

TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO – VPH Y SU RELACIÓN CON  
CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES Y LESIONES EN CÁNCER DE CUELLO UTERINO  
EN MUJERES DEL MUNICIPIO DE PASTO

SINDY NATHALY NICOLA BENAVIDES

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO  
2014

TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO – VPH Y SU RELACIÓN CON  
CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES Y LESIONES EN CÁNCER DE CUELLO UTERINO  
EN MUJERES DEL MUNICIPIO DE PASTO

SINDY NATHALY NICOLA BENAVIDES

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de Biólogo

Directora

MILENA GUERRERO FLÓREZ  
BSc. MSc. Ciencias Microbiología

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO  
2014

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas del autor”.

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

Nota de Aceptación

---

---

---

Milena Guerrero Flórez

---

Directora

Dolly Margot Revelo Romo

---

Jurado

Edith Mariela Burbano Rosero

---

Jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2014.

## AGRADECIMIENTOS

A la universidad de Nariño por brindarme las herramientas necesarias en mi formación profesional.

Al CESUN por la financiación de este trabajo de investigación. A la Dra. María Clara Yépez por su apoyo, respaldo y colaboración.

A la Empresa Social del Estado Pasto Salud ESE, y a Patólogos Asociados LTDA por su compromiso y colaboración en la inclusión de la información y muestras de las mujeres al estudio.

Al departamento de Biología y a todos los profesores que me compartieron sus conocimientos y contribuyeron con mi proceso de formación.

A la profesora Milena Guerrero por su apoyo, su dedicación, la confianza y por permitirme conocer y profundizar en este campo tan maravilloso de la Biología Molecular.

A mis jurados por sus aportes y recomendaciones en el desarrollo de esta investigación.

Al Profesor Álvaro Pazos por su asesoría y colaboración en el inicio de este estudio.

Al Dr. Fabio Aristizábal, a la Dra. Adriana García y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por su colaboración y asesoría en la metodología de RLB.

A cada una de las mujeres que gracias a su participación permitieron el desarrollo de este trabajo.

Al profesor Arsenio Hidalgo por su valiosa asesoría en los análisis estadísticos de esta investigación.

A Claudia y a Karen por su asesoría, apoyo y su acompañamiento en esta investigación.

A mis compañeros Juan Pablo, Vanessa, Diana, Nixon, Carlos, Carolina, Mario, Juan Gustavo, Marcela, Christian por su compañía.

A todos ellos muchas gracias.

## DEDICATORIA

A ti Dios, por darme la fortaleza, la energía y el amor, para culminar esta investigación.

A mis padres José Nicola y Cecilia Benavides, a mis hermanos Ricardo, Diana, David y Mauricio que siempre me apoyaron y creyeron en mí, brindándome su amor y comprensión.

A mis compañeros por toda su ayuda, sus palabras de apoyo, sus consejos y buena energía.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	23
1. OBJETIVOS .....	26
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
2. ESTADO DEL ARTE.....	27
2.1 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO - VPH.....	27
2.1.1 Tipos de VPH y clasificación.....	27
2.1.2 Genoma y estructura del VPH.....	29
2.1.3 Descripción de las regiones del genoma del VPH.....	30
2.1.4 Región de expresión tardía L1 y L2.....	31
2.1.5 Variantes del Virus del Papiloma Humano.....	32
2.2 VPH y Cáncer de Cuello Uterino.....	33
2.3 Historia Natural del CCU.....	36
2.4 Detección y tipificación molecular de VPH.....	38
2.5 Factores de riesgo en CCU.....	41
2.5.1 Número de compañeros sexuales.....	41
2.5.2 Edad de inicio de las relaciones sexuales.....	41
2.5.3 Uso de anticonceptivos orales.....	42
2.5.4 Infección con otros organismos.....	42
2.5.5 Tabaquismo.....	43



2.5.6 Número de embarazos. ....	43
2.5.7 Citología convencional.....	44
3. METODOLOGÍA .....	46
3.1 Descripción de la población de estudio .....	46
3.1.1 Consideraciones éticas.....	47
3.1.2 Criterios de inclusión.....	47
3.1.3 Criterios de exclusión .....	47
3.1.4 Variables poblacionales contempladas en el estudio.....	47
3.1.5 Tamaño de la muestra. ....	47
3.2 Registro de información, inclusión de muestras, transporte y conservación.....	47
3.2.1 Registro de información poblacional .....	47
3.2.2 Análisis univariado.....	48
3.2.3 Inclusión de muestras.....	48
3.3 Procesamiento de muestras para tipificación molecular de VPH.....	48
3.4 Análisis de calidad de las muestras mediante PCR $\beta$ -globina. ....	49
Preparación de muestras para análisis de calidad. ....	49
3.4.1 Evaluación de la calidad de muestras mediante amplificación por PCR/HHB. ....	49
3.4.2 Verificación de los productos de PCR/HHB mediante electroforesis en gel de agarosa.....	51
3.4.3 Interpretación de resultados PCR/HHB.....	51
3.5 Detección y tipificación molecular de VPH.....	51
3.5.1 Tipificación mediante <i>Reverse Line Blot</i> .....	52
3.5.2 PCR-L1 GP5+/GP6+ y Secuenciación de DNA.....	56

3.6. Análisis de resultados.....	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
4.1 Descripción general de la población.....	59
4.1.1 Análisis de las características poblacionales de las mujeres con citología (-) y ASCUS .....	60
4.1.1.1 Características sociodemográficas.....	60
4.1.1.2 Características gineco-obstétricas.....	62
4.1.1.3 Características clínicas.....	66
4.1.2 Análisis de las características poblacionales de las mujeres con lesiones LIEBG, LIEAG y CCU.....	69
4.1.2.1 Característica sociodemográfica: Edad .....	69
4.1.2.2 Característica clínica: Resultado de patología .....	71
4.2 Resultados de detección y tipificación molecular de VPH .....	73
4.2.1 Análisis de la calidad de las muestras mediante amplificación de un fragmento del gen de $\beta$ -globina para toda la población de estudio.....	73
4.2.2 Tipificación de VPH mediante RLB a partir de cepillado cervical.....	74
4.2.3 Tipificación de VPH mediante PCR-L1 GP5+/GP6+Secuenciación de DNA a partir de lisado celular de cepillado cervical y biopsias.....	76
4.2.3.1 Detección y verificación molecular de VPH.....	76
4.2.3.2 Secuenciación de los productos de PCR-L1 y determinación de tipo VPH.....	78
4.2.4 Frecuencia de los tipos de VPH detectados y riesgo oncogénico.....	82
4.2.5 Concordancia entre resultado de citología y PCRL1+Secuenciación.....	84
4.3 Análisis de asociación entre la infección por el VPH, características poblacionales y lesiones en CCU .....	87

4.3.1 Características poblacionales de mujeres con citología (-), ASCUS e infección por VPH.....	87
4.3.1.1 Características sociodemográficas e infección por VPH .....	87
4.3.1.1.1 Edad e infección por VPH.....	88
4.3.1.1.2 Número de compañeros sexuales e infección por VPH .....	89
4.3.1.2 Características gineco-obstétricas e infección por VPH.....	91
4.3.1.2.1 Método de planificación e infección por VPH .....	92
4.3.1.2.2 Otros organismos e infección por VPH.....	93
4.3.1.3 Cambios celulares reactivos asociados a inflamación e infección por VPH....	93
4.3.2 Análisis de las mujeres con lesiones LIEBG, LIEAG, CCU y la infección por VPH.....	94
4.3.2.1 Edad de las mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU e infección por VPH .....	94
4.3.2.2 Lesiones LIEBG, LIEAG, CCU e infección por VPH.....	96
4.3.2.3 Lesiones LIEBG, LIEAG, CCU y tipos de VPH.....	100
CONCLUSIONES .....	102
RECOMENDACIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXOS.....	127

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Marcos abiertos de lectura (ORF) del genoma del VPH.....	30
Tabla 2. Secuencia de primers PCO3/PCO4 para PCR/HHB.....	50
Tabla 3. Mezcla de reacción para PCR/HHB.....	50
Tabla 4. Ciclo de amplificación PCR/HHB.....	51
Tabla 5. Secuencia de los primers GP5+/GP6+.....	52
Tabla 6. Mezcla de reacción para la PCR GP5+/Bio-GP6+.....	53
Tabla 7. Ciclo de amplificación para PCR GP5+/Bio-GP6+.....	53
Tabla 8. Secuencia de las 37 oligosondas usadas para tipificación de VPH mediante RLB.....	54
Tabla 9. Comparación de las condiciones de reacción utilizadas en PCR/L1.....	57
Tabla 10. Número de muestras tomadas en IPS en Pasto-Salud ESE y Patólogos Asociados LTDA. ....	59
Tabla 11. Frecuencias (F) y porcentajes (%) de las características sociodemográficas de las mujeres con citología (-) y ASCUS.....	62
Tabla 12. Frecuencias (F) y porcentajes (%) de características gineco-obstétricas de las mujeres con citología (-) y ASCUS.....	66
Tabla 13. Frecuencias (F) y porcentajes (%) de las características clínicas de las mujeres con citología (-) y ASCUS.....	69
Tabla 14. Frecuencia (F) por edad de las mujeres con lesiones LIEBG, LIEAG y CCU.....	71
Tabla 15. Frecuencia (F) y porcentaje (%) de las lesiones presentes en las mujeres con lesiones LIEBG, LIEAG y CCU. ....	72
Tabla 16. Alineamientos de los controles positivos: VPH 6, VPH 11 y VPH 33.....	79
Tabla 17. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las muestras VPH +.....	81
Tabla 18. Tipos virales encontrados en esta investigación.....	83
Tabla 19. Tabla de contingencia Citología – PCR L1.....	84
Tabla 20. Frecuencia de infección por VPH en relación con edad y número de compañeros sexuales de las mujeres con citología (-) y ASCUS. ....	87
Tabla 21. Frecuencia de infección por VPH en las mujeres con citología (-) y ASCUS que utilizan métodos de planificación y presentan otras infecciones. ....	91
Tabla 22. Frecuencia de la infección por el VPH y algunas variables clínicas.....	93

Tabla 23. Frecuencia de infección por VPH según la edad de las mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU .....	95
Tabla 24. Frecuencias de infección por VPH en mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU.....	97
Tabla 25. Frecuencia de tipos de VPH encontrados en las mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU .....	100

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de secuencias LCR VPH 16.....	28
Figura 2. Genoma del Virus del Papiloma Humano.....	29
Figura 3. Historia natural de la oncogénesis cervical por VPH.....	36
Figura 4. Desarrollo histológico del cáncer de cuello del útero. ....	38
Figura 5. Atipia de células escamosas (ASC-US).....	45
Figura 6. Mapa del Municipio de Pasto, donde se ubican los sitios de inclusión de las muestras. ....	46
Figura 7. Anillamiento de primers PCO3 y PCO4 en el gen $\beta$ -globina humano, posición 13 ntA a 123 ntG.. ....	50
Figura 8. Representación del sitio de anillamiento de los primers GP5+ y GP6+ en el genoma de VPH 18, posición 6.600 ntA a 6.744 ntG.. ....	52
Figura 9. Amplificación del gen de $\beta$ -globina en muestras de cepillado cervical.. ....	73
Figura 10. Amplificación del gen de $\beta$ -globina en muestras de biopsias.....	74
Figura 11. Ensayo de optimización del Mg <sup>++</sup> .....	77
Figura 12. Amplificación del gen L1 del VPH. ....	77
Figura 13. Alineamiento de la secuencia identificada en la muestra UDN 217 mediante Blastn y MegaBlast del NCBI.....	80

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Formato de consentimiento informado.....	127
Anexo B. Formato “Historia clínica prevención de cáncer” .....	132
Anexo C. Formato de resultado de citología.....	133
Anexo D. Ensayo de optimización de Mg <sup>++</sup> para PCR/L1 GP5+/GP6+.....	133
Anexo E. Resultados negativos de Reverse Line Blot.....	135
Anexo F. Alineamiento de las secuencias de muestras de cepillado cervical y biopsia .....	136

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ACI: Anticonceptivos Inyectables  
ACO: Anticonceptivos Orales  
ASCUS: Células Atípicas Escamosas de Significado Incierto  
CCU: Cáncer de Cuello Uterino  
CESUN: Centro de Estudios en Salud de la Universidad de Nariño  
DANE: Departamento Administrativo Nacional de Estadística  
DIU: Dispositivo Intrauterino  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico  
E: del inglés [*Early*] que significa temprano  
ENDS: Encuesta Nacional de Demografía y Salud  
ESE: Empresa Social del Estado  
ETS: Enfermedades de Transmisión Sexual  
FDA: de la sigla en inglés [*Federal Drug Administration*]  
FIDIC: Fundación Instituto de Inmunología de Colombia  
HC2: Captura de Híbridos de segunda generación.  
HSIL: de la sigla en inglés [*High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*]  
IPS: Instituciones Prestadoras de Salud  
INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.  
Kb: Kilopares de Bases  
KDa: Kilo Dalton  
L: del inglés [*Late*] que significa tardío  
LCR: de la sigla en inglés [*Long Control Región*]  
LIEAG: Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado  
LIEBG: Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado  
LSIL: de la sigla en inglés [*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*]  
NASBA: Nucleic Acid Sequence-Based Amplification  
ND10: Dominio Nuclear 10  
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  
NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical  
nm: nanómetros  
NPN: Negativo para Neoplasia  
ORF: de la sigla en inglés [*Open Reading Frames*]  
PCR: de la sigla en inglés [*Polymerase Chain Reaction*]



pRb: Proteína del Retinoblastoma  
RCS: de la sigla en inglés [*The Rapid Capture System*]  
RNAm: Ácido Ribonucleico Mensajero  
RLB: de la sigla en inglés [*Reverse Line Blot*]  
VHS: Virus del Herpes Simple  
VHS-2: Virus del Herpes Simple Tipo 2  
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana  
VPH: Virus Papiloma Humano  
VPH-AR: Virus Papiloma Humano Alto Riesgo  
VPH-BR: Virus Papiloma Humano Bajo Riesgo

## GLOSARIO

**AGENTE ETIOLÓGICO:** Entidad biológica, física o química capaz de causar enfermedad.

**ANOVULATORIO:** Medicamento que impide la ovulación y actúa como contraceptivo.

**ASCUS:** Células escamosas atípicas de significancia no determinada, se utiliza para designar aquellas alteraciones citológicas y cambios atípicos que no pueden ser específicamente clasificadas en la citología como lesiones de alto o bajo riesgo.

**ATROFIA:** En términos biológicos consiste en una disminución importante del tamaño de la célula y del órgano de que forma parte debido a la pérdida de la masa celular. Las células atróficas muestran una disminución de la función pero no están muertas.

**BIOPSIA:** Método médico a fin de obtener una muestra de tejido o un órgano para que los examine un patólogo.

**CÁNCER DE CUELLO UTERINO:** Es una enfermedad por la que se forman células malignas (cancerosas) en los tejidos del cuello uterino.

**CUELLO UTERINO:** Es el extremo inferior estrecho del útero (el órgano hueco, en forma de pera donde se desarrolla el feto).

**CÁNCER IN SITU:** Es el carcinoma que no ha roto la capa basal y, por ello, no se ha extendido desde el sitio de origen hasta los tejidos vecinos.

**CÁNCER INVASIVO:** Cáncer que se ha diseminado más allá del tejido donde empezó y que ha atacado los tejidos sanos que tiene a su alrededor.

**COLPOSCOPIA:** Es un procedimiento médico, destinado a la exploración del cuello del útero o cérvix, mediante la utilización de un colposcopio.

**DISPLASIA:** Trastorno en el desarrollo de tejidos, de órganos o de partes anatómicas, que producen deformidades o incluso anomalías severas compatibles o no con la existencia.

**ENDOCERVIX:** Membrana que recubre la parte interna del cuello uterino. Está formado por un epitelio cilíndrico simple, que produce moco en respuesta a la secreción de estrógenos por el ovario.

**EXOCERVIX:** Es la porción del cuello uterino que está en contacto con la vagina. Está constituido por un epitelio plano poliestratificado.

**FACTOR DE RIESGO:** Circunstancias o situaciones que aumentan las probabilidades a una persona de contraer una enfermedad o cualquier otro problema de salud.

**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:** Es una operación para extraer el útero (matriz) de una mujer.

**LIEBG:** Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado. Células ligeramente anormales diagnosticadas por colposcopia y biopsia.

**LIEAG:** Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado. Displasia moderada a grave, diagnosticada por colposcopia y biopsia.

**METAPLASIA:** Cambio o reemplazo de un tipo de epitelio por otro de la misma clase.

**NEOPLASIA:** Masa anormal de tejido provocada porque las células que lo constituyen se multiplican a un ritmo superior al normal, estas pueden ser benignas o malignas.

**NIC I:** Es considerada una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. Se caracteriza por estar confinada a un tercio basal del epitelio cervical.

NIC II: Es considerada una lesión escamosa intraepitelial de alto grado. Confinada a los dos tercios basales del epitelio cervical.

NIC III: En este tipo de lesión, considerada también de alto grado, la displasia es severa y cubre más de los dos tercios del epitelio cervical. En algunos casos incluyendo todo el grosor del revestimiento cervical.

PCR-L1: Reacción en Cadena de la Polimerasa que permite la amplificación de un fragmento de aproximadamente 150 pb del gen L1 de VPH, utilizando los primers GP5+/GP6+.

PREVALENCIA: Es el número de casos de una enfermedad o evento en una población y en un momento dado.

REVERSE LINE BLOT: Es un ensayo basado en hibridización reversa, que permite la identificación de 37 genotipos de VPH utilizando un sistema miniblotter y una membrana de hibridización, previa amplificación de las muestras por PCR GP5+/GP6+.

VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo oncogénico, asociados al desarrollo de carcinomas invasivos ano-genitales.

VPH-BR: Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo oncogénico, relacionados con lesiones benignas-verrugas y condilomas.

## RESUMEN

En el presente estudio se realizó la tipificación del VPH y se analizó su relación con características poblacionales y lesiones en CCU en una población de mujeres del municipio de Pasto. Se incluyeron mujeres con y sin anomalía citológica procedentes de Pasto Salud ESE y Patólogos Asociados LTDA. La tipificación se realizó mediante *Reverse line blot* y PCR-L1+Secuenciación a partir del lisado celular del remanente de cepillado cervical y biopsias. De las 192 mujeres, el DNA del VPH fue detectado en 1,4% (2/143) de mujeres con citología negativa, en 11,1% (1/9) de mujeres con ASCUS y 34,4 (11/32) mujeres con lesiones en CCU. Los genotipos detectados fueron VPH 6, 16, 33, 45, 58, 73, 97 y 1 no determinado, los VPH-AR representaron el 78,6%, los VPH-BR el 14,3% y los de riesgo indeterminado el 7,1%. La edad, el número de compañeros sexuales, el uso de anticonceptivos, la co-infección con otros microorganismos y los cambios celulares reactivos asociados a inflamación no permitieron explicar la infección por VPH en la población de estudio. Esta investigación nos permitió conocer los genotipos de VPH encontrados en las mujeres con lesiones en CCU, citología negativa y ASCUS. Además, en ésta investigación se obtuvo un fácil protocolo para tipificación de VPH a partir de lisado celular sin extracción previa de DNA, a través de PCR-L1+ Secuenciación, ésta metodología podría ser útil en el seguimiento del cáncer cervical en nuestra población de mujeres y aplicable a otras poblaciones.

Palabras claves: Virus del Papiloma Humano, Cáncer de cuello uterino, Lesión Intraepitelial Escamosa, *Reverse Line Blot*.

## ABSTRACT

In this study, it was analyzed the typing of HPV and its association with lesions and population features in Cervical Cancer. In this study were included 192 women from Pasto, southwestern Colombia, with normal and abnormal cytology belonging to *Pasto Salud ESE* and *Patólogos Asociados LTDA*. The typing was realized with Reverse Line Blot and PCR-L1+Sequencing from cell lysates of the remaining of cervical smears and biopsies. The HPV DNA was detected in 1.4% (2/143) women with negative cytology; 11.1% (1/9) in women with ASCUS, and 34.4 (11/32) in women with lesions in Cervical Cancer. The HPV genotypes detected were 6, 16, 33, 45, 58, 73, 97 and one, which could not determined. The HPV-AR accounted for 78.6%, HPV-BR accounted for 14.3% and, the HPV of undetermined risk accounted for 7.1%. Age, number of sexual partners, use of contraceptives, co-infection with other microorganisms and cell changes reagents associated with inflammation not allowed to explain HPV infection in the study population. This research allowed us to know the HPV genotypes found in women with lesions in CCU, negative cytology and ASCUS. In addition, in this research was obtained an easy protocol for typing HPV from cell lysate without DNA extraction and simply through PCR-L1 + Sequencing, useful in triage of cervical cancer for our women population and maybe with future applying to other populations.

Keywords: Human Papillomavirus, Cervical Cancer, Squamous Intraepithelial Lesion, *Reverse Line Blot*.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia el cáncer de cuello uterino –CCU se considera un importante problema de salud pública y ocupa el segundo lugar después del cáncer de mama. A nivel mundial el CCU afecta a 530.000 mujeres y causa más de 270.000 muertes anuales (WHO, 2013). Según la encuesta nacional de demografía y salud (ENDS), 2010, la incidencia de cáncer para el país es de 5.600 casos nuevos cada año. En países desarrollados se ha logrado reducir la incidencia hasta en un 80% gracias a la utilización de la citología en el tamizaje (INC, 2007). En Colombia los resultados no han sido alentadores por fallas en los programas de tamizaje y en la detección temprana de la enfermedad (Cortes, 2007). Según el Instituto Nacional de Cancerología-INC, en 2010 Colombia registró una tasa de incidencia ajustada por edad de 28,2 por 100.000 habitantes y aunque se ha encontrado un descenso en la mortalidad con una tasa ajustada por edad de 7,0 por 100.000 habitantes, se mantiene como un importante problema de salud pública. En Nariño, entre 2002-2006 se registró una incidencia estimada de 26,4 por 100.000 habitantes, siendo la neoplasia más común que afecta mujeres entre 31-61 años y la tercera causa de muerte por cáncer. En Pasto, la incidencia de neoplasia in situ de cuello del útero entre 2003-2007 fue de 30,3 por 100.000 habitantes según lo reportó el Registro Poblacional de Cáncer de Pasto (RPCMP).

