.35	13.55
2003-2007	274	1,002,643	27.33	27.39	326	1,002,643	32.51	30.30
1998	47	175,417	26.79	24.65	12	175,417	6.84	5.98
1999	43	179,101	24.01	22.85	22	179,101	12.28	11.85
2000	56	182,269	36.21	35.77	28	182,269	15.36	14.40
2001	49	186,061	26.34	25.67	27	186,061	14.51	13.83
2002	58	189,803	30.56	31.53	42	189,803	22.13	21.30
2003	65	193,715	33.55	35.11	63	193,715	32.52	30.11
2004	66	197,411	33.43	33.34	71	197,411	35.97	33.66
2005	56	200,846	27.88	27.86	81	200,846	40.33	38.40
2006	47	203,874	23.05	22.82	65	203,874	31.88	30.02
2007	40	206,798	19.34	18.78	46	206,798	22.24	20.11

Rates are per 100,000, 23 de Agosto 2011

Rates are per 100,000 and age-adjusted to the World Std Million (18 age groups) standard, 23 de Agosto 2011