La infección por Virus del Papiloma Humano-VPH ha sido reconocida como el principal factor de riesgo para desarrollar CCU (Stanley, 2001; Bosch *et al.*, 2002; de Larrea *et al.*, 2012). Aunque en ciertos casos la presencia del VPH no es suficiente como agente causal de enfermedad (Bosch *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2004; Mongelós *et al.*, 2013). Algunos factores que predisponen a la neoplasia cervical maligna son la edad de la mujer, el número de compañeros sexuales, la edad de inicio de las relaciones sexuales, el uso de anticonceptivos hormonales, el número de embarazos o gestas, enfermedades de transmisión sexual y el tabaquismo (Stanley, 2001; Chelimo *et al.*, 2013; Luhn *et al.*, 2013;), por lo que se considera que la enfermedad tiene un origen multifactorial, aun cuando está bien documentada la conducta sexual como un factor de riesgo para padecer lesión intraepitelial cervical en la medida en que aumenta la probabilidad de exposición al VPH (Bosch *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2004; Chelimo *et al.*, 2013).

Durante el contacto sexual, los inmunosupresores presentes en el plasma seminal tiene una relación con la génesis del CCU, en razón de que en presencia de

carcinógenos pueden constituir un cofactor para el desarrollo de neoplasias (de Palo *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2012). El uso de anticonceptivos orales u hormonales tiene un papel importante en el riesgo de aparición potencial de la neoplasia cervical en mujeres que los utilizan entre cinco, diez y más años (Ortiz *et al.*, 2004; La Vecchia y Boccia, 2014). Existen regiones de regulación de la transcripción del DNA viral que contienen elementos de reconocimiento hormonal (estrógenos y progesterona), lo que sustenta la influencia de estas hormonas en la potenciación de la expresión de genes de integración viral y consecuente desarrollo de CCU. Otro mecanismo relacionado, es el efecto de estas hormonas sobre determinados genes que intervienen en la regulación del ciclo celular y la apoptosis así como su papel en la inhibición de la efectividad del sistema inmune contra las lesiones inducidas por VPH (Molano *et al.*, 2002; Sarduy, 2008; Castro *et al.*, 2011). La co-infección ha mostrado asociación del CCU con enfermedades de transmisión sexual como sífilis o blenorragia (Bosch *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2004). Existe mayor riesgo de adquirir una infección por VPH tras haber ocurrido una infección previa por VPH de alto riesgo, así dichos genotipos no tengan una estrecha relación filogenética (Méndez *et al.*, 2005; Camargo, 2011; Smith *et al.*, 2014), lo anterior indica además que algunos tipos virales pueden favorecer la presencia de otros tipos de VPH.

Para la detección de alteraciones morfológicas compatibles con la infección por VPH o con otro tipo de anomalías se utiliza la prueba de Papanicolaou o citología. Sin embargo, esta tiene limitaciones importantes como la lectura subjetiva que conlleva a variaciones en la sensibilidad y altas tasas de falsos negativos (Burd, 2003; Cendales *et al.*, 2010). Una de las desventajas más importantes de la citología es la imposibilidad para detectar el virus, descartar la infección mixta y/o tipificar genotipos asociados a eventos precancerosos (Cavazza y Correnti, 2004; Mongelós *et al.*, 2013). Las limitaciones de este examen, repercuten en el adecuado manejo del CCU, por esta razón, es necesario evaluar el uso de pruebas moleculares sensibles que permitan la detección, genotipaje y evaluación de la carga viral de VPH a partir de muestras clínicas, aun si la infección es asintomática ya que de este modo se favorecería la intervención oportuna en aquellas mujeres con alto riesgo de desarrollar cáncer cervical (Gravitt *et al.*, 2000; Geraets *et al.*, 2011; Sánchez y Suarez, 2012).

En la actualidad, se conocen muchas metodologías para la detección y tipificación de VPH tales como *Reverse Line Blot* (RLB) la cual está basada en PCR, hibridación y utiliza oligonucleótidos tipo específico de VPH (Van den Brule *et al.*, 2002; del Pino *et al.*, 2011). Las técnicas basadas en PCR permiten la detección de tipos de VPH, utilizando primers que anilla con una región altamente homóloga entre los tipos de VPH. La tipificación viral es una información muy importante a la hora de categorizar subgrupos de pacientes para el seguimiento de los mismos, así como para realizar el diagnóstico y tratamiento más adecuados (Guglielmo y Rodríguez, 2010). En este sentido RLB ofrece la oportunidad de identificar 37 tipos del VPH, de alto y bajo riesgo (Van den Brule *et al.*, 2002), y la PCR-L1 permite la amplificación de un fragmento de 150 pb del gen L1 de la cápside viral de tipos de VPH que anillan específicamente con los primers GP5+/GP6+ (Burd, 2003; Farfán, 2009), sin embargo, esta reacción debe acompañarse de otra técnica para la tipificación de VPH



permitiendo caracterizar la población de riesgo para la infección por VPH y posterior desarrollo de CCU.

El CCU implica un alto componente comportamental de cada población afectada de manera que resulta importante analizar algunos factores de riesgo documentados para otras poblaciones y confirmar su influencia sobre una determinada población de estudio. El análisis de estas variables y su efecto es de suma importancia para comprender la red de causalidad y potencial progresión a malignidad.

En este contexto, en la presente investigación se evaluó una metodología molecular basada en una adaptación del RLB que consistió en PCRL1+Secuenciación, con el fin de obtener información acerca de la infección por el VPH, los genotipos asociados a las lesiones en CCU y la relación de algunos factores de riesgo como el uso de anticonceptivos orales, el número de parejas sexuales, la edad y la co-infección con otros microorganismos a fin de entender su dinámica en la población de estudio.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar la relación entre el tipo de VPH, características sociodemográficas, gineco-obstétricas, clínicas y lesiones en cáncer de cuello uterino en una población de mujeres del Municipio de Pasto.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la detección y tipificación molecular de VPH en mujeres del municipio de Pasto.
- Determinar la relación entre tipo viral y algunas características sociodemográficas, gineco-obstétricas y clínicas en la infección por VPH y lesiones en cáncer de cuello uterino.

## 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO - VPH

El VPH es considerado un agente infeccioso de transmisión sexual y principal factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de cuello uterino, se ha demostrado su participación en el 99,7 % de los casos de cáncer cervical presentados anualmente (Muñoz *et al.*, 2000; Cuschieri *et al.*, 2005; Farfán, 2009, Chelimo *et al.*, 2013).

Los VPH son virus pequeños, desnudos y aunque el genoma viral puede variar ligeramente entre los diferentes genotipos, en general poseen un genoma de DNA circular de doble cadena con un tamaño de 8 Kb, con un peso molecular de  $5,2 \times 10^6$  Da, codifica ocho o nueve marcos abiertos de lectura (ORFs) los cuales son transcritos como RNAm policistrónicos (Hebner y Laimins, 2006; Doorbar, 2006; Ríos y Ríos, 2010; de Larrea *et al.*, 2012; Burk *et al.*, 2013). El VPH presenta una cápside icosaédrica formada por dos proteínas L (late) de las cuales, la proteína L1 o mayor representa el 80% de la cápside y es considerada como elemento estructural primario; la proteína L2 o menor representa el 20% restante (Howley y Lowy, 2001; Modis *et al.*, 2002; Vanegas *et al.*, 2008; de Larrea *et al.*, 2012). El diámetro de la cápside es de 60 nm aproximadamente, además está constituida por 72 capsómeros pentaméricos que a su vez presentan 5 monómeros de la proteína L1. De los 72 capsómeros, 60 son capaces de interactuar en simetría seis, mientras que el resto lo hacen en simetría cinco (Chen *et al.*, 2000; Modis *et al.*, 2002; Vanegas *et al.*, 2008).

#### 2.1.1 Tipos de VPH y clasificación

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae integrada por 16 géneros, entre los que se destacan los miembros que pertenecen a los géneros Alpha ( $\alpha$ ) papillomavirus y Beta ( $\beta$ ) papillomavirus caracterizados por causar lesiones en las mucosas y piel (de Villiers *et al.*, 2004; Farfán, 2009; Lizano *et al.*, 2009). Se han reconocido más de 170 genotipos de VPH los cuales difieren en el tipo de epitelio que infectan; son epiteliotrópicos es decir, infectan principalmente epitelios estratificados, de estos cerca de 35 tipos de VPH están asociados con lesiones benignas o malignas del tracto ano-genital (de Villiers, 2013). Por la frecuencia con la que se han encontrado en CCU y otros tipos de cáncer relacionados, los VPH se han dividido en tipos de bajo riesgo oncogénico (VPH BR) al que pertenecen los tipos de VPH 6, 11, 26, 34, 40, 42, 43, 53, 54, 57, 61, 66, 72, 81, 83, 84, CP6108 relacionados con lesiones benignas -verrugas y condilomas- y los tipos de VPH de alto riesgo

oncogénico (VPH AR) al que pertenecen VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 70 por su asociación con el desarrollo de carcinomas invasivos anogenitales. De estos últimos se destacan los tipos de VPH 16 y 18 por su alta frecuencia en mujeres con CCU a nivel mundial (Muñoz *et al.*, 2003; de Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2005; Farfán, 2009).

En la actualidad, la clasificación de estos tipos virales se realiza utilizando y comparando la secuencia nucleotídica del gen L1, correspondiente a una de las regiones más conservadas del genoma viral. Se considera como un nuevo tipo viral, cuando se identifica un nivel de variación mayor al 10% en la secuencia de L1 respecto a la secuencia de DNA de los tipos virales previamente clasificados, un subtipo cuando se identifica una variación entre el 10 y 2% y una variante cuando el nivel de variación es menos del 2% (Ríos y Ríos, 2010; Burk *et al.*, 2013). En estos tipos virales se comparten homologías; los miembros de diferentes géneros comparten menos del 60% de la información a nivel de sus secuencias nucleotídicas, las especies de un género comparten una identidad de secuencia entre el 60-70% y los tipos virales de la misma especie comparten entre el 71-89% de homología en el marco abierto de lectura L1 (de Villiers *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta sustituciones nucleotídicas presentes en diferentes regiones del genoma viral, se han definido cinco grupos filogenéticos o variantes: Europeo (E), Asiático (A), Asiático-Americano (AA), Africano 1 (Af1) y Africano 2 (Af2) (de Villiers *et al.*, 2004; Tanzi *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Mendoza *et al.*, 2013, encontraron que en una población de Paraguay, la mayoría de las variantes de VPH 16, pertenecían a la rama Europea (82%), estas variantes se detectaron en 25 de 29 mujeres con LSIL, 22 de 29 mujeres con HSIL, 3 de 4 mujeres con CCU y en todas las mujeres con citología normal. Las variantes detectadas en tal estudio se designaron con las letras PY (Paraguay) y están resaltadas en negrita (Figura 1).

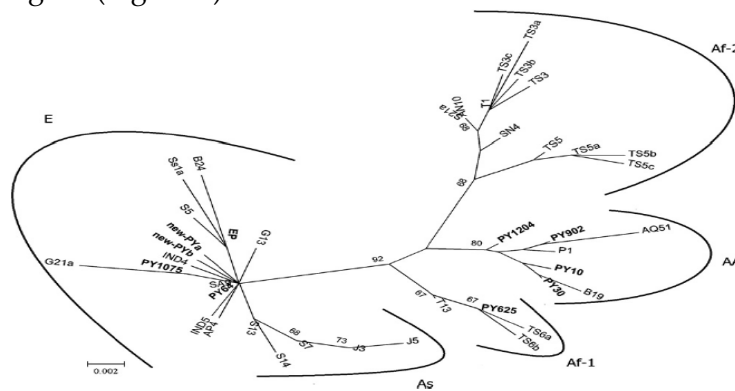


Figura 1. Árbol filogenético de secuencias LCR VPH 16. Construido utilizando 31 secuencias de DNA de referencia de VPH 16. Se identificaron nueve variantes moleculares diferentes agrupadas en tres ramas filogenéticas. Fuente: Mendoza *et al.*, 2013.

La prevalencia global de la infección por VPH en mujeres con citología normal es de alrededor de 11 a 12%, con una prevalencia alta del 16% en América Latina (Bosch *et al.*, 2013). En Colombia, la prevalencia de VPH en mujeres con citología normal reportada inicialmente fue de 14,8%, en la que los tipos de VPH AR más prevalentes fueron VPH 16 (representando el 16,3% de las mujeres con infecciones únicas), VPH 58 (6,2%), VPH 56 (3,6%), VPH 18 y VPH 51 (2,9%) (Molano *et al.*, 2002). Sin embargo, un estudio realizado por Soto *et al.*, 2009, indicó una prevalencia de VPH para Colombia mucho más elevada (49,2%) que la reportada por Molano *et al.*, 2002, encontrando principalmente VPH 16 (46,2%), VPH 18 (14,7), VPH 31 (15,9%), VPH 33 (10,6%), VPH 45 (9,4%) y VPH 58 (5,1%). Entre estos tipos se estima que los tipos virales 16 y 18 son los responsables del 70% de todos los casos de CCU a nivel mundial (Schiffman *et al.*, 2007).

### 2.1.2 Genoma y estructura del VPH

De acuerdo con su función en el genoma, se han identificado 4 regiones diferentes (Figura 2); la región no codificante o reguladora *Long Control Región* (LCR), en donde se localizan las secuencias de DNA que contienen los promotores y sitios de iniciación de la replicación además de los potenciadores, silenciadores y sitios de unión de factores de transcripción; la región conformada por lo genes E1 y E2 que regulan la replicación y la transcripción viral; la región de los genes E5, E6 y E7 que codifican proteínas con alto poder oncogénico o también considerados genes de integración viral y la región de genes que codifican para las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2 (Howley y Lowy, 2001; Longworth y Laimins, 2004; López y Aristizabal, 2006; Vanegas *et al.*, 2008; Ríos y Ríos, 2010; de Larrea *et al.*, 2012).

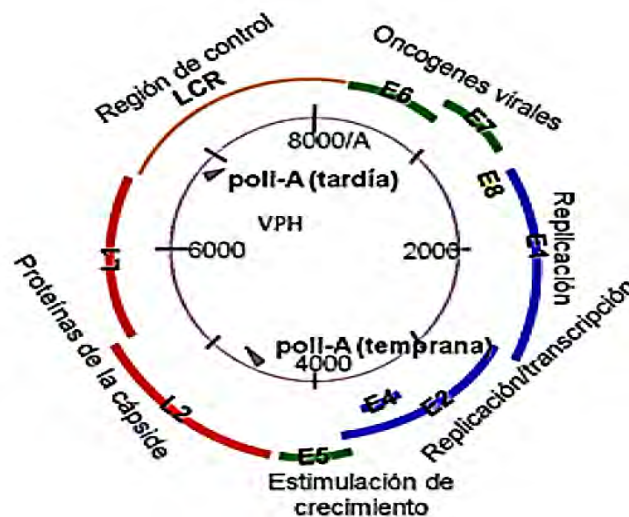


Figura 2. Genoma del Virus del Papiloma Humano. Fuente: de Larrea *et al.*, 2012.

### 2.1.3 Descripción de las regiones del genoma del VPH

La síntesis de las proteínas de expresión temprana (E) como de las tardías (L), es regulada por ORFs de acuerdo a su expresión durante el ciclo de vida viral y ciclo celular. En la Tabla 1, se presentan las principales funciones de las regiones genómicas del VPH (de Villiers *et al.*, 2004; Grillo *et al.*, 2008). De la misma manera las secuencias necesarias para la transcripción y replicación del genoma viral se encuentran localizadas en una región denominada URR no codificante (Longworth y Laimins, 2004; Grillo *et al.*, 2008).

Tabla 1. Marcos abiertos de lectura (ORF) del genoma del VPH.

Proteína viral	Función
E1	Acción helicasa. Replicación viral y control de la transcripción.
E2	Factor de transcripción viral.
E4	Interacción con el citoesqueleto para ensamblaje viral.
E5	Interacción con receptores de factores de crecimiento
E6	Degradación p53. Activación telomerasa. Induce inestabilidad genómica. Interacción con dominios proteicos PDZ.
E7	Degradación pRb. Inestabilidad genómica.
L1	Proteína mayor cápside viral.
L2	Proteína menor cápside viral. Recluta genoma viral para organizarlo en la cápside.

Fuente: Grillo *et al.*, 2008

E1 es una proteína multimérica con actividad ATPasa y helicasa, reconoce sitios específicos denominados regiones de origen de replicación (ori), capaz de formar un complejo de iniciación con la proteína E2 (Rivera *et al.*, 2006). En el VPH 16 se ha observado que esta proteína presenta efectos indirectos en la inmortalización celular (Duarte, 2011).

E2 es una proteína dimérica, que puede ser fosforilada en los residuos aminoacídicos de serina 298 y 301, regulando su unión con E1. Esta proteína tiene actividad represora contra los promotores P97 y P105, encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7, interfiriendo con la síntesis de estas proteínas, sin embargo, su actividad represora se pierde cuando el DNA viral se integra al genoma celular porque ocurre una alteración estructural del marco abierto de lectura de E2 (Rivera *et al.*, 2006; Ríos y Ríos, 2010). E2 facilita la segregación del genoma viral durante la división celular, resultando en la distribución del DNA del virus en las células hijas; además participa en el empaquetado del DNA viral y promueve el ensamblaje de partículas virales (Ríos y Ríos, 2010), además es importante para el mantenimiento del estado episomal del genoma viral (Duarte, 2011).

Las proteínas E1-E4 se sintetizan como proteínas mixtas, involucrando regiones génicas, E1 y E4 son capaces de producir la desestabilización celular, alteración en el potencial de

membrana mitocondrial y la detención del ciclo celular en G2. Por estos mecanismos la célula pierde soporte estructural por alteración del cito-esqueleto, produciendo daño mitocondrial y del metabolismo energético además de apoptosis (Raj *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2006). E4 modula la amplificación de DNA del VPH y la expresión de genes estructurales, además se asocia con el colapso de los filamentos de citoqueratina (Ríos y Ríos, 2010).

E5 es una proteína localizada principalmente en la membrana plasmática celular, capaz de interactuar con algunos factores como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor p185-neu y factor estimulante de colonias, además de estar asociada a la proliferación celular y diferenciación (Rivera *et al.*, 2006). La proteína E5 participa en la amplificación del DNA viral, aumenta la expresión de las moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y por todas estas propiedades se cree que E5 puede favorecer la evasión inmune, además E5 también ha demostrado ser un poderoso oncogén viral (Zheng y Baker, 2006; Ríos y Ríos, 2010).

E6 es una proteína de 150 aminoácidos que liga Zinc, posee una propiedad transcripcional, que le confiere potencial de inmortalización celular debido a la formación de un complejo con p53 y marcaje para su degradación (Lizano *et al.*, 2009). E6 también posee la capacidad de inducir actividad telomerasa, inducir síntesis de DNA mutado y aumentar la integración del DNA viral al genoma de la célula hospedera (Wentzensen *et al.*, 2004).

E7 es una proteína de 100 aminoácidos, ligante de Zinc, puede unirse a la proteína del retinoblastoma (pRB) y alterar su función supresora del crecimiento al controlar factores de transcripción requeridos para la replicación del DNA. Otra función de E7 es la capacidad de inducir inestabilidad genómica (Burd, 2003). E7 también es capaz de interactuar con p60, fomentando el crecimiento independiente del anclaje celular (Stanley, 2001). Durante la infección productiva por el VPH, E6 y E7 facilitan el mantenimiento del episoma viral en las células epiteliales maduras suprabasales, jugando un papel importante en la sobrevivencia celular (Feller *et al.*, 2009; Ríos y Ríos, 2010).

Recientemente se han descrito otros dos genes E3 y E8, los cuales se encuentran en la región de expresión temprana y han sido encontrados sólo en los tipos de VPH 1, 11, 16, 31 y 33 (Alp, 2012). El ORF de E3 no codifica proteínas (Ríos y Ríos, 2010).

#### 2.1.4 Región de expresión tardía L1 y L2

La región tardía está formada por dos ORF, los cuales codifican las proteínas L1 y L2 de la cápside (Duarte, 2011). La región L1 de aproximadamente 1.525 pb codifica la proteína L1. Esta proteína de 57 KDa está compuesta por 504 aminoácidos, y es catalogada como la principal proteína de la cápside debido a su participación en la entrada del virus a la célula hospedera (Vanegas *et al.*, 2008; Duarte, 2011), además de su capacidad de inducir la respuesta inmune protectora. La estructura de esta proteína posee tres regiones bien definidas: el núcleo y los extremos amino y carboxilo. El extremo amino lo componen los primeros 19 aminoácidos, los cuales

cumplen un papel fundamental en el ensamblaje. Algunos estudios sugieren que su estructura tridimensional probablemente es una horquilla  $\beta$  (Modis *et al.*, 2002). La región *core* de esta proteína está formada por los aminoácidos 20 al 382 cuya estructura tiene forma de barril, con 11 láminas  $\beta$  plegadas ( $\beta$ -B1,  $\beta$ -B2,  $\beta$ -C,  $\beta$ -D,  $\beta$ -E,  $\beta$ -F,  $\beta$ -G1,  $\beta$ -G2,  $\beta$ -H1,  $\beta$ -H2,  $\beta$ -I) conectados por medio de bucles expuestos en la superficie del capsómero (Chen *et al.*, 2000).

Todas las regiones hipervariables de L1, se encuentran en la superficie exterior de los pentámeros, esto probablemente debido a la relación que tienen estas regiones en la interacción con las funciones del anfitrión (Chen *et al.*, 2000). Actualmente, se conoce que la proteína L1 contiene sitios de localización nuclear, los cuales son indispensables para la encapsidación del genoma viral (Duarte, 2011).

El gen L2 codifica para la proteína menor de la cápside, la proteína L2 tiene un peso molecular de aproximadamente 49 a 60 KDa, sin embargo, en geles de poliacrilamida migra con un peso aparente de 73 KDa (Duarte, 2011). Se cree que esta proteína puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión, además interviene en la entrada del virus a las células y tiene un papel importante en mediar la infectividad del virus (Modis *et al.*, 2002; de Larrea *et al.*, 2012). Esta proteína es la responsable del escape del genoma viral de la vesícula endocítica y entra con el genoma al núcleo. En el núcleo, el complejo L2-genoma, se ubica en el dominio nuclear 10 (ND10), lo cual es crucial para el establecimiento de la infección (Sapp y Bienkowska, 2009; Ríos y Ríos, 2010).

### 2.1.5 Variantes del Virus del Papiloma Humano

Se ha indicado que uno de los factores virales más importantes en la evolución de la infección y los mecanismos de transmisión de VPH son las variantes de los tipos de VPH, cuya identificación ha traído implicaciones filogenéticas reflejadas en la estrecha evolución que se presenta entre el virus y el hospedero, dando origen a variantes determinadas según las etnias (Tornesello *et al.*, 2011). Se han identificado variantes moleculares para casi todos los genotipos de VPH, los cuales los podemos observar en arboles filogenéticos, cuyas ramas o grupos representan una distribución geográfica específica para alguna de estas variantes (Prado *et al.*, 2005; Vanegas *et al.*, 2008).

El VPH 16 ha sido el tipo viral más prevalente en todo el mundo, por esto es el más estudiado en la identificación de variantes. Hasta ahora se han descrito seis variantes, dos Africanas: Af1 y Af2, una Europea: Eu, una Asiática: As, una Asiática-Americana: AA y la última denominada Norteamericana: NA. Se ha indicado que el VPH 16 tiene una replicación más eficiente que otros tipos de VPH, por lo que se



podrían generar más variaciones genómicas (Camargo, 2011). Además se ha demostrado que la infección con variantes no europeas (Af1, Af2, AA, As y NA) del VPH 16 se encuentra asociada con un aumento de 2-9 veces el riesgo de cáncer cervical y lesiones precursoras de alto grado (Lopera *et al.*, 2012). También se han descrito tres variantes diferentes para VPH 18: una Africana (Af), una Europea (E) y una Asiática-Amerinda (AsAi) (Pista *et al.*, 2007; Camargo, 2011).

Aunque se conoce poco acerca de las implicaciones de estas variaciones biológicas del genoma del VPH en la carcinogénesis cervical, se acepta que pueden ser relevantes en los diversos aspectos del proceso de transformación maligno (Tornesello *et al.*, 2011). Algunas variantes de VPH 16, se encuentran con mayor frecuencia asociadas al carcinoma, en comparación a su prototipo, esto probablemente se explica por la capacidad de las variantes en la evasión del sistema inmune del hospedero (Vanegas *et al.*, 2008). Se pueden encontrar diferencias entre las variantes de VPH, en términos de la patogenicidad y el reconocimiento antigénico por parte del hospedero; en términos de patogenicidad existen diferencias en la persistencia de infecciones. Varios estudios han demostrado que la variante Europea está más asociada a la presencia de infecciones persistentes, mientras que las variantes Africanas y Asiático Americanas, se asocian más, al desarrollo de CCU, probablemente por los cambios en la secuencia de los genes que codifican para E6 y E7 (Vanegas *et al.*, 2008).

Las variantes encontradas para VPH 16 se han identificado en todo el mundo, pero sus frecuencias difieren según la región y las características de la población estudiada (Camargo, 2011). Otro aspecto de importancia en las variantes de VPH 16 se refleja en la relación de estas variantes con algún tipo de lesión en CCU. Un estudio realizado por Lopera *et al.*, 2012, demostró que las variantes asiático americanas están más relacionadas con NIC III y cáncer cervical y se encuentran en muy baja frecuencia en mujeres con lesiones de bajo grado y citología normal. Es así como este y otros estudios, permiten cuestionarse a cerca de la patogénesis de las variantes de VPH en las diferentes etapas del cáncer cervical.

Conocer las variantes de la proteína L1 de VPH, es importante, para determinar la relación entre la variación intratipo, la identificación de las diferencias en la respuesta del sistema inmune y así predecir de alguna manera el efecto protector de las vacunas profilácticas (Vanegas *et al.*, 2008).

## 2.2 VPH y Cáncer de Cuello Uterino

La relación entre las infecciones genitales por VPH y el cáncer cervical, fue demostrado por primera vez, a principios de la década de 1980 por el virólogo

Aleman Zur Hausen, desde entonces la vinculación entre el VPH y el carcinoma cervical de las células escamosas se ha consolidado (Burd, 2003).

Los VPH tienen tropismo por las células epiteliales, es así como pueden producir infección tanto en piel como en mucosas, siendo altamente especie-específicos. En células del epitelio cervical los VPHs pueden encontrarse en forma de episomas, en forma integradas o en forma mixta (ambas). La infección por VPH actualmente es considerada como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo (Longworth y Laimins, 2004; de Larrea *et al.*, 2012). El VPH está relacionado con la producción de un amplio número de lesiones neoplásicas intraepiteliales del tracto genital inferior y cáncer. Otros tumores relacionados con el VPH son los de piel, canal anal, vagina, vulva, pene y oral, se ha estimado que el VPH es responsable del 5,2% de todos los cánceres en el mundo (de Sanjosé *et al.*, 2007; de Larrea *et al.*, 2012). El CCU es el segundo tipo de cáncer más importante en mujeres a nivel mundial (Zur Hausen, 2009). Está demostrado que durante el proceso de carcinogénesis se presentan alteraciones tanto en componentes genéticos, epigenéticos, inmunológicos e infecciosos, además de la interacción entre el medio ambiente y las células (Steben y Duarte, 2007; Farfán, 2009; García *et al.*, 2010).

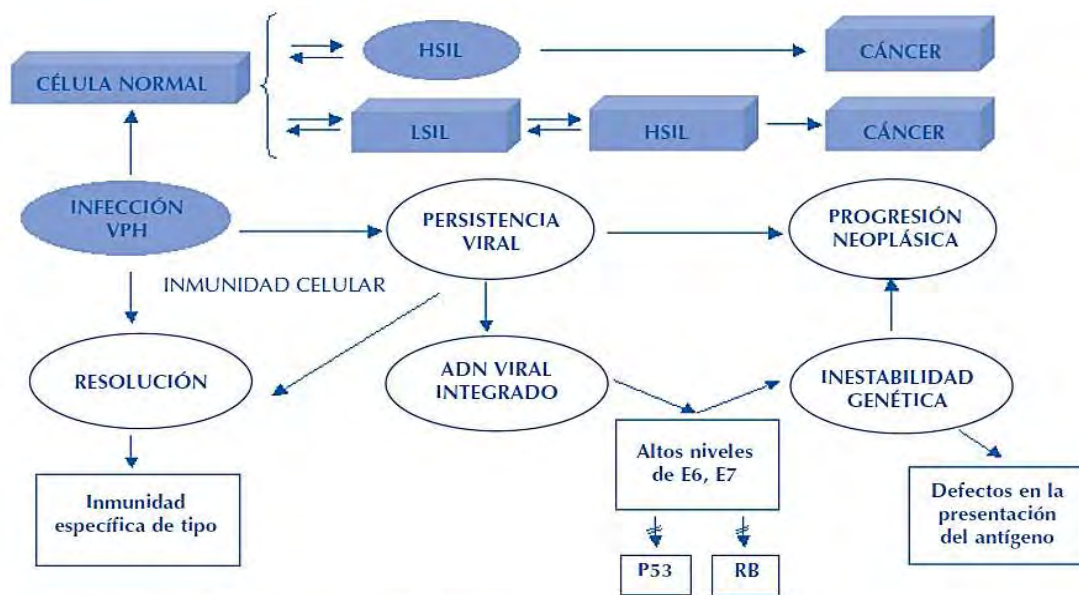
La unión escamo-columnar es el sitio más susceptible y frecuente a la infección por VPH, hasta el 90% de localización del carcinoma (Janicek *et al.*, 2001; Grillo *et al.*, 2008). El microtrauma del epitelio genital, permite la exposición de células basales en activa proliferación a los diferentes tipos de VPH, de este modo se establece la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi-terminal (Rivera *et al.*, 2006). Este receptor ha sido asociado con Heparán Sulfato para los tipos virales 16-33 y con Alfa-6-integrina para VPH 6 (Burd, 2003; Duarte, 2011). Posteriormente, se produce la endocitosis (Bousarghin *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2006), la cual puede estar mediada por complejos proteicos tipo clatrina o caveolinas dependiendo del tipo de VPH (Rivera *et al.*, 2006). Una vez internalizado el virus, la cápside viral sufre degradación, origina capsómeros y monómeros, los cuales se transportan al núcleo junto con pequeños fragmentos del DNA viral, con ello el genoma viral más las proteínas de la cápside se involucran en los procesos de transcripción génica, replicación del DNA y maduración de viriones (Rivera *et al.*, 2006).

Cuando el virus logra penetrar a la célula hospedera inicia la expresión de sus genes E y L, dependiendo del momento en que se inicie el ciclo de replicación viral. El VPH codifica sólo una proteína para la replicación del DNA, la enzima E1 y además de esta, la proteína viral E2, el resto de este proceso, depende exclusivamente de la maquinaria de síntesis del DNA celular. Durante el proceso de integración por lo general ocurre delección o alteración del gen regulador E2, provocando la pérdida del

control negativo de esta proteína, mientras retiene un segmento variable que alberga a los oncogenes E6 y E7 y la región reguladora *upstream*. Los genes implicados en la replicación e integración viral son E6 y E7, los cuales inactivan funcionalmente los productos de dos genes supresores de tumores, el gen p53 y Rb, respectivamente. En condiciones normales, estos oncogenes inducen la proliferación, inmortalización y transformación maligna de las células infectadas por VPH o de aquellas que hayan sufrido alteraciones en alguna de las etapas del ciclo celular. Así, la integración de VPH y la delección o alteración de E2 conduce al aumento en la expresión de los oncogenes virales. La expresión de genes virales está confinada al queratinocito, de tal forma, que estos genes no se expresan en ninguna otra célula, además los niveles de expresión elevada de proteínas virales y el ensamblaje viral, ocurren sólo en los estratos espinoso y granuloso del epitelio escamoso (de Larrea *et al.*, 2012).

Luego de la infección, la replicación de los episomas virales parece ser independiente del ciclo celular y se producen aproximadamente de 50 a 100 copias de virus por célula, este número de copias es mantenido en las células basales indiferenciadas, a través del curso de la infección. En esta etapa la expresión viral es mínima y se tiene control sobre la expresión de los genes virales E6 y E7. Cuando el queratinocito entra en diferenciación sale del ciclo celular, e inicia un aumento en la expresión de los genes virales llegando a un número de 1.000 copias de virus por célula, con abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 e inicio de la expresión de genes tardíos (de Larrea *et al.*, 2012).

El riesgo de progresión a carcinoma cervical está vinculado con la persistencia de la infección, probablemente la carga viral por unidad celular, además de la integración del DNA viral a la célula hospedera y al tipo de VPH, ya que los VPH BR tienden a permanecer en forma episomal, mientras que los VPH AR se integran de forma covalente al DNA de la célula hospedera (Grillo *et al.*, 2008; de Larrea *et al.*, 2012). La historia natural de la oncogénesis cervical por VPH podría seguir el modelo representado esquemáticamente en la Figura 3.



HSIL: Lesiones intraepiteliales escamosas de alto riesgo  
 LSIL: Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo riesgo

Figura 3. Historia natural de la oncogénesis cervical por VPH. Fuente: de Sanjosé y García, 2006.

Estudios prospectivos han demostrado que la infección persistente de VPH AR precede a la aparición de lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales y es necesaria, para el desarrollo, mantenimiento y progresión de estas lesiones. Sin embargo, los mecanismos que determinan si esta infección permanece latente o progresa a lesiones escamosas intraepiteliales, o carcinoma de cérvix, aún no están totalmente claros (García *et al.*, 2011). La integración del DNA viral a la célula hospedera y la pérdida de control negativo de E2, conduce el aumento de expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (Bosch *et al.*, 2002; Grillo *et al.*, 2008, de Sanjosé y García, 2006). Estas proteínas se ligan a los productos de los genes supresores de tumores p53 y Rb respectivamente, degradándolas e inutilizándolas funcionalmente. Estas interacciones en células proliferativas de la unión escamo-cilíndrica con un epitelio inestable, impiden la correcta reparación del DNA, inducen la inestabilidad genómica y aumenta la probabilidad de desarrollar mutaciones específicas, esenciales para la progresión a cáncer invasor (de Sanjosé y García, 2006).

### 2.3 Historia Natural del CCU

El conocimiento del VPH y la historia natural del CCU han permitido el desarrollo de tecnologías para su control, tales como vacunas y pruebas de detección-tipificación o únicamente detección del DNA del VPH, sin embargo no ha sido posible establecer una técnica *gold estándar* que permita concluir de manera definitiva la tipificación, ya que se han encontrado importantes diferencias en la

detección al comparar las diferentes técnicas (Molano *et al.*, 2010). En Colombia están aprobadas dos vacunas para su aplicación por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) quien les otorgó el registro sanitario a estas vacunas: Gardasil, la vacuna tetravalente, que protege contra los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18 y Cervarix, la vacuna bivalente que protege contra los tipos de VPH 16 y 18 y donde la población ideal para vacunación son, niños y adolescentes antes del inicio de las relaciones sexuales (ENDS, 2010).

La historia natural de esta enfermedad involucra la infección viral con el VPH como primer evento, seguida por la progresión gradual de etapas intraepiteliales preinvasoras, tales como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG), que agrupa al NIC I (CIN o displasia leve) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) que agrupa al NIC II-III (CIN II-III o displasia moderada y severa, respectivamente) y carcinoma *in situ*, ver Figura 4. La historia natural del cáncer cérvico uterino inicia cuando la mujer se infecta por el VPH, durante las relaciones sexuales, esta infección se desarrolla con mayor facilidad cuando existe algún cofactor o factor de riesgo involucrado. El VPH ocasiona daños en el epitelio del cérvix, originando lesiones precursoras que pueden progresar a cáncer de no ser tratadas a tiempo (Niño, 2011).

Las lesiones precursoras del CCU constituye un grupo heterogéneo de neoplasias, las cuales se desarrollan por etapas y en forma progresiva, aunque existe la posibilidad de regresión espontánea. Estas lesiones se caracterizan por inmadurez y desorganización celular, anormalidades en el núcleo y una actividad mitótica irregular. De este modo, el grado de neoplasia está determinado por la extensión, proliferación de células inmaduras y la atípia nuclear. Si la zona afectada corresponde al tercio más inferior del epitelio se designa como NIC I y si la zona afectada es del tercio medio o superior se denomina NIC II o NIC III respectivamente (Farfán, 2009).

La tasa de progresión de una NIC se encuentra entre el rango del 6% al 34%, y varía en los diferentes países ya sea debido a los sistemas de detección precoz, por las condiciones socioculturales y/o por los estándares de atención sanitaria (Serman, 2002). Según algunos estudios la NIC I se autoresuelve en cerca del 70% de los casos, caso contrario de la NIC III, que muestra una progresión a carcinoma invasor de hasta 70% y una tasa de regresión de 32% (Serman, 2002). La NIC II muestra tasas de progresión a carcinoma *in situ* o neoplasia más severa de 25% (Holowaty *et al.*, 1999; Serman, 2002, Bosch *et al.*, 2013). Debido a estos diferentes comportamientos se considera al NIC I como LIE de bajo grado y a las NIC II y III como lesiones de alto grado.

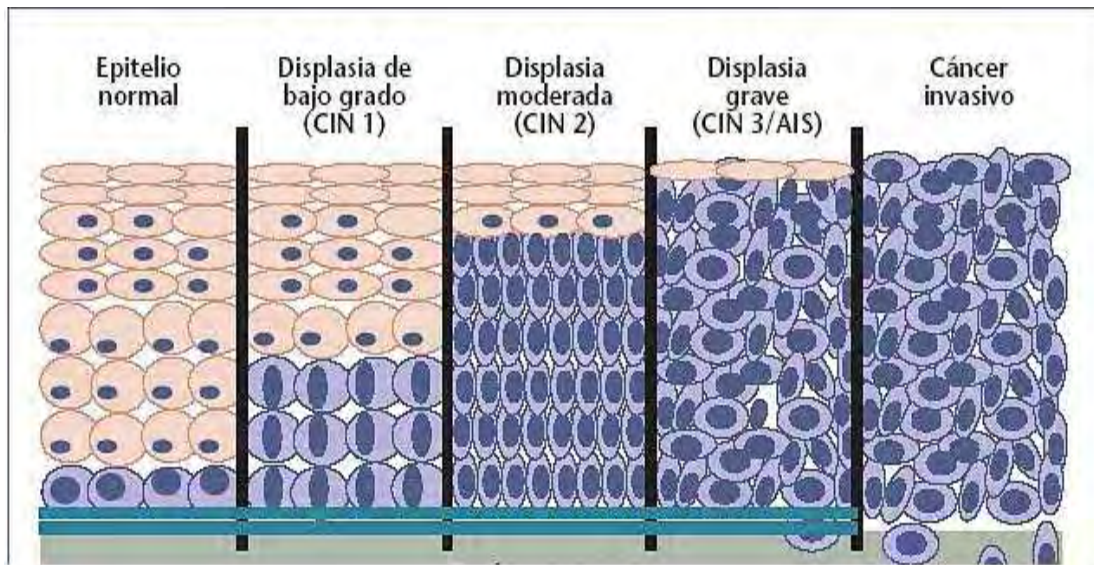


Figura 4. Desarrollo histológico del cáncer de cuello del útero. Fuente: Carretero, 2008

El desarrollo de la historia natural de esta enfermedad es lenta. Deben transcurrir muchos años (10-20 años) desde que se adquiere la infección por VPH, hasta la progresión a cáncer invasivo (Niño E, 2011). Las edades de máxima prevalencia son entre 15 y 30 años para la NIC I, 30 a 34 años para NIC II, y 35 a 49 para NIC III (Serman, 2002). En el desarrollo de esta enfermedad, la mujer por lo general, no presenta síntomas, lo que es una desventaja, aunque existen algunos casos, en la etapa avanzada de esta enfermedad, en la que puede haber dolor cuando el tumor se ha extendido afectando a algunos órganos. También, puede haber hemorragia uterina, secreción vaginal de mal olor por el desarrollo de tejido necrótico (Niño, 2011).

#### 2.4 Detección y tipificación molecular de VPH

Actualmente se dispone de muchas metodologías y procedimientos para la detección y tipificación de VPH, las cuales además de la tipificación viral, en un aspecto más aplicado nos ofrece la oportunidad de categorizar subgrupos de pacientes desde una perspectiva clínica práctica (Melo *et al.*, 2005). Dos de estas herramientas moleculares para el diagnóstico y la tipificación de VPH son el test de Captura de Híbridos - HC2 aprobado por la FDA y la reacción en cadena de polimerasa - PCR, la cual para permitir la tipificación viral debe acompañarse por otra técnica de análisis como hibridación con sondas tipo específicas, análisis de secuencia o análisis de restricción (Burd, 2003). La PCR es una de las técnicas más utilizadas para la detección de tipos de VPH que permite el uso de primers que anillan con una región altamente homóloga entre los tipos virales, que se extiende sobre una región interna

polimórfica, permitiendo la tipificación específica de VPH (Farfán, 2009). En las técnicas basadas en PCR se han utilizado primers consenso Vbg., MY09/11, PGMY09/11, GP5+/GP6+, SPF10, los cuales tienen como blanco secuencias conservadas del genoma de VPH tales como el gen L1 de la cápside viral (Burd, 2003).

Las técnicas basadas en la detección del DNA del VPH son las más precisas, sensibles y específicas para la detección de lesiones pre-malignas, además de su utilidad en la disminución tanto de la mortalidad como de la morbilidad por CCU. Hoy en día existen muchos protocolos, algunos de ellos validados que se utilizan en los laboratorios de todo el mundo para la detección del VPH. Recientemente, se han desarrollado protocolos para la detección de RNA mensajero de E6/E7 y proteínas biomarcadores de transformación (Gutiérrez, 2011).

PCR *Amplicor* fue la primera técnica comercial autorizada por la FDA en 1993, su sensibilidad y especificidad son del 99% y del 98%, respectivamente, esta técnica se basa en la amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación de ácidos nucleicos para la detección de genotipos de VPH AR. Esta técnica, permite la amplificación simultánea mediante PCR del DNA objetivo del VPH y el DNA de  $\beta$ -globina como control celular (Roche). La segunda generación comercial utiliza un analizador (COBAS *Amplicor* PCR) y tiene mayor sensibilidad y especificidad, tanto en muestras de orina como en urogenitales, y tanto en hombres como en mujeres.

Una de las técnicas basadas en PCR más utilizadas para genotipificar el VPH es *Reverse Line Blot* (RLB). Esta técnica utiliza los primers denominados GP5+/GP6+, que amplifican la región L1 de 37 tipos del VPH. En los últimos años, se ha descrito una técnica automatizada basada en arreglos con perlas denominada xMAP® de Luminex®, la cual tiene un principio similar al RLB. Sin embargo, se trata de una técnica mejorada incluyendo 8 primers sentido adicionales y 2 antisentido, denominados BSGP5+/BIO-BSGP6+, además de 1 juego de primers para  $\beta$ -globina denominados MS<sub>3</sub>/MS<sub>10</sub> con el fin de detectar 11 tipos virales más, y la incorporación de un control de calidad de la muestra. La hibridación ocurre en fase líquida mediante el uso de perlas carboxiladas y la detección se lleva a cabo mediante un sistema automatizado, minimizando errores en la interpretación de los resultados (García *et al.*, 2010).

Otra técnica para uso diagnóstico *in vitro*, es la HC2 High-Risk HPV DNA Test, con la tecnología Hybrid Capture 2 (HC2) es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos mediante amplificación de la señal y uso de quimioluminiscencia en microplaca para la detección cualitativa de 13 tipos de VPH AR en muestras cérvicouterinas (QUIAGEN, 2008). Recientemente se ha desarrollado una plataforma

automatizada para HC2 llamada *The Rapid Capture System (RCS)*, que consiste en un procesador robotizado de microplacas de 96 pozos que permite analizar un total de 352 muestras (4 microplacas) en un tiempo óptimo de 8 horas (Gutiérrez, 2011). En este sentido cabe mencionar un nuevo formato de la prueba de captura (HC3), que permite detectar y discriminar infecciones por tipos virales relacionados, como VPH 18 y 45 o 16, 31 y 35. Presenta mayor especificidad debido al uso adicional de la sonda de oligonucleótidos de captura marcados con biotina, que hibridan en regiones de secuencia únicas del DNA de genotipos blanco. La HC3 es tan sensible como HC2, sin embargo, es más específica en la detección y diferenciación de estos genotipos (Gutiérrez, 2011).

Otra técnica molecular es la detección de RNAm de E6/E7 y la presencia de actividad oncogénica en muestras cervicales, que puede ser efectuada mediante NASBA Real Time (Nucleic acid sequence-based amplification). Este método tiene como ventaja la detección y genotipificación simultánea con lo cual se minimiza el riesgo de contaminación. Se trata de un método estandarizado, disponible comercialmente, además cuenta con la aprobación de la comunidad europea, la principal ventaja de este tipo de detección es el valor clínico predictivo. La detección de RNAm puede ser efectuada también por técnicas *home made* como la RT-PCR (Gutiérrez, 2011).

Es importante mencionar que la comunidad científica hoy en día se está enfocando en el estudio de las proteínas (proteómica), como una herramienta para la investigación del origen, desarrollo y prevención de enfermedades incluyendo cáncer. Las alteraciones en la expresión de proteínas producto de las transformaciones malignas, pueden ser monitoreadas mediante el análisis de los perfiles proteicos que a su vez brindan información para un pronóstico y diagnóstico más efectivos. Por tanto, la proteómica del cáncer incluye el análisis cuantitativo y cualitativo de las proteínas expresadas diferencialmente (biomarcadores) de los tejidos normales, pre-malignos y malignos. Los biomarcadores actualmente desarrollados pueden agruparse como sigue: (1) Marcadores de expresión de oncogenes de VPH (RNAm y proteínas), (2) Marcadores de proliferación celular (Ki-67, TOP2a, y p16) y (3) Marcadores de inestabilidad cromosómica (aumento del brazo del cromosoma 3q) (Gutiérrez, 2011). Con relación a la proteómica p16, es el candidato más prometedor como biomarcador, ya que se trata de una proteína del ciclo celular que se expresa en relación con la quelación de pRb, por la acción de la oncoproteína E7, por lo que su expresión se relaciona directamente con la infección de VPH AR (Wentzensen *et al.*, 2006; Gutiérrez, 2011).

Sin embargo, aunque muchos de estos métodos son costosos y laboriosos, es importante evaluar su introducción en el tamizaje del CCU por lo que recientemente se han descrito métodos de tipificación basados en PCR que deben acompañarse de



otros procedimientos para determinar el tipo viral, una de estas metodologías es la anteriormente mencionada *Reverse Line Blot* (RLB) (Farfán, 2009).

## 2.5 Factores de riesgo en CCU

La detección de VPH AR es necesaria, pero no suficiente para determinar el riesgo de desarrollar cáncer cervical. Muchos estudios demuestran que la progresión a cáncer cervical depende de una variedad de factores adicionales, sin embargo, existe una fuerte evidencia epidemiológica y bioquímica compatible, respecto a la asociación de infección por parte de determinados subtipos de VPH AR (como son VPH 16, 18, 31, 33 y 45) con el desarrollo posterior de CCU (Chen *et al.*, 2000; Stanley, 2001). Otros factores importantes en el desarrollo de cáncer cervical, son: el número de compañeros sexuales, edad de inicio de las relaciones sexuales, uso de anticonceptivos orales, infección con otros organismos de transmisión sexual, el hábito de fumar y la paridad múltiple (Burd *et al.*, 2003).

2.5.1 Número de compañeros sexuales. Estudios epidemiológicos han revelado que el riesgo de contraer una infección genital por VPH y posterior desarrollo de CCU esta mayormente influenciada por la actividad sexual (Burd, 2003). La conducta sexual presenta una relación directa con el riesgo de padecer lesión intraepitelial cervical en la medida en que aumenta la probabilidad de exposición al VPH (Bosch *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2004). La promiscuidad sexual del hombre también es un factor de riesgo ya que en sus múltiples contactos sexuales se contamina con el VPH que transmite después a su pareja. En población de trabajadoras sexuales la frecuencia de VPH AR es 14 veces más alta que en la población general (Bosch *et al.*, 2002).

2.5.2 Edad de inicio de las relaciones sexuales. La actividad sexual a temprana edad también supone una persona en mayor riesgo. Se han reportado hasta 7,2 neoplasias malignas del cuello uterino en las mujeres que iniciaron sus relaciones en la adolescencia, respecto a cada cáncer cervical detectado en mujeres que lo hicieron en edad adulta (Rosell *et al.*, 2007). Autores como Pachón del Amo, 2007, plantean que la frecuencia de infección por el VPH está asociada a la edad, y resulta ser más alta en las edades al inicio de las relaciones sexuales (entre los 15-25 años de edad) relacionado con el patrón de la actividad sexual. En la adolescencia los tejidos cérvicouterinos resultan ser más susceptibles a los carcinógenos y si además existe un agente infeccioso relacionado, el tiempo de exposición a este será mayor, además se cree que la exposición a factores de riesgo cuando el primer contacto sexual se tiene a los 17 años o menos, es 2,4 veces mayor que cuando se lo ha tenido a los 21 años (Delgado *et al.*, 2011).

2.5.3 Uso de anticonceptivos orales. Uno de los cofactores asociados repetidamente con el riesgo de desarrollar neoplasias relacionadas con el VPH, es el uso prolongado de las hormonas esteroides. Algunos autores señalan que los anticonceptivos orales pueden actuar junto con los agentes que se transmiten sexualmente como el VPH, en el desarrollo de cáncer cervical (Sarduy, 2008). Existen regiones de regulación de la transcripción del DNA viral que contienen elementos de reconocimiento hormonal, lo que influye en la transcripción génica del virus y en la expresión de dos genes de integración viral el E6 y el E7. Estas hormonas tienen efectos sobre determinados genes que intervienen en la regulación del ciclo celular y la apoptosis así como su papel en la inhibición de la efectividad del sistema inmune contra las lesiones inducidas por VPH (Sarduy, 2008; Castro et al., 2011). Investigaciones epidemiológicas sugieren que tras un diagnóstico de displasia, en aquellas mujeres que utilizan anticonceptivos hormonales, la progresión a carcinoma in situ es más rápida (Molano et al., 2002).

2.5.4 Infección con otros organismos. Se ha reconocido la infección por *Chlamydia* como un importante factor de riesgo para la infección y progresión al cáncer asociado con VPH. Otros agentes biológicos causantes de enfermedades cérvicovaginales son: hongos como *Candida albicans*; protozoarios como *Trichomonas vaginalis*; bacterias entre ellas *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* y virus como el VPH y el virus del herpes simple (Navarro y Marin, 2010).

La presencia de *T. vaginalis* se asocia a la aparición de la infección por VPH y puede actuar como transportador de partículas virales hacia el interior de las células del epitelio vaginal. Existe una fuerte asociación entre la trichomoniasis y la neoplasia cervical y se considera que 2 a 4% de todas las neoplasias cervicales son consecuencia de la co-infección por *T. vaginalis* (Rojas et al., 2004).

Por otro lado, la candidiasis vulvovaginal, causada por *C. albicans* es más común en mujeres embarazadas y con otros factores predisponentes. Las infecciones pueden ser por modificación de la microbiota vaginal o por disminución de las defensas inmunitarias del hospedero, uso de anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal (García et al., 2006; Navarro y Marin, 2010).

Dentro de las infecciones encontradas en muestras cérvico-vaginales se tiene la vaginosis bacteriana que es una infección asociada con la alteración de la microbiota normal, condición que influye en el riesgo a padecer alguna otra ETS, VIH y complicaciones como enfermedad inflamatoria pélvica (Muñoz et al., 2009). En la lectura por citología la sensibilidad para la detección de la vaginosis bacteriana varía del 55% al 93% y la especificidad varía del 94% al 98% en comparación con la valoración de tinción Gram (Denslow et al., 2013).

Se considera la infección por VPH y el Virus Herpes Simplex-VHS como factores iniciadores de la acción carcinogénica, así como otras ITS, entre las cuales están, los condilomas, *Trichomonas*, Chlamydias y sífilis (Álvarez, 2008). Existen estudios que no han podido demostrar una relación directa entre VHS-2 y cáncer cervical, sin embargo, otros autores han indicado que el VHS-2 en co-infección con virus del papiloma humano, se convierte en un factor potencial de riesgo en el desarrollo de cáncer cervical (Carrero *et al.*, 2006).

La actinomicosis es una enfermedad causada por *Actinomyces*, caracterizada por la formación de abscesos, fistulas y tejido denso fibroso. Actualmente se discute si la bacteria que causa esta enfermedad es o no un saprofito de la vagina. Tiene como signo macroscópico visible la formación de gránulos de azufre en el pus o tejido comprometido (Navarro y Marín, 2010). Aparentemente el papel patógeno de *Actinomyces* no es trascendente en el cuello uterino, sin embargo se ha manifestado como un factor importante en la etiología de la enfermedad pélvica inflamatoria (Alonso, 2005).

2.5.5 Tabaquismo. El consumo de cigarrillo se relaciona con un mayor riesgo de padecer cáncer de cérvix (Stanley, 2001). En un estudio realizado por Rosell *et al.*, 2007; reportaron que el CCU es más frecuente dentro del grupo de mujeres con el hábito de fumar con respecto a aquellas mujeres sin este hábito. La exposición al tabaco puede afectar la habilidad del hospedero para mantener una respuesta inmune local efectiva contra la infección viral, ya que como se ha reportado en la literatura, el hábito de fumar, puede reducir el número de células de Langheran y otros marcadores de función inmunológica, además fumar expone al cuerpo a numerosas sustancias químicas cancerígenas que afectan otros órganos diferente a los pulmones, al respecto se han detectado subproductos del tabaco en la mucosidad cervical de mujeres fumadoras (Delgado *et al.*, 2011).

2.5.6 Número de embarazos. El número de embarazos, favorece la aparición de cáncer, ya que la mujer en esta etapa tiene cierto grado de inmunosupresión y por ello mientras más veces se encuentra bajo esta condición, mayor es la posibilidad de infección por VPH y consecuente progresión a cáncer (Delgado *et al.*, 2011). Así, las mujeres que han tenido muchos embarazos completos, se exponen a un riesgo mayor de padecer CCU, no se conoce realmente la razón de esto, pero, según la Sociedad Americana contra el Cáncer., 2013, considera que puede deberse a una mayor exposición al VPH por medio del contacto sexual sin protección así como a la afectación de los tejidos implicados en este proceso.

2.5.7 Citología convencional. El principal método de tamizaje de VPH siendo la prueba de Papanicolaou-manchado, llamado así por el patólogo George Papanicolaou, quien dio a conocer este método en 1949, antes de que se conociera la causa del CCU (Papanicolaou, 1949; Burd, 2003). La prueba de Papanicolaou (Pap) es una herramienta de evaluación que busca cambios en las células de la zona de transformación del cuello uterino (Burd, 2003). Para la clasificación de las lesiones, la prueba de Papanicolaou se apoya en el sistema de información Bethesda que fue introducido en 1988, con el cual se evalúa la arquitectura del tejido para dar un informe descriptivo con la terminología de diagnóstico (Burd, 2003). Esta prueba tiene una especificidad de 95% y una sensibilidad de 75%, su repetición puede disminuir la tasa de falsos negativos de 1 a 2% (Rodríguez *et al.*, 2009).

Con la citología una evaluación anual de manera óptima permitiría prevenir hasta un 70% de las neoplasias cervicales. Sin embargo, el método tiene limitaciones importantes entre las cuales se tiene el impedimento de una automatización completa de la técnica, variaciones constantes de la sensibilidad, debido al error del muestreo donde pocas células son colocadas en el frotis, altas tasas de falsos positivos y negativos alrededor de un 20-30%, el error humano en la toma de las muestras y la interpretación subjetiva (Burd, 2003; de Larrea *et al.*, 2012). Otro problema asociado a la citología, son los reportes de ASCUS, que significa, células atípicas escamosas de significado indeterminado, ver Figura 5, su reporte varía de 5-10% de las pruebas de Papanicolaou. Este hallazgo citológico es sugestivo pero no concluyente de la lesión escamosa intraepitelial, lo que genera incertidumbre en la decisión a tomar (de Larrea *et al.*, 2012). En el sistema Bethesda el término ASCUS, se ha indicado para clasificar aquellas alteraciones citológicas equivocadas las cuales no permiten descartar la presencia de una lesión intraepitelial, pero tampoco es suficiente para determinar la presencia de alguna de estas lesiones (de Sanjosé y García, 2006).



Figura 5. Atipia de células escamosas (ASC-US). Célula con núcleo crecido dos y medio veces su tamaño normal, pero sin reforzamiento de la membrana nuclear.

Fuente: Alonso *et al.*, 2005.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Descripción de la población de estudio

Este estudio se realizó en un periodo de dos años, en el cual se incluyeron mujeres sin anomalía citológica que aceptaron participar en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado, quienes cumplieron con los criterios de inclusión, pertenecientes a la Empresa Social del Estado Pasto Salud-ESE. Para la inclusión de estas muestras, de las 23 IPS pertenecientes a Pasto Salud ESE se seleccionaron 8 IPS al azar distribuidas en cuatro zonas: norte, sur, oriente y occidente del municipio de Pasto. La muestra para los análisis de laboratorio consistió en el remanente del cepillado cervical (muestra fresca).

La selección de la población de mujeres con anomalía citológica se realizó a través de una exhaustiva revisión de todos los reportes de patología en un periodo de 24 meses hasta diciembre de 2013. Se incluyeron 32 biopsias de mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión, provenientes de Pasto y diagnosticadas con algún grado de anomalía LIEBG y LIEAG para CCU en Patólogos Asociados LTDA.

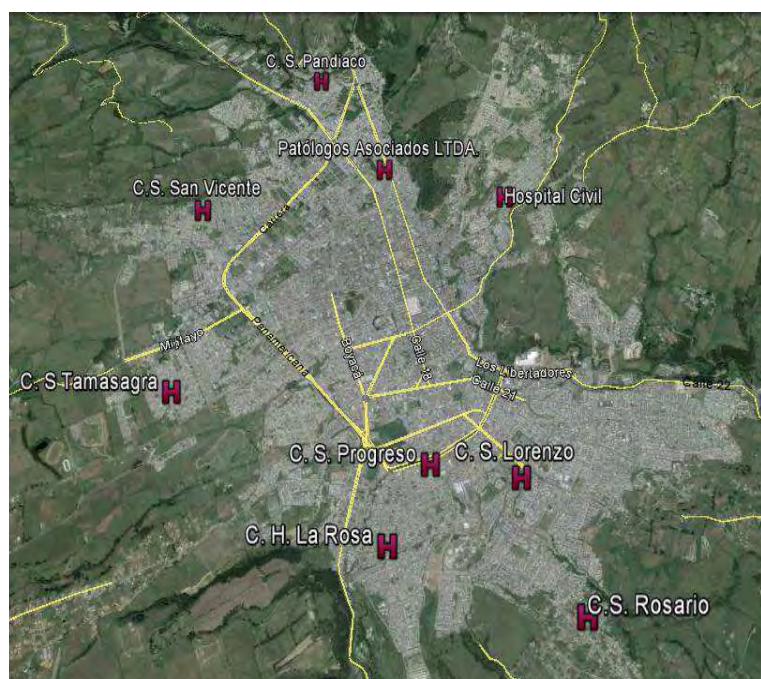


Figura 6. Mapa del Municipio de Pasto, donde se ubican los sitios de inclusión de las muestras. Fuente: Google Earth.

3.1.1 Consideraciones éticas. Para todos los procedimientos se tuvieron en cuenta los aspectos éticos y legales de la investigación en seres humanos: Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia. Los formatos de consentimiento informado y retiro voluntario (Anexo A), se sometieron debidamente y fueron avalados por los comités de ética de las instituciones participantes. Para el registro de la información poblacional se manejaron normas de estricta confidencialidad dado que los datos fueron obtenidos a partir de las historia clínica prevención de cáncer (Anexo B) y formatos de resultado de citologías (Anexo C) e informe de patología, debidamente validados por Pasto Salud ESE y Patólogos Asociados LTDA, respectivamente.

3.1.2 Criterios de inclusión. Mujeres en el rango de 18 - 80 años de edad, activas y no activas sexualmente, no hysterectomizadas con y sin carcinoma cervical.

3.1.3 Criterios de exclusión. Mujeres hysterectomizadas y fuera del rango de edad.

3.1.4 Variables poblacionales contempladas en el estudio.

- Clínicas: Resultado de la citología, resultado del informe de patología
- Sociodemográficas: Edad y número de compañeros sexuales
- Ginecobstétricas: Uso de anticonceptivos orales y co-infección
- Variables de laboratorio: Detección y tipificación molecular de VPH *Reverse Line Blot* (RLB), PCR L1+Secuenciación.

3.1.5 Tamaño de la muestra. Se estimó con base en el marco de muestreo calculado para el estudio macro titulado “Marcadores moleculares y epidemiológicos en la infección por VPH y su relación con el CCU en mujeres sisbenizadas del Municipio de Pasto”. Para tal investigación, para definir el  $n$  de mujeres sanas se tomó como base el nivel de cobertura de citologías reportada por Pasto Salud ESE para el Municipio de Pasto en los años 2008-2009 y se calculó de 616 muestras, con un 95% de confianza. Para efectos de esta investigación se incluyó un  $n=160$ . Para obtener el tamaño de muestra de mujeres con anormalidad citológica se realizó la revisión de todos los reportes de patología de los años 2012-2013 remitidos a Patólogos Asociados LTDA, de los cuales se encontraron 32 muestras de mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión. Para un total de muestras analizadas de 192.

3.2 Registro de información, inclusión de muestras, transporte y conservación

3.2.1 Registro de información poblacional. Con la información proveniente de la historia clínica *prevención de cáncer*, formato de resultados de citologías y revisión

del informe de patología, se construyó una base de datos en Excel® y se consignó la información de las siguientes variables poblacionales: edad, número de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales, co-infección con otros organismos, resultado de las citologías, resultado de patología y resultados de tipificación molecular mediante RLB y PCR-L1+ Secuenciación.

3.2.2 Análisis univariado. La unidad de análisis estuvo representada por cada una de las mujeres ingresadas al estudio. Con la información de las variables sociodemográficas, ginecoobstétricas, clínicas y de laboratorio se realizó un análisis descriptivo univariado, los resultados se presentan en tablas de distribución de frecuencias y porcentajes.

3.2.3 Inclusión de muestras. A partir de mujeres sin anormalidad citológica se tomó una muestra de cepillado cervical con citocepillo estéril, bajo los procedimientos validados en las instituciones de salud. Esta muestra se utilizó para dos propósitos:

- (i) A partir de la muestra de cepillado cervical se realizó un extendido en placa de vidrio, fijación, coloración y posterior lectura de citología. Este procedimiento lo realizó personal designado por Pasto Salud-E.S.E. La clasificación de las citologías se realizó con base en 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 (CCU)*.
- (ii) A partir del remanente de cepillado cervical se realizó el estudio de tipificación molecular de VPH.

A partir de mujeres diagnosticadas con algún grado de anormalidad citológica se seleccionaron biopsias embebidas en parafina, con ayuda de un Patólogo se seleccionó la zona de transformación y se obtuvieron cortes de 3 micras mediante procedimientos de desparafinización y fijación en placas de vidrio. Todas las placas se llevaron al laboratorio de Medicina de la Universidad de Nariño y se almacenaron a temperatura ambiente en oscuridad. Todas las biopsias se procesaron para tipificación molecular de VPH.

### 3.3 Procesamiento de muestras para tipificación molecular de VPH

El análisis de la calidad de las muestras así como la detección y tipificación molecular de VPH en las muestras de cepillado cervical, se llevó a cabo los laboratorios de Farmacogenética del Cáncer, Instituto de Biotecnología de la



Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá y laboratorio de Biología Molecular, Sección de laboratorios Especializados, Universidad de Nariño. Para las muestras de biopsias todos los procedimientos se realizaron en los laboratorios de la Universidad de Nariño.

Una vez se recibió el remanente de cepillado cervical, se depositó en tubos eppendorf de 1,5 ml con 450 µl de buffer fosfato salino PBS 1X y timerosal al 0,05%, se codificó debidamente y se transportó al laboratorio de Medicina de la Universidad de Nariño, donde se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

Las biopsias se obtuvieron a partir de bloques fijados en parafina de los cuales se ubicó la zona de anormalidad, se realizó un corte 3-4 micras, desparafinación a 70 °C, fijación en placa y rehidratación en alcohol al 90, 80, 70 y 60%. Una vez obtenido el corte de tejido fijado en placa este fue removido en fase húmeda y se depositó en tubos eppendorf con 200 µl de PBS 1X y timerosal al 0,05% para su posterior transporte y almacenamiento en las condiciones descritas anteriormente.

#### 3.4 Análisis de calidad de las muestras mediante PCR β-globina.

Preparación de muestras para análisis de calidad. El primer paso fue la obtención de un lisado celular para lo cual, el remanente de cepillado cervical y dos cortes de 3 micras de las biopsias depositadas en buffer se procesaron de manera independiente.

Obtención de lisado celular a partir del remanente de cepillado cervical. una vez resuspendidas las muestras en PBS 1X y timerosal 0,05%, se homogenizaron y se llevaron a denaturar a 90 °C en baño seco [Major Science] durante 10 minutos.

Obtención de lisado celular a partir de biopsias. De cada muestra fijada en placa de vidrio, se desprendieron dos cortes de 3-4 micras, se depositaron en 200 µl de PBS 1X y timerosal al 0,05%, se les adicionó 1 µl de proteinasa K (10mg/ml) y se incubaron a 37°C overnight (aproximadamente 13 horas). Para la denaturación, a partir de éste lisado se tomaron 50 µl, se homogenizaron con vortex y se llevaron a 90°C durante 10 minutos. Todos los lisados celulares se conservaron primero a 4 °C y luego a -20 °C, hasta ser utilizadas en las pruebas de detección y tipificación molecular.

3.4.1 Evaluación de la calidad de muestras mediante amplificación por PCR/HHB. Este paso metodológico se aplicó a todos los lisados celulares (remanente de cepillado cervical y biopsias) obtenidos en el numeral 3.4. La detección del gen β-globina, constitutivo de toda célula eucariota, es un marcador que permite verificar presencia de inhibidores, así como la presencia/ausencia de DNA en las muestras humanas (Aguayo *et al.*, 2002). A partir del lisado celular se realizó la amplificación

por PCR de un fragmento de 110 pb del gen de  $\beta$ -globina humano (HHB) utilizando los primers PCO3/PCO4 descritos por Saiki *et al.*, 1985, mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de primers PCO3/PCO4 para PCR/HHB.

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

Fuente: Saiki *et al.*, 1985.

Además por confirmación bioinformática realizada por Sánchez y Suárez, 2012. En la Figura 7 se muestra el sitio de anillamiento específico, la localización en la cadena 5' y 3' en el gen  $\beta$ -globina.

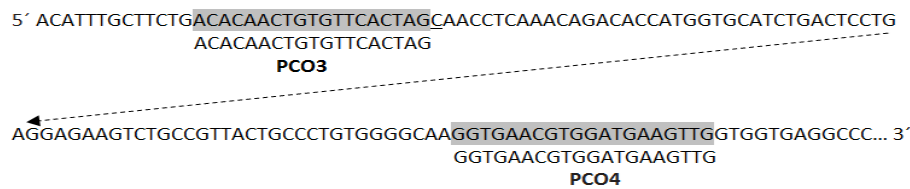


Figura 7. Anillamiento de primers PCO3 y PCO4 en el gen  $\beta$ -globina humano, posición 13 ntA a 123 ntG. Fuente: Sánchez y Suárez, 2012.

Condiciones de reacción PCR/HHB: Todas las condiciones se desarrollaron con base en la metodología descrita por García *et al.*, 2010. La preparación de la mezcla de reacción se realizó bajo estrictas condiciones de asepsia y bioseguridad. Los componentes, cantidades y concentraciones de la mezcla de reacción se presentan en la Tabla 3. Para todos los procedimientos se utilizó agua tipo 1 (ultra pura), libre de DNAsas y RNAsas.

Tabla 3. Mezcla de reacción para PCR/HHB.

Reactivo	Volumen $\mu$ L
Lisado celular	5
Buffer (1X)	2,5
dNTPs(200 mM)	0,75
MgCl <sub>2</sub> (3,0 mM)	3,0
Primer PCO3 (1 $\mu$ M)	0,75
Primer PCO4 (1 $\mu$ M)	0,75
Taq polimerasa (1,25 U)	0,2
Agua ultra pura	12,05
Volumen de reacción final	25 $\mu$ L

Fuente: García *et al.*, 2010.

Programación del termociclador. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™ (Biorad®) para las muestras de citología y en un termociclador MyGenie96 Thermal Block BioNer para las muestras de biopsia con el ciclo de amplificación descrito en la Tabla 4.

Tabla 4. Ciclo de amplificación PCR/HHB.

Ciclo de PCR/HHB	Paso	Temperatura	Duración
	Denaturación inicial	94 °C	4 min.
(40 ciclos)	Denaturación	94 °C	30 seg.
	Hibridación	52 °C	30 seg.
	Extensión	72 °C	1 min.
	Extensión Final	72 °C	4 min.
	Hold	4 °C	∞

Fuente: García *et al.*, 2010.

3.4.2 Verificación de los productos de PCR/HHB mediante electroforesis en gel de agarosa. Todos los productos se verificaron en geles de agarosa al 1,5% teñidos con el colorante Sybr safe Invitrogen™ (0,5µl/50ml) para las muestras de citología y, teñidos con el colorante EZ-vision® IN GEL, 10000X Amresco (5µl/50ml) para las muestras de biopsia. La corrida electroforética se llevó a cabo en el equipo Biorad® Power PAC 3000. Como buffer de corrida se utilizó TBE 1X, la corrida electroforética se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 1 hora, 80V, 50A y 100mA. La visualización del gel se realizó con luz UV en transiluminador DyNA Light Dual Intensity UV Trans Illumination LABNET National Labnet Company.

3.4.3 Interpretación de resultados PCR/HHB. Las muestras se consideraron positivas para β-globina cuando se observó una banda del tamaño esperado (100 pb), compatible con el marcador de tamaño molecular GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (10-300bp) y se interpretó como negativo en ausencia de banda. Para garantizar la calidad en la lectura de resultados y la ausencia de contaminación se utilizó como blanco agua tipo I ultra pura. A todas aquellas muestras de cepillado cervical positivas para β-globina se les realizó la tipificación molecular mediante RLB de acuerdo con la metodología descrita por Van den Brule *et al.*, 2002 y mediante PCR-L1+Secuenciación DNA según modificaciones al RLB evaluadas en esta investigación. Aquellas muestras β-globina negativas se descartaron y no se utilizaron para ninguno de los análisis posteriores.

3.5 Detección y tipificación molecular de VPH. La tipificación molecular de VPH se llevó a cabo en la primera parte del estudio mediante RLB según metodología desarrollada por Van den Brule *et al.*, 2002 y posteriormente se evaluó una modificación al RLB consistente en PCR-L1+Secuenciación DNA adaptada en esta investigación.

3.5.1 Tipificación mediante *Reverse Line Blot*. Esta metodología consistió en la amplificación mediante PCR GP5+/BioGP6+, activación de membrana y bloqueo e hibridación RLB.

Amplificación GP5+/Bio-GP6+ de VPH. A todas las muestras del lisado celular del remanente de cepillado cervical,  $\beta$ -globina positivas, se les amplificó un fragmento de 150 pb de la región L1 del VPH utilizando los primers GP5+/Bio-GP6+, éste último marcado con biotina. Estos primers se seleccionaron con base en lo reportado por Gravitt *et al.*, 2008 y Van Den Brule *et al.*, 2002. En la Tabla 5 se presentan las secuencias de los primers utilizados para la amplificación de la región L1 de VPH y en la Figura 8, se muestran los sitios de anillamiento de los primers GP5+ y Bio-GP6+.

Tabla 5. Secuencia de los primers GP5+/GP6+.

Primers	Secuencia (5'--3)	Fragmento amplificado
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTA	150 pb
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATA	

Fuente: Gravitt *et al.*, 2008.

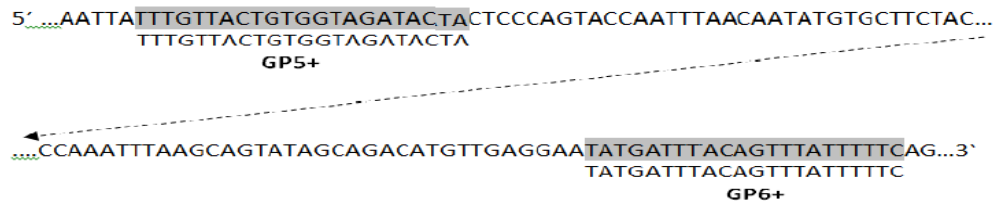


Figura 8. Representación del sitio de anillamiento de los primers GP5+ y GP6+ en el genoma de VPH 18, posición 6.600 ntA a 6.744 ntG. Fuente: Sánchez y Suárez, 2012.

Condiciones de reacción PCR GP5+/Bio-GP6+. Todas las condiciones se desarrollaron de acuerdo con la metodología descrita por García *et al.*, 2010 y Sánchez *et al.*, 2013. En la Tabla 6, se presentan los componentes, las concentraciones y cantidades de la mezcla de reacción.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la PCR GP5+/Bio-GP6+.

Reactivo	Volumen $\mu$ l
Lisado celular	10
Buffer (1X)	5
dNTPs(200 $\mu$ M)	1
MgCl <sub>2</sub> (3,0 mM)	3,0
Primer GP5+ (1 $\mu$ M)	0,25
Primer bio-GP6+ (1 $\mu$ M)	0,25
Taq polimerasa (1,25 U)	0,2
Agua ultra pura	30,3
Volumen de reacción final	50 $\mu$ l

Fuente: García *et al.*, 2010.

Programación del termociclador. La reacción de amplificación se llevó a cabo en termociclador My Cycler™ (Biorad®) bajo el ciclo de amplificación que se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Ciclo de amplificación para PCR GP5+/Bio-GP6+.

Ciclo de PCR GP5+/Bio-GP6+	Paso	Temperatura	Duración
(40 ciclos)	Denaturación inicial	94 °C	4 min.
	Denaturación	94 °C	1 min.
	Hibridación	40 °C	2 min.
	Extensión	72 °C	90 s
	Extensión Final	72 °C	4 min.
	Hold	4 °C	$\infty$

Fuente: García *et al.*, 2010

Una vez obtenidos los productos de PCR GP5+/Bio-GP6+, se almacenaron primero a -4 °C y luego a -20°C. Este paso puede ser obviado si se continúa directamente el RLB.

Activación de la membrana. Este paso se realizó para unir covalentemente las oligosondas denaturadas tipo específicas de VPH, a la membrana de nylon Biotodyne C, cargada negativamente. Para ello, la membrana se depositó en 1,6g de EDAC diluido en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada (16% peso/volumen) [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; Sigma, St. Louis, Mo.] durante 10 minutos, en recipiente plástico, con agitación manual y, a temperatura ambiente. La membrana se dispuso en un sistema miniblotted (MN 45; Immunetics) y se depositaron sobre ella en líneas paralelas las 37 oligosondas; se llevó a incubación por un minuto a

temperatura ambiente y se aspiraron los canales del miniblatter para eliminar exceso de líquido (Van Den Brule *et al.*, 2002).

Para evitar inespecificidad, la membrana se depositó en un recipiente plástico y se bloquearon los sitios inespecíficos con 100 mM NaOH durante 8 minutos a temperatura ambiente. Por último se realizó un lavado rápido con H<sub>2</sub>O destilada y otro lavado con SSPE 2X Invitrogen™ (SSPE 1X 0,18 M NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 mM EDTA [pH 7,7]) suplementado con 0,1 % SDS (Sodium dodecyl sulfate) Sigma a 60°C por 5 minutos. En la Tabla 8 se presentan las secuencias de las sondas unidas covalentemente a la membrana utilizadas para la hibridación RLB y posterior revelado (Van den Brule *et al.*, 2002).

Tabla 8. Secuencia de las 37 oligosondas usadas para tipificación de VPH mediante RLB.

Tipo VPH	Secuencia 5'-3'	Tipo VPH	Secuencia 5'-3'
6	TCCGTAACACTACATCTTCCA	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	AGCTAAAAGCACATTAACTAA
34	TTTTCAGTTTGTGTAGGTACA	68	CTGAATCAGCTGTACCAAT
35	CTGCTGTGTCTTCTAGTGA	70	GAAACGGCCATACCTGCT
39	ATAGAGTCTTCCATACCTTC	72	AGCGTCTCTGTATCAGAA
40	AGTCCCCACACCAACC	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)	TGCTACCAAAACTGTTGAG
53	TGTCTACATATAATTCAAAGC	81 (CP8304)	GCTACATCTGCTGCTGC
54	CACGCAGGATAGCTTTAAT		

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

Hibridación de las sondas con los productos de PCR GP5+/Bio-GP6+. Para ésta hibridación se preparó una mezcla de 10 µl de amplificado PCR GP5+/Bio-GP6+ con 150 µl de solución de hibridación SSPE 2X/0,1% de SDS, se denaturó por 10 minutos a 99°C en baño seco Major Science y se sirvió en el sistema miniblatter de forma perpendicular a la ubicación de las sondas y se llevó al horno de hibridación [Roller-

Bloth Hybridiser HB-3D® Techne®] durante 1 hora a 42°C. Como control positivo se utilizó plásmido de VPH 33 y como blanco, agua tipo I ultrapura (Van Den Brule *et al.*, 2002).

Incubación y lavados de la membrana. Una vez realizada la hibridación de las sondas y los productos de PCR GP5+/Bio-GP6+ se realizaron dos lavados de la membrana con 100 ml SSPE 2X 0,5% SDS a 53°C por 10 minutos para eliminar cualquier hibridación inespecífica. Para garantizar la visualización de las señales de hibridación, la membrana se incubó por 45 minutos a 42°C con una dilución 1:4000 del conjugado estreptavidina peroxidasa POD (Roche®), el cual se une a la biotina del primer BioGP6+ marcado, para este paso se utilizaron 5 µl de conjugado más 20 ml de SSPE 2X 0,5% SDS. Posterior a este procedimiento, se realizaron dos lavados cada uno con 100 ml de SSPE 2X 0,5% SDS por 10 minutos a 42°C en botella de hibridación Schott® y dos lavados en SSPE 2X por 5 minutos a temperatura ambiente en cubetas de plástico (Van Den Brule *et al.*, 2002).

Detección y revelado. La detección de la hibridación entre las muestras denaturadas y las oligosondas se realizó con el kit ECL Western Blotting sustrato (Thermo Scientific Pierce™), 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 en una relación 1:1. Finalmente, se realizó el revelado para lo cual, la membrana se expuso a una película de autoradiografía (Amersham Hyperfilm™ ECL™) en un cassette de revelado durante una hora. Transcurrido este tiempo de exposición la película fue revelada en el equipo Medical Film Procesador modelo SRX-100 A [Konica Minolta Medical y Graphic, Inc], en condiciones de total oscuridad (Van Den Brule *et al.*, 2002).

Reutilización de la membrana-*Stripping*. Para utilizar repetidamente la membrana, se realizaron dos lavados cada uno con 100 ml de SDS 1% a 80°C por 15 min, seguido de una incubación en 100 ml de EDTA 20mM Invitrogen™ a temperatura ambiente por 15 minutos y almacenamiento en bolsa ziploc a 4°C hasta su posterior uso (Van Den Brule *et al.*, 2002).

Interpretación de resultados RLB. Una muestra se consideró positiva para un tipo determinado de VPH, cuando se observó en el film de revelado, un punto de hibridación definido (*Spot*) en la intersección de las sondas para cada tipo viral y el producto de PCR; se consideró positiva para una infección múltiple por VPH cuando se observó en la película dos o más *Spot* de hibridación y se consideró negativa cuando no hubo *Spot* en la intersección.

### 3.5.2 PCR-L1 GP5+/GP6+ y Secuenciación de DNA.

Teniendo en cuenta la necesidad de confirmar los resultados obtenidos mediante RLB, se decidió repetir para todas las muestras la PCR-L1 del RLB y hacer la correspondiente verificación electroforética, para ello se utilizaron los primers GP5+/GP6+ este último sin marcaje con biotina sintetizados por Gentech [Genetics & Technology]. El procedimiento consistió en: PCR-L1 GP5+/GP6+ a partir de lisado celular, verificación electroforética, secuenciación y análisis de secuenciación. Lo anterior permitió evidenciar resultados no detectados en la hibridación del RLB. Por tanto se decidió evaluar una modificación a esta técnica mediante la aplicación de la siguiente metodología:

PCR-L1 GP5+/GP6+ a partir de muestras  $\beta$ -globina positivas. Se utilizó lisado celular obtenido de: (a) remanente de cepillado cervical de mujeres sin anormalidad o con ASCUS (b) biopsias de mujeres con anormalidad citológica (LIEBG, LIEAG, CCU). Se amplificó un fragmento de 150 pb de la región L1 del VPH utilizando primers GP5+/GP6+ (Tabla 5), la ausencia de marcaje con biotina fue necesaria para la posterior purificación y secuenciación de los productos.

Condiciones de reacción PCR-L1 GP5+/GP6+. Estas condiciones se ajustaron teniendo en cuenta la PCR utilizada para RLB y descrita por García *et al.*, 2010 y Sánchez *et al.*, 2013. Se hicieron algunas modificaciones tomando en consideración los siguientes aspectos: (i) La reacción partió de lisado celular y no de DNA extraído y purificado (ii) La cantidad de muestra utilizada para generar el lisado celular de las biopsias fue comparativamente menor respecto a la muestra utilizada para RLB (iii) El primer bioGP6+ utilizado en RLB, para ésta reacción sería reemplazado por el mismo GP6+ sin biotinilar. Así, antes de llevar todas las muestras a PCR-L1 y posterior secuenciación de DNA, se modificó el volumen de reacción y se optimizó la concentración de  $MgCl_2$ .

Volumen final de reacción: En PCR-L1 GP5+/BioGP6+ se utilizó un  $V_f = 50 \mu L$ , y en la reacción PCR/L1 GP5+/GP6+ se llevó a cabo en un  $V_f = 25 \mu L$ . Por tanto, se ajustaron los volúmenes de todos los componentes de la reacción: lisado celular  $5 \mu L$ , dNTPs  $0,5 \mu L$ ,  $MgCl_2$   $1 \mu L$ , primers  $2,5 \mu L$  cada uno y Taq polimerasa  $0,25 \mu L$ . Cabe resaltar que las concentraciones finales son iguales a las utilizadas en PCR GP5+/BioGP6+, excepto la concentración de  $MgCl_2$ . Se utilizó como control positivo DNA amplificado de VPH 33 y como blanco de reacción agua tipo 1 ultra pura.

Ensayo de optimización del  $Mg^{++}$ : Es bien conocido que las concentraciones de  $Mg^{++}$  son determinantes en una reacción de PCR para garantizar la especificidad de la enzima Taq polimerasa. Teniendo en cuenta el ajuste al  $V_f$  de reacción, y, los resultados no satisfactorios en la verificación electroforética de PCR-L1 del RLB, se



realizó un ensayo de optimización MgCl<sub>2</sub> utilizando como molde DNA amplificado de VPH 33. Los ensayos de optimización de Mg<sup>++</sup> se presentan en el Anexo D y las condiciones de reacción ajustadas luego de la optimización se muestran en la Tabla 9. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MyGenie96 Thermal Block BioNeer bajo el ciclo de amplificación descrito en la Tabla 7. Las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Comparación de las condiciones de reacción utilizadas en PCR -L1.

Reactivo	PCR/L1 GP5+BioGP6+ Volumen (µl)	PCR/L1 GP5+ GP6+ Volumen (µl)
Lisado celular	10	5
Buffer (1X)	5(1X)	5(1X)
dNTPs(200 µM)	1(200 µM)	0,5(200 µM)
MgCl <sub>2</sub>	3(3 mM)	1(1 mM)
Primer GP5+ (1µM)	0,25(1µM)	2,5(1µM)
Primer GP6+ (1µM)	0,25*(1µM)	2,5(1µM)
Taq polimerasa (1,25 U)	0,2(1,25 U)	0,25(1,25 U)
Agua ultra pura	30,3	8,25
Volumen de reacción final	50 µl	25 µl

\*Primer GP6+ biotinilado. Fuente: Garcia *et al.*, 2010.

Verificación de PCR GP5+/GP6+ mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa al 1,5% con TBE 1X, teñido con EZ-vision® IN GEL, 10000X Amresco (5µl/50ml). La corrida se realizó en el equipo ENDURO™ Power Supplies 300 voltios Labnet International INC durante 2 horas a 80V, 50A y 100mA, y posterior visualización del gel en transiluminador DyNA Light Dual Intensity UV Trans Illumination LABNET National Labnet Company. Interpretación de resultados PCR/L1 GP5+GP6+. Las muestras fueron positivas cuando se observó una banda del tamaño esperado (150 pb) compatible con el marcador de tamaño molecular GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (50-1000 pb). La muestra fue negativa en ausencia de banda. Como blanco de reacción se utilizó agua tipo I ultra pura.

Secuenciación de productos PCR/L1 GP5+GP6+. Las muestras PCR/L1 GP5+GP6+ positivas se enviaron a purificación en columna con Kit Exo-SAP purification (Quiagen) y secuenciación de DNA en equipo ABI 3730XL en Macrogen (Korea). Así mismo se secuenciaron los controles de VPH 11, 6 y 33, este último tipo utilizado tanto en RLB como en PCR-L1 GP5+/GP6+ y sirvieron como control de la secuenciación.

Análisis de secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias se procedió a depurarlas utilizando el software BioEdit disponible para libre descarga en la siguiente dirección: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>; para revisar las

secuencias *reverse* se utilizó la herramienta RevSeq Emboss-EMBL de libre acceso en la siguiente dirección: <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/revseq>. Posteriormente se comprobó la calidad de las secuencias utilizando la herramienta BioEdit Sequence Alignment Editor del programa BioEdit. La depuración consistió en la eliminación de N y corte de las regiones con exceso de ruido en el cromatograma, picos débiles o intensidad de señal baja o inexistente, pero que por la sensibilidad del equipo dieron lugar a señal (errónea). De ésta manera las secuencias se analizaron en una longitud promedio de 108-137 pb, correspondiente al tamaño esperado del producto de PCR/L1.

A fin de establecer las características y poder establecer el tipo de VPH obtenido mediante la secuenciación de los productos de PCR se procedió a realizar alineamientos mediante el uso de la herramienta BLASTn (Zhang *et al.*, 2000) y MegaBlast (Morgulis *et al.*, 2008) del NCBI (National Center Biotechnology Information) disponible en la siguiente dirección: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Para cada alineamiento se analizó el score, el valor-e, la identidad y similitud de la siguiente manera: la disponibilidad de la secuenciación tanto de la cadena 5'-3' y de su complementaria 3'-5' y el propósito de tipificar VPH, conllevaron a realizar el análisis bioinformático de las secuencias a partir de las dos cadenas complementarias del DNA de cada muestra. Este análisis consistió en sucesivos alineamientos pareados entre la secuencia de cada cadena con las disponibles en las bases de datos mediante la herramienta MegaBlast del NCBI. De cada alineamiento se tuvo en cuenta el mayor porcentaje de identidad, el mayor Score y el menor valor-e, lo que permitió establecer el tipo viral.

### 3.6. Análisis de resultados

Análisis bivariado. Se realizó un análisis de los resultados de tipificación y los resultados de las variables sociodemográficas, ginecóbstricas y clínicas de la población. Este análisis se realizó utilizando tablas de contingencia y el estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y para la relación entre lesiones en CCU y la infección por VPH se realizó un análisis de regresión logística binaria.

Análisis de concordancia. Para tener una mayor representación estadística del análisis bivariado, se realizó un análisis de concordancia entre los resultados de tipificación molecular de VPH y los resultados de la citología utilizando tablas de contingencia y haciendo uso del estadístico Kappa.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para mayor claridad los resultados y la discusión se han organizado en tres partes:

- (i) Descripción general de la población de mujeres en estudio y características poblacionales: Sociodemográficas -Edad y Número de compañeros sexuales-; Gineco-obstétricas-Método de planificación e Infección con otros organismos-; Clínicas -Cambios celulares reactivos asociados a inflamación, Resultado de citología y Resultado del informe de patología.
- (ii) Tipificación molecular de VPH mediante RLB y Tipificación molecular de VPH mediante PCR/L1 GP5+GP6+Secuenciación DNA.
- (iii) Análisis de asociación entre la infección por el VPH, características poblacionales y lesiones LIEBG, LIEAG y CCU.

##### 4.1 Descripción general de la población

Se incluyó una población total de 192 mujeres de las cuales 160 muestras correspondieron a mujeres que acudieron a la toma de citología en 8 IPS de las 23 pertenecientes a Pasto Salud E.S.E y 32 muestras de mujeres remitidas a Patólogos Asociados LTDA. El número de muestras y la distribución de la población incluida en el estudio se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Muestras tomadas en IPS - Pasto Salud E.S.E y Patólogos Asociados LTDA.

IPS de Pasto Salud E.S.E (Mujeres sin anormalidad citológica)		
Zona	Sitio de muestreo	# muestras
	Hospital Civil	27
Norte	Centro de Salud Pandiaco	24
	Centro de Salud Lorenzo	15
Sur	Centro de Salud Rosario	19
	Centro Hospitalario la Rosa	26
Oriente	Centro de Salud el Progreso	12
	Centro de Salud San Vicente	20
Occidente	Centro de Salud Tamasagra	17
Patólogos asociados LTDA (Mujeres con anormalidad citológica)		
	Sitio de muestreo	# muestras
	Laboratorio de patología	32
<b># Total de muestras</b>		<b>192</b>

Fuente: Esta investigación.

Para todos los análisis, la población se dividió en dos grupos: (1) Citología negativa (-) y ASCUS, mujeres pertenecientes a Pasto-Salud ESE; (2) con lesiones LIEBG, LIEAG y CCU de Patólogos Asociados LTDA. A su vez, el tipo de muestra utilizado para los análisis de laboratorio del grupo (1) fueron cepillados cervicales (muestra fresca) y para el grupo (2) fueron biopsias embebidas en parafina (procedente del banco de muestras).

#### 4.1.1 Análisis de las características poblacionales de las mujeres con citología (-) y ASCUS

Con base en la información de las mujeres pertenecientes a Pasto Salud E.S.E se realizó un análisis descriptivo, mediante tablas de distribución de frecuencias y porcentajes con el fin de evidenciar la distribución de las características: Sociodemográfica, Gineco-obstétricas y Clínicas en la población de estudio.

##### 4.1.1.1 Características sociodemográficas.

Edad. En las mujeres con citológica (-) el rango de edad (años) fue de 18 - 60 años, con una media de 37 y una desviación típica de 11. En las mujeres con ASCUS el rango de edad fue de 31 - 55 años, con una media de 42 y una desviación típica de 9. Los anteriores datos se organizaron en cinco rangos de edad como se presenta en la Tabla 11. La mayor frecuencia por edad para las mujeres con citología (-) se presentó en el rango c correspondiente al 29,8% (45/151) y para las mujeres con ASCUS no se observaron diferencias en las frecuencias distribuidas en los rangos b, c y d.

Los resultados de edad en mujeres con citología (-) indican que existe una tendencia a realizarse este examen citológico con mayor frecuencia entre los 18 y 47 años de edad y disminuye drásticamente con la edad de las pacientes. En el estudio realizado por Sánchez y Suarez, 2012 con el mismo tamaño de muestra se reportó la misma tendencia. Este resultado se explica en parte por la relación establecida entre contagio-sexualidad lo que estaría evidenciando un vacío en la percepción del riesgo presente en las mujeres mayores de 45 años (Wiesner *et al.*, 2006; Fajardo *et al.*, 2010).

La edad de las mujeres con ASCUS varió de 31 - 55 años y se agrupó en tres rangos en los cuales no se observó diferencias en la detección de este resultado citológico, lo cual podría ser explicado por el bajo número de muestras. El rango de edad de la población con ASCUS fue similar a lo reportado en otros estudios, sin embargo las frecuencias por grupo de edad difieren de una población a otra. Sepúlveda *et al.*, 2006, determinaron que el rango de edad para mujeres con ASCUS estuvo entre 17 - 64 años, más frecuente en mujeres de 15 - 34 años y menos frecuentes en el rango de 55 - 64 años. Farfán *et al.*, 2009 reportó un rango de edad de 16 - 69 años para mujeres con ASCUS, siendo más frecuentes en mujeres < 25 - 34 años y menos frecuente en el

grupo > 55 años. López *et al.*, 2011, reportaron mujeres con ASCUS dentro del rango de 25 – 54 años, encontrando el mayor número de casos ASCUS en el rango 25 – 29 años y el menor número en el rango de 50 – 54 años. López *et al.*, 2012 analizaron una población de 58 mujeres con reporte de anormalidad en células epiteliales, de las cuales 52 con ASCUS se encontraron en el rango < 20 – 60 años.

Las variaciones en la frecuencia de mujeres con ASCUS en los diferentes grupos de edad podría estar relacionada con la interpretación citológica, pues se ha encontrado que la edad de una mujer influye en la interpretación del examen Pap, además, en mujeres posmenopáusicas el procedimiento de toma de muestra es más complejo por las características del tejido. Otros factores que pueden estar relacionados con estos resultados son los cambios celulares que aparecen con la edad, los efectos de la terapia de reemplazo hormonal, las alteraciones inflamatorias y metaplasia reactiva así como la alta probabilidad de regresión a la normalidad (Orozco *et al.*, 2007). González, 2003 realizó seguimiento a mujeres con reporte de ASCUS encontrando un porcentaje de regresión del 78,6%, sin embargo antes de mostrar regresión hubo persistencia de anormalidad hasta por más de 12 meses en el 15% de la población. ASCUS en una mujer joven se asocia con mayor frecuencia a una lesión de alto grado o a una LIEBG y también a una mayor prevalencia de VPH (Orozco *et al.*, 2007).

Las variaciones de este tipo de anormalidades en cada población son influenciadas por problemas de sensibilidad y especificidad de la citología, los cuales se encuentran entre el 50 y 90%, respectivamente. En Colombia, sin dejar de lado los protocolos para obtención de la muestra y la eficacia en la interpretación, la variación en la detección de este tipo de anormalidad también está relacionada con la competitividad y efectividad de los programas de tamizaje de CCU, dado que son estos los responsables del manejo de la población en riesgo y la detección temprana de los cambios citológicos en pacientes de primer nivel (López *et al.*, 2011).

Número de compañeros sexuales. Para esta característica, las mujeres con citología (-) se clasificaron en 4 rangos. De las 151 mujeres con citología (-), el 78,8% registró un número de parejas sexuales entre 1 y 2, igual que lo reportado por el 100% de las mujeres con ASCUS, (Tabla 11). Respecto a esta variable de análisis, Bravo *et al.*, 2004 analizaron mujeres con citología normal y clasificaron la población en tres rangos < 2, 2 – 5 y > 5 compañeros sexuales, de estos el mayor número de mujeres se ubicó en el rango de 2 – 5 (50,9%). Meza *et al.*, 2005, analizaron 38 mujeres con citología negativa, con un rango de compañeros sexuales de 1 - 3, y encontraron mayor frecuencia de mujeres en el rango 1 - 2. En el estudio de García *et al.*, 2010 el 66,9% de las mujeres indicaron tener de 1 – 2 compañeros sexuales. Mendoza *et al.*, 2012 analizaron 207 mujeres con citología (-) de las cuales 92,8% indicaron menos de 4 compañeros sexuales. En el presente estudio las mujeres con ASCUS están en el

rango 1 - 2 compañeros sexuales, estos resultados concuerdan con lo reportado por García *et al.*, 2007 y Farfán, 2009 quienes analizaron poblaciones con características similares a las encontradas en el presente trabajo.

Tener un número elevado de compañeros sexuales (3 o más) determina un alto perfil de riesgo en el desarrollo de CCU (Alvis *et al.*, 2007), ya que el número de parejas sexuales en una población se relaciona con el nivel de exposición a infecciones transmitidas por esta vía (Alterio *et al.*, 2007; Tafurt *et al.*, 2012). En la cadena epidemiológica de la infección por VPH el hombre se considera un vector de los tipos oncogénicos de VPH implicados en el desarrollo de cáncer de cérvix (Castellsagué *et al.*, 2003; Almonte *et al.*, 2008). Luhn *et al.*, 2013 encontraron que el número de compañeros sexuales se relaciona más con el riesgo de desarrollar cáncer cervical y NIC III, concluyendo que las asociaciones de co-factores de riesgo difieren entre NIC II y NIC III.

Tabla 11. Frecuencias (F) y porcentajes (%) de las características sociodemográficas de las mujeres con citología (-) y ASCUS.

Edad	C (-) F/ (%)	ASCUS F/ (%)	# Compañeros sexuales	C (-) F (%)	ASCUS F/ (%)
18-27 <sup>a</sup>	38/ (25,2)	-	1-2	119/ (78,8)	9/ (100)
28-37 <sup>b</sup>	37/ (24,5)	3/ (33,3)	3-4	27/ (17,9)	-
Rangos 38-47 <sup>c</sup>	45/ (29,8)	3/ (33,3)	Rangos 5-6	4/ (2,6)	-
48-57 <sup>d</sup>	27/ (17,9)	3/ (33,3)	7 >	1/ (0,7)	-
58 y > <sup>e</sup>	4/ (2,6)	-			

<sup>a,b,c,d,e</sup>: códigos de los rangos de edad. \*C (-): Citología negativa. Fuente: Esta investigación.

#### 4.1.1.2 Características gineco-obstétricas.

Método de planificación. La variable de análisis inicialmente considerada fue uso de anticonceptivos orales, sin embargo, las características de la población de estudio no permitieron hacer tal análisis, dado que ninguna de las mujeres con citología (-) y ASCUS utiliza éste método de planificación. En su lugar, un 62,8% de las mujeres con citología (-) planifican con métodos tales como: ligadura de trompas o pomey, anovulatorios, dispositivo intrauterino DIU y Jadelle, y un 55,5% de las mujeres con ASCUS planifican con pomey, DIU y Jadelle. Datos presentados en la Tabla 12.

Estos resultados coinciden con los reportados para el municipio de Pasto por Sánchez y Suarez, 2012, y se pueden contrastar con los reportes de la ENDS, 2010, según los cuales en Colombia el 61% de las mujeres entre 15 y 49 años utilizan algún

método de planificación. De estos métodos el más utilizado es la ligadura de trompas con un 24%, seguido de la inyección con un 9%, el preservativo 7% y por último la píldora y el DIU. Sin embargo, en el departamento de Nariño el uso de métodos anticonceptivos en las mujeres fue de 76,6%.

Los reportes sobre la protección contra infecciones de transmisión sexual (ITS) por parte de los anticonceptivos inyectables (ACI) son contradictorios (Cruz et al., 2007). Algunos mencionan que los anticonceptivos hormonales inyectables (ACI) protegen contra algunas ITS dado que la progestina, principio activo de muchos anticonceptivos orales (ACO) puede proteger contra la enfermedad inflamatoria pélvica y dificultar el ascenso de bacterias por el aparato genital femenino, sin proteger contra infecciones del tracto reproductor bajo (Pérez, 2011).

El método de planificación más utilizado en mujeres con ASCUS (Tabla 12), fue la ligadura de trompas o pomey con un 33,3%, este resultado es diferente al reportado por Peláez y Pinos., 2010, en el cual el método de elección en la población de análisis fueron ACO y ACI. Una mujer con ASCUS utiliza Jadelle (implante subdermico), en esta mujer podrían presentarse efectos similares a los ocurridos por el uso de ACO (Pérez, 2011).

Otra de las mujeres con ASCUS utilizó el DIU, con éste método las mujeres pueden desarrollar erosión en el cuello del útero, así como procesos inflamatorios, situación que podría potenciar el desarrollo de lesiones asociadas con la infección por VPH (León et al., 2009). El uso de DIU se ha asociado con infecciones bacterianas, debido a la contaminación que se puede dar en el momento de la inserción del dispositivo, existen reportes sobre el riesgo de sufrir una enfermedad inflamatoria pélvica en los primeros 20 días posteriores a su inserción (Cruz et al., 2007).

Por otro lado, el resultado de una citología anormal en mujeres que utilizan éste método de planificación se puede explicar por la irritación crónica y porque su uso prolongado contribuye al crecimiento de microorganismos como *Actinomyces spp* a su vez relacionados con el desarrollo de enfermedad inflamatoria pélvica. Se cree que en aquellas mujeres que utilizan este método de planificación, la lesión que causa esta enfermedad puede promover la infección por VPH sin embargo el mecanismo aún no es claro (Alonso, 2005).

Las mujeres con ASCUS que utilizaron preservativo representaron el 11,1% de esta población; según algunos autores este método de barrera puede disminuir la exposición a enfermedades de transmisión sexual, además se ha reportado que el uso de preservativo reduce el riesgo de NIC II, NIC III y cáncer cervical invasivo, sin

embargo, la infección por VPH puede ocurrir por el contacto de otras partes del cuerpo que no son áreas protegidas por este (Chelimo *et al.*, 2013).

Infección con otros organismos. Se encontró un 91,4% (138/151) de mujeres con citología (-) que presentaron infección con otros microorganismos, de las cuales, el mayor porcentaje de ellas registró infección con microbiota sugestiva de vaginosis bacteriana y bacilo de Doderlein. En las mujeres con ASCUS se encontró infección en un 44,4% (4/9), y las infecciones fueron por microbiota sugestiva de vaginosis bacteriana y *Actinomicetos spp*, tal como se muestra en la Tabla 12.

En 13 mujeres con citología (-) no se encontró co-infección con otros microorganismos. Sin embargo en la mayoría de la población se encontró microbiota sugestiva de vaginosis bacteriana, infección causada por la bacteria *Gardnerella vaginalis* presente casi de manera universal en esa localización anatómica femenina, tal infección puede asociarse con la microbiota anaerobia mixta como *Bacteroides*, *Peptoestreptococos*, *Mobiluncus*, *Micoplasmas*. Murta *et al.*, 2000 han reportado una asociación entre la presencia de *Gardnerella vaginalis* y la infección por VPH. Algunos investigadores han reportado una presencia de vaginosis bacteriana en 15 - 30% de mujeres en edad reproductiva y en consecuencia el aumentado riesgo de desarrollar enfermedad inflamatoria pélvica (Flores *et al.*, 2003; Navarro y Marín, 2010).

El Bacilo de Doderlein se presentó en el 31,1% de las mujeres con citología (-), este microorganismo hace parte de la microbiota normal en esta localización anatómica, sin embargo un incremento en la cantidad de estos bacilos puede alterar este microambiente y conllevar al desarrollo de infecciones (Sánchez *et al.*, 2008). Las alteraciones en los niveles normales de Bacilo de Doderlein conllevan a la predisposición a infecciones, lo que probablemente explica la presencia de Bacilo de Doderlein en asociación con *Actinomicetos spp* (Asp) y la microbiota sugestiva de vaginosis bacteriana encontrada en 0,7% y 2,0% de la población, respectivamente. La citología también resulta útil en el hallazgo de otros agentes involucrados en la vaginosis bacteriana, como la microbiota cocoide, las cuales cuando están presentes a exploración microscópica e indican una alteración que por lo general es regulada por el Bacilo de Doderlein (Muñoz *et al.*, 2009).

Otros resultados importantes de infección en las mujeres con citología (-) fueron la presencia de *Virus Herpes Simplex*, *Candida sp* y *Trichomonas vaginalis*, los cuales pueden tener serias implicaciones sobre el ambiente del cuello del útero en infección simultánea con VPH. La infección por *Trichomonas vaginalis* se registró en 3 mujeres (2%), aunque su frecuencia es muy baja cabe resaltar su importancia para potenciar la infección del tracto superior genital e incrementar tres veces el riesgo de desarrollar cáncer de cérvix (León y Bosques, 2005). La infección por *Candida sp* se



presentó en 5 mujeres (3,3%), ésta infección se ha relacionado con la activación de infecciones latentes por tipos de VPH (Murta *et al.*, 2000). Algunas especies de *Candida* pueden formar parte de la microbiota normal de tal ambiente femenino pues se han encontrado en bajas concentraciones en mujeres sanas (Martínez, 2013). El Virus de Herpes Simple (VHS) se presentó en el 3,3% de las mujeres, este patógeno sexual aumenta la susceptibilidad a la infección por VPH dado que las micro-abrasiones del cérvix se convierten en micro-úlceras y promueven la persistencia viral a través de mecanismos inmunológicos. Este microorganismo podría servir como indicador de la exposición al VPH a través del contacto sexual (Navarro y Marín, 2010).

En mujeres con ASCUS se detectó microbiota sugestiva de vaginosis bacteriana y bacterias compatibles con *Actinomicetos spp*; la primera corresponde a un síndrome clínico poli microbiano producto de un desequilibrio entre la microbiota bacteriana cervical y vaginal. Por lo cual, se encuentra en elevadas concentraciones en pacientes con vaginosis y en bajas concentraciones 30 - 40% de las mujeres normales (Meza *et al.*, 2005). Esta microbiota es más común en mujeres en edad reproductiva siendo asociada con un mayor número de compañeros sexuales, otras infecciones de transmisión sexual y el uso de preservativo con menos frecuencia (Denslow *et al.*, 2013). Las bacterias compatibles con *Actinomicetos spp*, sólo se presentaron en el 11,1% de la población, esta infección se ha asociado con la presencia del DIU (Guillén *et al.*, 2003). Es de tener en cuenta que la detección de *Actinomicetos spp* en la citología pueden ser consecuencia de falsas interpretaciones de restos de espermatozoides, filamentos de mucina y cerdas de DIU (Leiva y Montecinos, 2011).

Las infecciones cérvico-vaginales son la principal causa de consulta médica por parte de pacientes en edad reproductiva. Algunas infecciones son provocadas por microorganismos exógenos y otras por microbiota normal. En ambos casos al producirse cambios en este microambiente, se cambia el efecto protector de la microbiota *lactobacilar* y se favorece el crecimiento de otros microorganismos (Navarro y Marín, 2010).

Tabla 12. Frecuencias (F) y porcentajes (%) de características gineco-obstétricas de las mujeres con citología (-) y ASCUS.

Método de planificación	C (-) F/ (%)	ASCUS F/ (%)	Infección con otros microorganismos	C (-) F/ (%)	ASCUS F/ (%)
			Microbiota de Vaginosis Bacteriana	64/ (42,4)	3/ (33,3)
Pomeroy	52/(34,4)	3/ (33,3)	Bacilo Doderlein	47/ (31,1)	
Anovulatorios	20/ (13,2)		Microbiota cocoide	7/ (4,6)	
DIU	16/ (10,6)	1/ (11,1)	<i>Trichomonas vaginalis</i>	3/ (2,0)	
Jadelle	7/ (4,6)	1/ (11,1)	<i>Candida sp</i>	5/ (3,3)	
Preservativo	6/ (4,0)	1/(11,1)	<i>Actinomicetos spp</i>	2/ (1,3)	1/ (11,1)
Otro	2/ (1,3)		Virus Herpes Simplex	5/ (3,3)	
			<i>Actinomicetos spp + Bacilo Doderlein</i>	1/ (0,7)	
Ninguno	48/ (31,8)	3/ (33,3)	<i>Actinomicetos spp + Microbiota de Vaginosis Bacteriana</i>	1/ (0,7)	
			Bacilo Doderlein + microbiota de Vaginosis Bacteriana	3/ (2,0)	
			No microorganismos	13/ (8,6)	5/ (55,6)

\*C (-): Citología negativa. Fuente: Esta investigación.

#### 4.1.1.3 Características clínicas

Resultado de la citología cervicouterina: De acuerdo con la información obtenida del formato "Resultado de citología", se analizaron tres características:

- (a) Clasificación general de la citología de acuerdo con el sistema Bethesda, 2001. De las 160 mujeres, 151 fueron negativas para neoplasia NPN y las 9 restantes resultaron con *células escamosas atípicas de significancia no determinada* ASCUS. (Tabla 13).

El resultado ASCUS representa un hallazgo citológico sugestivo pero no concluyente de LIEBG y cualitativa y/o cuantitativamente son insuficientes para una interpretación definitiva (de Larrea *et al.*, 2012; López *et al.*, 2012). Según el sistema de clasificación Bethesda, las células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) son catalogadas como células escamosas que denotan cambios en su morfología y pueden presentarse en un margen entre lo que son las células escamosas normales y células presentes en neoplasias cervicales

intraepiteliales (NIC I), si la mujer ha tenido alguna infección con algún tipo de VPH u otras infecciones de transmisión sexual (Farfán *et al.*, 2010). Este resultado está dentro del rango reportado por Dane *et al.*, 2009, dentro del cual se afirma que las células escamosas atípicas de significado indeterminado son detectadas en el 5% - 10% de las mujeres que asisten al tamizaje de la citología. Por otro lado se cree que cerca del 30% de las mujeres que presentan estos resultados tendrán neoplasia cervical intraepitelial (NIC I), muchas tendrán una regresión espontánea, sin embargo un 15% y hasta un 40% progresaran a NIC II y NIC III (Dane *et al.*, 2009; Farfán *et al.*, 2010).

En general, aquellas patologías clasificadas como ASCUS en los estudios citológicos son de difícil interpretación; se aprecian en células epiteliales maduras de tipo intermedio o superficial y están asociados frecuentemente al VPH (López *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2012). El diagnóstico de ASCUS puede ser dependiente de la edad, se ha establecido que el riesgo de progresión a displasia en mujeres con ASCUS menores de 20 años incrementa y en mujeres mayores de 50 años se reduce (Rodríguez *et al.*, 2012).

Para realizar un correcto manejo en la vigilancia de mujeres con ASCUS las pruebas moleculares de detección de DNA de VPH junto con la citología han sido aprobadas para utilizarse, la detección del DNA de VPH en mujeres VPH negativas reduce el número de colposcopias y el tamizaje cervical se practica a intervalos más largos (Isaza *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2012).

- (b) Cambios reactivos asociados a inflamación. Se encontró un 94,7% (143/151) mujeres con citología (-) y con algún tipo de inflamación, de las cuales 54,3% (82/151) con inflamación moderada y 15,2% (23/151) con inflamación severa. En las mujeres con ASCUS un 44,4% (4/9) presentó algún tipo de inflamación, de estas el 11,1% con inflamación leve y el 22,2% con inflamación moderada. (Tabla 13).

El porcentaje de mujeres con inflamación reportados en esta investigación es mayor al encontrado por Tafurt *et al.*, 2012 con un 37% de mujeres con resultado de citología inflamatoria. Respecto a estos resultados, algunos estudios sugieren que un resultado inflamatorio en la citología puede estar asociado con procesos inespecíficos del cérvix, lesiones directas en mucosa por agentes infecciosos o físico-químicos, cambios atróficos epiteliales, la basificación del medio vaginal, enfermedades supresoras de la inmunidad, tratamientos inmunosupresores, traumatismos (cirugías, parto, DIU), procesos que a su vez provocan cambios a nivel celular (Tapia, 2008), o secundarios como infecciones en el tracto genital inferior como las causadas por *C. trachomatis*, *C. albicans*, *T. vaginalis*, vaginosis bacteriana,

virus *Herpes simple* producto de cambios en la microbiota vaginal habitual, o por la presencia de VPH, donde la respuesta inmune promueve el reclutamiento de células inflamatorias (Tafurt *et al.*, 2012).

Respecto al tipo de inflamación, varios autores consideran que el reporte de citología inflamatoria severa, puede estar representando un marcador de lesión intraepitelial cervical. Sin embargo, otros autores rechazan a la citología inflamatoria como predictor de lesión premaligna del cérvix, lo que sí es de tener en cuenta es que la citología inflamatoria a repetición indica el uso de colposcopia y un seguimiento adecuado en la paciente para prevenir lesiones en CCU (Gaitán *et al.*, 2004).

La inflamación es un proceso fisiológico de restauración en estructura y funciones tisulares, desencadenado por infecciones bacterianas, víricas y encaminado a la eliminación de patógenos (Carrero, 2012). Actualmente se ha establecido una estrecha relación entre el cáncer y la inflamación, debido probablemente a la reacción inmunitaria innata en respuesta a microorganismos que eventualmente puede dañar el DNA, inducir proliferación celular y modular la apoptosis, procesos involucrados en la progresión tumoral regulado por citoquinas y quimiocinas (Pananá *et al.*, 2009).

- (c) Aspecto del cérvix. En el 39,1% (59/151) de la población con citología (-) se presentó un cérvix anormal y en el 48,3% (73/151) un cérvix sano. En las mujeres con ASCUS el 55,6% (5/9) se presentó un cérvix anormal y en el 33,3 (3/9) un cérvix sano.

En la lectura por citología todas las muestras fueron satisfactorias para ser procesadas. Una muestra de calidad debe contener de 8.000 a 12.000 células escamosas bien preservadas y al menos 10 células endocervicales o de metaplasia escamosa para la lectura por citología, si existe un 75% de células escamosas no visibles o sólo se encuentran células de endocérvix, se considera no satisfactoria (Estrada, 2012). En el 95,6% de las muestras de citología se observó la zona de transformación o células endocervicales.

En mujeres con citología (-) el aspecto del cérvix anormal posiblemente se deba a la presencia de infecciones de transmisión sexual ya que estas infecciones son capaces de provocar procesos inflamatorios en el cuello uterino los cuales se reflejan en la citología (Camejo *et al.*, 2003). En mujeres con ASCUS este pronóstico depende del grado de anormalidad en el cérvix e incluye procesos inflamatorios (González, 2003). Teniendo en cuenta los resultados de las mujeres con citología anormal es recomendable someter a las mujeres a una evaluación complementaria.

Tabla 13. Frecuencias (F) y porcentajes (%) de las características clínicas de las mujeres con citología (-) y ASCUS.

Clasificación general	F/ (%)	Cambios celulares reactivos	C - F/ (%)	ASCUS F/ (%)	Aspectos del cérvix	C - F/ (%)	ASCUS F/ (%)
NPN ASCUS	151 (94,4) 9(5,6)	Inflamación leve	34(22,5)	1(11,1)	Anormal	59(39,1)	5(55,6)
		Inflamación moderada	82(54,3)	2(22,2)			
		Inflamación severa	23(15,2)	-	Sano	73(48,3)	3(33,3)
		Atrofia con inflamación	4 (2,6)	1(11,1)	No Reporta	19(12,6)	1(11,1)
		No reporta	8 (5,3)	5(55,6)			

\* C -: Citología negativa. Fuente: Esta investigación.

#### 4.1.2 Análisis de las características poblacionales de las mujeres con lesiones LIEBG, LIEAG y CCU.

De acuerdo con la información disponible en el formato “resultado de patología” para ésta población se analizó la edad y el tipo de lesión, los resultados se presentan en tablas de distribución de frecuencias y porcentajes.

##### 4.1.2.1 Característica sociodemográfica: Edad

Las 32 mujeres con lesiones LIEBG, LIEAG y CCU, registraron la siguiente información: las LIEBG un rango de edad 21 - 57, media de 42 y desviación típica de 11, las LIEAG un rango de edad 20 - 63, media de 37,8 y desviación típica de 11,7 y con CCU un rango de edad 25 - 80, media de 54 y desviación típica de 20. En general en estas mujeres la mayor frecuencia por edad se ubicó en el rango c (38 - 47), seguido por el rango b y e. Sin embargo, teniendo en cuenta el tipo de lesión las mujeres con LIEAG fueron más frecuentes en los rangos b y c, y las mujeres con CCU fueron más frecuentes en los rangos a y e (Tabla 14).

No existe un consenso entre la edad de una mujer y el desarrollo de lesiones en cáncer. Algunos estudios muestran que estas pueden presentarse en edad reproductiva pero, puede persistir o reincidir en mujeres en edad avanzada. En este estudio las LIEBG y LIEAG fueron más frecuentes entre 38 - 47 y 28 - 37 años respectivamente, sin embargo, otros estudios muestran comportamientos diferentes. Peláez y Pinos, 2010 encontraron la mayor proporción de LIEBG (LSIL) en mujeres de 26 – 35 años y LIEAG (HSIL) en mujeres con más de 65 años. González *et al.*, 2010, encontraron LIEBG y LIEAG más frecuentes entre 30 - 39 años. Dávila *et al.*, 2010 mostraron que 60% de los casos de CCU se presentaron en mujeres de 34 – 57 años. Berdayes *et al.*, 2010 encontraron LIEBG más frecuentes de 18 - 28 años, y LIEAG en mujeres de 29 - 39 años. Dávila *et al.*, 2011 encontraron NIC más frecuente en mujeres

de 30 - 39 años. López *et al.*, 2011 encontraron NIC I en mujeres de 25 - 44 años y NIC II en mujeres de 30 - 34 años.

La regresión de LIEBG es menor en edades avanzadas, en mujeres de 32 años la regresión de estas lesiones es del 54,9% y la progresión del 19,8%, (Mazarico *et al.*, 2012). Se ha descrito a los 12 meses una probabilidad de regresión del 61% en mujeres jóvenes que puede aumentar al 91% a los 36 meses (Gómez, 2009; Sánchez, 2012). Respecto al riesgo de desarrollar NIC II y III o CCU a partir de lesiones NIC I sin tratamiento y confirmadas por biopsia se ha reportado del 9 al 16% (Gómez, 2009).

La presencia de las lesiones intraepiteliales a edades tempranas se ha asociado con el inicio precoz de la actividad sexual, explicando que probablemente durante la metaplasia fisiológica de la adolescencia la infección por VPH conlleve a la progresión a cáncer (Dávila *et al.*, 2011). En la progresión a CCU el riesgo de alteraciones cervicales en la unión pavimentosa cilíndrica del cuello uterino se multiplica por 1,2 en caso de actividad sexual comenzada entre los 18 y 20 años, y por 2 en caso de ser antes de los 17 años (Dávila *et al.*, 2010). Por el contrario la presencia de LIEAG en edades avanzadas es el resultado de la persistencia de la infección adquirida años atrás (Grisales *et al.*, 2008).

El promedio de edad de las mujeres con CCU reportadas en nuestro estudio fue 54 años diferente a lo reportado por Wiesner *et al.*, 2010 quienes detectaron LIEAG en mujeres de 42 años. El segundo rango de edad con CCU fue 18 - 27 años (23,1%). El riesgo de CCU aumenta entre los 20 - 29 y 35 años (Dávila *et al.*, 2010). El diagnóstico de CCU a temprana edad se relaciona con factores como la aparición de la menarquia a edad cada vez más temprana y por consiguiente inicio de vida sexual a cortas edades, convirtiéndose en un riesgo para el desarrollo de CCU. Al respecto se ha indicado que la edad promedio de aparición de la menarquia en mujeres de América Latina es 12,8 años con rangos que van desde 10,5 a 15 años (Dávila *et al.*, 2010).

En este estudio se registró CCU entre 38 - 58 y más años. Se ha indicado que las mujeres mayores de 40 tienen más probabilidades de contraer CCU, mientras que la edad promedio del diagnóstico es entre los 50 y 55 años (Dávila *et al.*, 2010). Las anomalías celulares en mujeres mayores de 45 años se explican por la persistencia de la infección por VPH evidenciado en el desarrollo de CCU (Grisales *et al.*, 2008). Los protocolos de detección e intervención en CCU están dirigidos a mujeres en edad reproductiva, por lo cual en edad avanzada se tienen aún menores probabilidades de detección temprana y probabilidades más bajas de sobrevivir al cabo de 5 años. Lo anterior permite asumir que las probabilidades de sobrevivir

aumentan en relación con el diagnóstico en edades tempranas las cuales se asocian con carcinomas in situ cuyo pronóstico es más favorable (Yépez *et al.*, 2011).

Estudios descriptivos desarrollados por Yépez *et al.*, 2011 refieren que la mortalidad de las mujeres con CCU después de los 35 años aumenta hasta 1,8 veces. Al observar los resultados de los grupos de edad de estas mujeres se puede determinar que cada tipo de lesión tiene un comportamiento trimodal en los tres momentos de mayor frecuencia de trastornos ginecológicos: edad fértil, perimenopáusica y posmenopáusica, además de considerar otros factores asociados a estas alteraciones en esta etapa de la vida (Lau Serrano *et al.*, 2012).

Tabla 14. Frecuencia (F) por edad de las mujeres con lesiones LIEBG, LIEAG y CCU.

Edad	LIEBG	LIEAG	CCU	Total
	F / (%)	F / (%)	F / (%)	
18-27 <sup>a</sup>	1 (14,3)	2 (13,3)	2 (20)	5
28-37 <sup>b</sup>	1 (14,3)	6 (40)	-	7
Rangos 38-47 <sup>c</sup>	3 (42,8)	5 (33,3)	1 (10)	9
48-57 <sup>d</sup>	2 (28,6)	1 (6,7)	1 (10)	4
58 y > <sup>e</sup>	-	1 (6,7)	6 (60)	7
Total	7	15	10	32

<sup>a,b,c,d,e</sup>: códigos de los rangos de edad. Fuente: Esta investigación.

#### 4.1.2.2 Característica clínica: Resultado de patología

De acuerdo con los resultados de las biopsias, las 32 mujeres fueron diagnosticadas así, 22% LIEBG, 47% LIEAG y 31% con CCU. Además considerando el total de la población (192 mujeres) las frecuencias fueron 3,6% para las mujeres con LIEBG, 7,8% para mujeres con LIEBG y 5,2% para las mujeres con CCU. Estos datos se muestran en la Tabla 15. Estos resultados son diferentes a los reportados en otros estudios. Alterio *et al.*, 2007 encontraron 77,8% LIEBG. Grisales *et al.*, 2008 en mujeres con citología anormal 3,9% presentó LIEBG y 1,9% LIEAG. Peláez y Pinos, 2010 encontraron 2,9% LIEBG (LSIL) y 3,1% LIEAG (HSIL) en la población de estudio. Gonzáles *et al.*, 2010 reportaron NIC I en 6,2%; NIC II y NIC III en 1,3% (0,4% y 0,9% respectivamente). Dávila *et al.*, 2010 reportaron 4% de LIEBG. Berdayes *et al.*, 2010 según un estudio citológico de 102 pacientes 53,91% presentaron LIEBG y 46,09% LIEAG. López *et al.*, 2011 encontraron NIC I y NIC II en 1,39% y 0,81% respectivamente. Y Mendoza *et al.*, 2012 indicaron LIEBG en 8,2 % y LIEAG en 0,9%. Los anteriores estudios demuestran diferentes frecuencias de las lesiones en CCU, lo cual puede estar relacionado con características genéticas, inmunológicas, fisiológicas y de riesgo, propias de cada población de estudio.

En las mujeres diagnosticadas con LIEBG es de considerar que estas lesiones tienden a desaparecer de forma espontánea durante el proceso de regresión relacionado con la capacidad de respuesta del sistema inmune y la carga del VPH (Quintero *et al.*, 2008). Este tipo de lesiones y las LIEAG son consideradas lesiones precursoras del CCU, sin embargo aunque los CCU invasores de células escamosas son precedidos de fases pre-invasoras de largo tiempo también existen casos en que el CCU surge sin previa detección de algunas de sus etapas de progresión, se ha reportado que entre las LIEAG el 20% pueden aparecer de novo (Dávila *et al.*, 2011).

En la determinación de LIEBG por citología es necesaria la valoración mediante inspección visual por colposcopia y biopsia, al respecto Moore *et al.*, 2008 en un estudio sobre displasia cervical en mujeres mayores de 35 años con informe citológico de LIEBG, después de una biopsia dirigida por colposcopia se encontró una distribución de citología normal 40,7%, NIC I 40,7%, NIC II y III 17,4% y cáncer 1,2%. De acuerdo con lo anterior, las tasas de progresión de las lesiones en CCU no son uniformes y por lo tanto es difícil predecir la evolución de estas en una persona en particular, ya que la progresión no solo depende del tipo viral, sino que participa el sistema inmunitario y condiciones ambientales, así el tiempo de progresión del CCU invasivo varía de unos pocos meses hasta por más de una década (Dávila *et al.*, 2011).

La concordancia citohistológica en LIEAG es mucho mayor respecto a LIEBG (Gutiérrez *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2013), la variabilidad en lo observado es consecuencia de la subjetividad y la experiencia en estas técnicas las cuales se gana después de un periodo de aprendizaje (Gutiérrez *et al.*, 2013). Es de considerar que el resultado de citología puede depender de la muestra en la cual se analizan estratos superficiales del epitelio y su relación con la infección por VPH, sin embargo, no se cuenta con un tipo de muestra de los estratos más profundo que con mayor probabilidad revelen el verdadero diagnóstico (Sánchez *et al.*, 2013).

Tabla 15. Frecuencia (F) y porcentaje (%) de mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU.

Resultado informe patología	F/ (%)
LIEBG	7/ (22)
LIEAG	15/ (47)
CCU	10/ (31)

Fuente: Esta investigación.



## 4.2 Resultados de detección y tipificación molecular de VPH

4.2.1 Análisis de la calidad de las muestras mediante amplificación de un fragmento del gen de  $\beta$ -globina para toda la población de estudio.

De las 160 muestras de cepillado cervical, 152 fueron positivas para el gen  $\beta$ -globina y se consideraron adecuadas para tipificar mediante RLB y PCR-L1 GP5+/GP6+Secuenciación, los resultados de este tamizaje se muestran en la Figura 9.

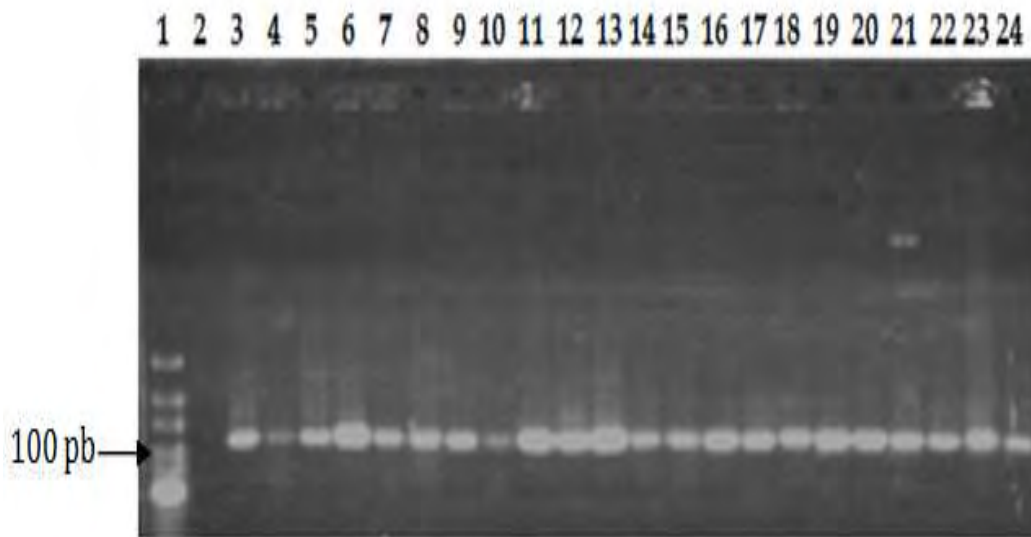


Figura 9. Amplificación del gen de  $\beta$ -globina en muestras de cepillado cervical. Línea 1: Marcador de tamaño molecular GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (10-300bp), línea 2: Blanco (agua ultra pura), líneas 3-25: Amplificados PCR/HHB de las muestras de cepillado cervical UDN183-UDN205. Fuente: Esta investigación.

En el análisis de calidad de las 32 biopsias, a partir de lisado celular se logró amplificar el gen  $\beta$ -globina en todas las muestras y se consideraron para tipificación. Los resultados de este tamizaje se muestran en la Figura 10.

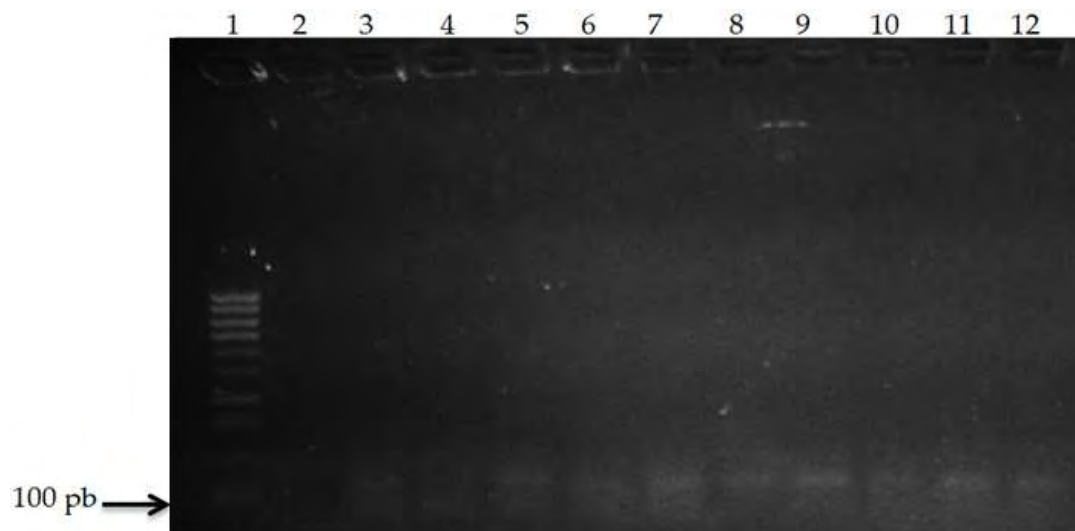


Figura 10. Amplificación del gen de  $\beta$ -globina en muestras de biopsias. Línea 1: Marcador de tamaño molecular HyperLadder™ 100bp Bioline (100bp-1013bp), línea 2: Blanco (agua ultra pura), líneas 3-12: Amplificados PCR/HHB de las muestras de biopsias UDN325-UDN334. Fuente: Esta investigación.

De un total de 192 muestras de cepillado cervical (160) y de biopsias (32), solo en 8 muestras de cepillado cervical no se determinó amplificación del gen  $\beta$ -globina. Estos resultados negativos podrían estar relacionados con varios factores como inhibidores en la muestra, mala calidad de la muestra, DNA degradado o muy poca cantidad, así como el límite de detección que para esta técnica es de aproximadamente 390 picogramos (García *et al.*, 2011).

4.2.2 Tipificación de VPH mediante RLB a partir de cepillado cervical. Las 152 muestras de cepillado cervical procesadas mediante RLB fueron VPH negativas (Anexo E). Todas las muestras se confirmaron por triplicado y en todos los casos en el control positivo se observó *spot*.

La infección por VPH es una condición necesaria en el desarrollo del CCU el cual representa un importante problema de salud pública, según estimaciones de la OMS, existen más de 69 millones de mujeres en edad reproductiva en situación de riesgo para el desarrollo de CCU (OMS, 2010; Meyrelles *et al.*, 2013). En Colombia un estudio realizado en cinco regiones indicó que para un total de 1.810 mujeres el 49,2% fueron positivas para la infección por VPH (Soto *et al.*, 2009). En el departamento de Nariño recientemente en la ciudad de Pasto se realizó una investigación en la que se indicó una frecuencia de 6,4% de infección por VPH en mujeres con citología normal (Sánchez y Suarez, 2012).

En la presente investigación inicialmente no se detectó VPH, utilizando la metodología RLB, probablemente la muestra utilizada no tuvo el número de copias adecuado para generar la señal en el proceso de hibridación. Para esta técnica, se ha reportado que las diferencias en la intensidad de la señal evidenciada en los puntos de hibridación obedece al número de copias para los tipos presentes en cada muestra (Van den Brule *et al.*, 2002). Por tanto, si se tiene en cuenta que la muestra utilizada del remanente del cepillado cervical contiene una cantidad mínima de células, esta condición pudo haber afectado la detección mediante RLB y en consecuencia pone en cuestión la reproducibilidad y límite de detección de la misma.

Sin embargo, mediante RLB se pueden genotipificar hasta 37 genotipos de VPH, las cuales tienen una hibridación específica sin ninguna reacción cruzada, aun cuando se utilice concentraciones elevadas de productos de PCR de tipos de VPH cercanamente relacionados a nivel filogenético (Van den Brule *et al.*, 2002). En este sentido se ha reportado que la especificidad de RLB es alta, aunque su rigor está sujeto a que todas las variantes de un tipo de VPH coincidan de manera perfecta con la secuencia de la sonda ya que un único cambio puede no permitir la detección del tipo viral.

Respecto al límite de detección de RLB se ha indicado que está entre 10 - 100 copias/PCR (Gutiérrez *et al.*, 2009, Antonsson *et al.*, 2013). La muestra que RLB utiliza para la hibridación son productos de PCR, en relación se ha afirmado que los métodos de PCR utilizados para la amplificación del DNA del VPH presentan alta sensibilidad para la detección de virus en muestras cervico-vaginales, aun cuando exista altas posibilidades de contaminación del producto amplificado (Cañadas *et al.*, 2006).

Respecto a la reproducibilidad algunos estudios han introducido modificaciones en la concentración de algunas sondas disminuyendo la generación de falsos positivos o la interferencia en la lectura, también los tiempos de exposición de la membrana sobre la película fotosensible de 1 a 3 horas y overnight, siendo este último el que mejor señal ha generado. Finalmente se ha modificado el tiempo de incubación de la membrana con el conjugado determinando un tiempo de 45 minutos como estándar (Farfán, 2009). Por lo tanto, la técnica RLB tiene una cuestionada reproducibilidad y si se tienen en cuenta eventos propios de la evolución del genoma de VPH, cada vez se tendrán que introducir mayores modificaciones.

Una comparación entre RLB y el inmunoensayo enzimático (EIA) permitió encontrar algunas discrepancias en la detección de muestras VPH positivas, por lo que se concluyó que estos resultados no fueron producto de la sensibilidad de las técnicas si no a errores de muestreo (Van den Brule *et al.*, 2002). Farfán, 2009 analizó 302

muestras de las cuales 77 resultaron positivas para *Amplificor*® y negativas para RLB, explicando que esta discrepancia probablemente fue por limitaciones en la conservación de la muestra, baja carga viral en la muestra o amplificación variable de bajos niveles de ADN de VPH. En el estudio de Jenkins *et al.*, 2013 se observaron discrepancias en los resultados de detección de VPH entre PT13-RT y RLB, sobre un total de 202 muestras de cepillado cervical 162 fueron idénticos para ambas técnicas y 40 fueron discrepantes, entretanto de estos últimos 12 fueron negativos para RLB y positivos para PT13-RT, y 3 fueron positivos para RLB y negativos para PT13-RT. Esta última técnica tiene una sensibilidad superior en comparación con RLB para detectar tipos 56 y 52, RLB tiene una sensibilidad analítica reducida para estos tipos.

Un factor que puede interferir en el procesamiento por RLB es el medio o buffer en el que se conserva la muestra. Farfán *et al.*, 2010 consideraron que en su estudio el medio líquido PreservCyt® presentó limitaciones de conservación de la muestra principalmente por el tiempo para el que está garantizado. Por eso aun cuando las muestras fueron positivas para el control de calidad  $\beta$ -globina, no todas revelaron una misma intensidad de la señal, lo anterior llevó a concluir que el DNA pudo haberse deteriorado parcial o totalmente. En nuestro estudio el medio de almacenamiento de muestras fue Buffer fosfato salino 1X y timerosal al 0,05%, utilizado por García *et al.*, 2010, estudio en el cual también se excluyeron una serie de muestras antes de ser procesadas por RLB, debido a la falta de una señal clara y bien definida para el gen de  $\beta$ -globina. En nuestro estudio la intensidad de la señal del gen de  $\beta$ -globina fue variable, sin embargo, la mayoría permitieron considerarse como positivas y en consecuencia se tipificaron mediante RLB y PCR-L1+Secuenciación DNA.

#### 4.2.3 Tipificación de VPH mediante PCR-L1 GP5+/GP6+Secuenciación de DNA a partir de lisado celular de cepillado cervical y biopsias.

Con base en los resultados obtenidos mediante RLB y teniendo la necesidad de detectar y tipificar VPH a partir de lisado celular del cepillado cervical y de biopsias, se decidió evaluar una modificación del RLB consistente en PCR-L1+Secuenciación DNA.

##### 4.2.3.1 Detección y verificación molecular de VPH.

Luego de la optimización del  $Mg^{++}$  en la PCR-L1, se obtuvo una banda definida y de buena calidad con una concentración de 1 mM de  $MgCl_2$  (línea: 2, Figura 11) en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l.

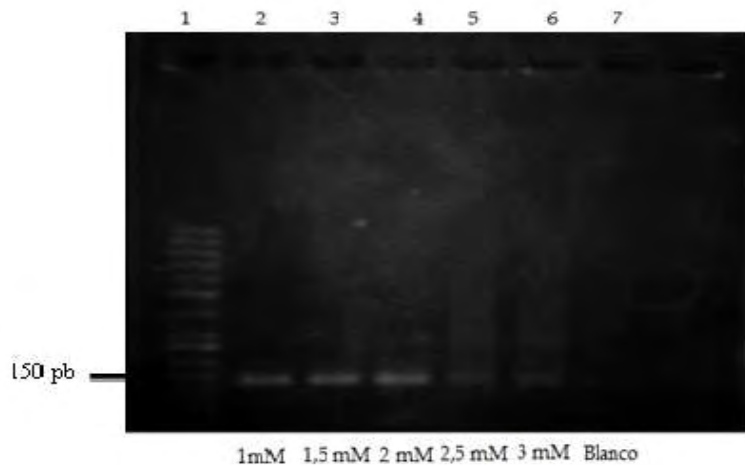


Figura 11. Ensayo de optimización del Mg<sup>++</sup>. Línea 1: Marcador de tamaño molecular GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder (50-1000 pb), líneas: 2-6: Amplificados del VPH 33 bajo diferentes cantidades y concentraciones de Mg<sup>++</sup> línea 7: Blanco (agua ultra pura). Fuente: Esta investigación.

En consecuencia, la optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub> y el ajuste en la mezcla de reacción PCR-L1 GP5+/GP6+ permitió detectar infección por VPH a partir de lisado celular en 1,4% (2/143) de las mujeres con citología (-), en 11,1 (1/9) de las mujeres con ASCUS y en el 34,4% (11/32) de las mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU, para un total de 14 muestras VPH +. En la Figura 12 se presentan los resultados correspondientes.

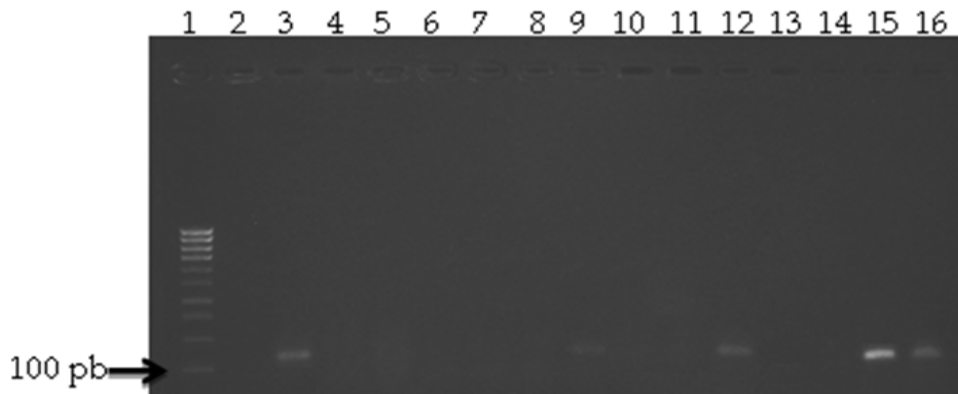


Figura 12. Amplificación del gen L1 del VPH. Línea 1: marcador de tamaño molecular HyperLadder™ 100bp Bioline (100bp-1013bp), línea 2: Blanco (agua ultra pura), líneas 3-16 productos de PCR/L1, líneas 3, 9 y 12 muestras VPH+ (UDN217: VPH 16, UDN 331: VPH no determinado y UDN 338: VPH 58), líneas 15 y 16: Controles positivos amplificados de VPH 11 y VPH 33. Fuente: Esta investigación.

En esta investigación se encontró VPH en 1,9% en pacientes con citología (-) y ASCUS, menor al reportado por Sánchez y Suárez, 2012 de 6,4% en una población con citología normal, entre tanto la frecuencia de VPH fue del 14,2%(1/7) en mujeres con LIEBG este resultado es menor al reportado por Molano *et al.*, 2010 del 55,7% en mujeres con diagnóstico de LSIL.

Respecto a la frecuencia de infección en nuestra población con lesiones en CCU la frecuencia de VPH fue 34,4%, mayor a la reportada por Graterol *et al.*, 2006 del 23%. La variación en la detección de infección por VPH entre varios estudios puede explicarse por diferencias en la sensibilidad de los métodos aplicados, la metodología de muestreo, al tipo de muestra estudiada que puede ser raspados de mucosa, tejido de biopsia; a las condiciones genéticas de cada población que favorecen o retrasan la aparición de determinadas lesiones (Adamopoulou *et al.*, 2013).

La PCR-L1 que se utilizó en la detección de VPH es fácil y rápida de realizar y al igual que otros métodos que utilizan primer consenso resulta ser conveniente para este tipo de estudios. Los primers que se utilizan en PCR-L1 han sido diseñados sobre regiones conservadas del gen L1 y solo hibridan en su totalidad con el gen L1 de algunos tipos de VPH, al respecto se ha demostrado que su capacidad de amplificar determinados tipos de VPH se ve afectada por el número y posición de los desajustes residuo a residuo de estos cebadores, además que el número de desajustes se correlaciona recíprocamente con la sensibilidad. Como consecuencia de la amplificación selectiva de algunos tipos virales y la sensibilidad de la PCR puede haber sesgos de las frecuencias reportadas para tipos de VPH de la mucosa (Schmitt *et al.*, 2008).

La región amplificada en este estudio fue de 120 pb aproximadamente, esta región está inmersa en aquella región que amplifican los primer MY09 y MY11 que contiene residuos altamente conservados dentro de un segmento de 291 pb del ORF de L1, de gran utilidad en la construcción de árboles filogenéticos (Schmitt *et al.*, 2008).

#### 4.2.3.2 Secuenciación de los productos de PCR-L1 y determinación de tipo VPH

Depuración y verificación de los resultados de secuenciación. Debido a la calidad de algunos cromatogramas y el número de N en las secuencias, se tuvieron que re-secuenciar las siguientes muestras: UDN 333 y UDN 347, los resultados de la secuenciación no permitieron realizar el alineamiento y los resultados de re-secuenciación de estas dos muestras permitieron el alineamiento y posterior tipificación (Anexo F). La depuración consistió en eliminar fragmentos del extremo

3' de las secuencias en las cuales no se observó una buena señal, así mismo se cortaron hasta 3 N (nucleótidos no determinados) del extremo inicial 3' de cada cadena que coincidieron con picos ruidosos en el cromatograma. De las secuencias obtenidas se utilizaron fragmentos de 108-137 pb, para todos los análisis posteriores.

Análisis de secuencias de los controles VPH 6, 11 y 33. La inclusión de estos controles permitió contar con un control de la secuenciación y una mejor interpretación de los resultados obtenidos a partir de las muestras. Los alineamientos de los controles VPH 6, 11 y 33 realizados con la herramienta MegaBlast del NCBI fueron compatibles con secuencias de los tipos de VPH 6, 11 y 33, a excepción de la muestra VPH 1R. Esta muestra codificada como VPH 1R alineó con la secuencia “*Isolate Isfahan EL2R L1*” (GQ179959.1), la cual fue detectada en una investigación realizada en Iran, en mujeres con adenocarcinoma cervical, carcinoma de células escamosas y neoplasia intraepitelial los resultados de los alineamientos de los controles se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Alineamientos de los controles positivos: VPH 6, VPH 11 y VPH 33.

Código	Score	E-value	Identidad	# Acceso	Tipo
VPH 1F	172 bits (93)	6e-40	98/100(98%)	KC706454.1	6
VPH 1R	191bits (103)	2e-45	103/103(100%)	GQ179959.1	Isfahan EL2R
VPH 2F	62.1 bits (33)	2e-06	40/43(93%)	EU056622.1	11
VPH 2R	178 bits (96)	2e-41	96/96(100%)	AF548815.1	11
VPH 3F	154 bits (83)	1e-34	87/89(98%)	HQ537707.1	33
VPH 3R	169 bits (91)	5e-39	101/105(96%)	KC706450.1	33

Fuente: Esta investigación.

Este resultado se tuvo en cuenta para el análisis de identidad y similitud en los alineamientos realizados con las secuencias procedentes de las muestras.

Alineamientos de secuencias mediante BLASTn–MegaBlast del NCBI. A partir del alineamiento pareado, se tuvo en cuenta la secuencia del GenBank con el mayor score, menor e-value, mayor % identidad y similitud, para identificar la secuencia y por lo tanto, el tipo viral de cada muestra. En la Figura 13 se muestra el resultado de la muestra UDN 217 F que alineó con VPH 16, los demás resultados se presentan en el Anexo F.

Download v GenBank Graphics

Human papillomavirus type 16 isolate HPV16-AH2, complete genome  
Sequence ID: [gb|KF954093.1](#) Length: 7906 Number of Matches: 1

Range 1: 6667 to 6767 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
169 bits(91)	6e-39	98/101(97%)	1/101(0%)	Plus/Plus
Query 18	ATT-TGTTCTGCCACATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTA	76		
Sbjct 6667	ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTA	6726		
Query 77	CCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTC	117		
Sbjct 6727	CCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTC	6767		

Figura 13. Alineamiento de la secuencia identificada en la muestra UDN 217 mediante Blastn y MegaBlast del NCBI. (Zhang *et al.*, 2000; Morgulis A *et al.*, 2008).  
Fuente: Esta investigación.

En los alineamientos realizados en las dos cadenas de DNA 5'-3' y 3'-5' de las 14 muestras VPH + se observó que todas las secuencias alinearon sobre secuencias del gen L1 reportadas en GenBank para diferentes tipos de VPH. Estos alineamientos permitieron identificar de forma preliminar los tipos VPH 6, VPH 16, VPH 33, VPH 45, VPH 58, VPH 73 y VPH 97. En la muestra UDN 331 no se logró confirmar el tipo viral (Tabla 17).

En la muestra UDN 331F, al analizar las dos cadenas, en su cadena 5'-3' alineó con "06JAN\_PHL\_MY099\_08" (ID: EU911303.1), la cual fue obtenida del cuello uterino de una trabajadora sexual en Filipinas. Entretanto, UDN 331R en su cadena 3'-5' alineó con la secuencia "Isolate Isfahan M49-MF nonfunctional ORF-L1" (ID: GQ452050.1), tal secuencia se obtuvo a partir de biopsia de cuello uterino embebido en parafina de una mujer proveniente de Isfahan, Irán.

Las muestras en las que el alineamiento no permitió detectar un tipo de VPH específico correspondieron a aquellas codificadas UDN 328R, UDN 333R y UDN 347F. La muestra codificada con UDN 328R 3'-5' alineó con la secuencia "Isfahan EL2 L1" (GQ179959.1). La muestra UDN 333R alineó con la secuencia "Isolate Isfahan M49-MF nonfunctional ORF-L1" (ID: GQ452050.1), cabe resaltar que esta es la misma secuencia con la que alineó la muestra codificada como UDN 331R. Por último la muestra codificada como UDN 347F alineó con la secuencia "Isolate IS601" (U45937.1|HPU4593).



Tabla 17. Resultados de los alineamientos de las 14 muestras VPH +.

Código de la muestra	Resultado Citológico o patológico	Identidad %	Score	E-value	Tipo	# Acceso de la secuencia de referencia
UDN 217F	ASCUS	98/101 (97%)	169 bits (91)	6e-39	16	KF954093.1
UDN 217R	ASCUS	90/94 (96%)	150 bits (81)	2e-33	16	GU076521.1
UDN 290F	C (-)	92/94 (98%)	163 bits (88)	3e-37	45	KC470256.1
UDN 290R	C (-)	92/95 (97%)	159 bits (89)	4e-36	45	KC470256.1
UDN 292F	C (-)	46/51 (90%)	65.8 bits (35)	9e-08	97	EF202168.1
UDN 292R	C (-)	72/79 (91%)	106 bits (57)	5e-20	6	EU056598.1
UDN 325F	CCU	80/91 (88%)	106 bits (57)	4e-20	16	FJ645037.1
UDN 325R	CCU	102/105 (97%)	176 bits (95)	3e-41	16	AF548821.1
UDN 328 F	CCU	82/85 (96%)	139 bits (75)	4e-30	6	KC706454.1
UDN 328 R	CCU	105/106 (99%)	189 bits (102)	4e-45	-	GQ179959.1
UDN 329 F	CCU	80/82 (98%)	141 bits (76)	1e-30	58	AB819279.1
UDN 329 R	CCU	93/100 (93%)	143 bits (77)	3e-31	58	AB819279.1
UDN 331 F	CCU	136/137 (99%)	248 bits (134)	9e-63	-	EU911303.1
UDN 331 R	CCU	101/114 (89%)	132 bits (71)	7e-28	-	GQ452050.1
UDN 333 F	CCU	94/103 (91%)	134 bits (72)	2e-28	6	KC706454.1
UDN 333 R	CCU	85/86 (99%)	152 bits (82)	6e-34	-	GQ452050.1
UDN 337 F	LIEAG	84/84 (100%)	156 bits (84)	4e-35	16	KF954093.1
UDN 337 R	LIEAG	86/87 (99%)	156 bits (84)	4e-35	16	GU344766.1
UDN 338 F	CCU	79/81 (98%)	139 bits (75)	4e-30	58	AB819279.1
UDN 338 R	CCU	85/91 (93%)	134 bits (72)	2e-28	58	AB819279.1
UDN 339 F	LIEBG	88/88 (100%)	163 bits (88)	3e-37	16	KF954093.1
UDN 339 R	LIEBG	104/109 (95%)	172 bits (93)	4e-40	16	AF548821.1
UDN 345 F	LIEAG	84/84 (100%)	156 bits (84)	4e-35	16	KF954093.1
UDN 345 R	LIEAG	100/107 (93%)	158 bits (85)	1e-35	16	KF954093.1
UDN 347 F	CCU	88/89 (99%)	159 bits (86)	3e-36	-	U45937.1   HPU4593
UDN 347 R	CCU	91/94 (97%)	158 bits (85)	1e-35	73	JQ902134.1
UDN 351 F	LIEAG	82/83 (99%)	148 bits (80%)	7e-33	33	U45897.1   HPU45897
UDN 351 R	LIEAG	98/103 (95%)	163 bits (88)	3e-37	33	KC706450.1

El gen L1 corresponde a la región tardía del genoma de VPH y codifica proteínas estructurales de la cápside; es una región conservada en todos los tipos de VPH, con una región variable que ha permitido la identificación de nuevos tipos de VPH putativos (de Villiers, 2013). Al respecto Serrano *et al.*, 2003 utilizaron PCR GP5/GP6 para la detección de VPH y polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) y/o secuenciación para la tipificación, en tal estudio la secuenciación permitió la identificación de tipos de VPH que no fue posible tipificar por SSCP.

Melo *et al.*, 2010, utilizaron PCR anidada y secuenciación para tipificar VPH, la secuenciación permitió establecer el tipo viral en algunos casos, sin embargo, en otras muestras no fue posible identificar el tipo de VPH debido a que estas muestras evidenciaron varios patrones de secuenciación que podrían deberse a infecciones múltiples. Al respecto en nuestro estudio en la muestra UDN 292, el alineamiento realizado con la cadena 5'-3' permitió detectar VPH 97 y al realizar el alineamiento con la cadena 3'-5' se encontró VPH 6. Estos resultados se confirmaron con la resecuenciación de la muestra y podrían estar explicados por la presencia de co-tipos en una muestra, sin embargo, para mayores análisis serían necesarios otros estudios destinados a medir el alcance de la técnica implementada en esta investigación.

La tipificación PCR/secuenciación resulta ser una buena herramienta en la identificación de tipos de VPH que no son posibles identificar con técnicas basadas en hibridación con sondas (Serrano *et al.*, 2003). Respecto al gen L1 a pesar de ser conservado genéticamente sus regiones variables permiten detectar y reconocer un nuevo tipo viral con base en el análisis de similitud. Según de Villiers, 2013 debe existir una similitud inferior al 90% para ser aceptado como un nuevo tipo de VPH.

De Villiers, 2013 realizó el análisis filogenético utilizando genomas completos que resultó casi idéntico al análisis filogenético utilizando únicamente las secuencias completas del gen L1. Esta evidencia sugiere que se puede utilizar L1 como criterio de clasificación.

#### 4.2.4 Frecuencia de los tipos de VPH detectados y riesgo oncogénico

En las 14 muestras secuenciadas el porcentaje de los genotipos de VPH de alto riesgo fue de 78,6%, de los tipos bajo riesgo fue de 14,3% y de riesgo indeterminado 7,1%. En la Tabla 18, se muestra la frecuencia y el riesgo oncogénico de cada tipo viral detectado en la población de estudio.

Tabla 18. Tipos virales encontrados en esta investigación. La frecuencia corresponde al número de muestras en cual se detectó cada tipo de VPH.

Tipo VPH	Riesgo oncogénico	F (%)
6	Bajo riesgo	2 (14,3)
16	Alto riesgo	5 (35,7)
33	Alto riesgo	1 (7,1)
45	Alto riesgo	1 (7,1)
58	Alto riesgo	2 (14,3)
73	Alto riesgo	1 (7,1)
97/6	Alto riesgo	1 (7,1)
ND	-	1 (7,1)

\*F: Frecuencia. ND: No determinado. Fuente: esta investigación.

Los tipos más frecuentes fueron VPH 16, 6 y 58, aunque también se encontró VPH 33, 45, 73 y 97. En estudios realizados en Colombia los reportes para tipos de VPH son variables. García *et al.*, 2010 y Farfán *et al.*, 2010 encontraron más frecuente el tipo VPH 16. Sánchez y Suarez, 2012 reportaron en igual frecuencia los tipos VPH 11-55, 45, 53, 54, 56, 70 y 84. La variación en la detección de los tipos de VPH puede estar relacionada con eventos de transmisión viral propios en cada población, así como con eventos de predisposición genética de las poblaciones hacia determinado tipo viral.

De los tipos detectados el 14,3% fueron de bajo riesgo (VPH-BR) y correspondieron a VPH 6; que ha sido relacionado con lesiones benignas del cuello uterino como los condilomas acuminados, entre estos el VPH 6 y 11 son los responsables del 90% de estas lesiones (Navarro *et al.*, 2011). Respecto a la capacidad oncogénica de los VPH-BR se ha considerado que la proteína E6 no presenta las mismas capacidades que la proteína E6 de tipos de VPH -AR, la cual está ligada a la inactivación de genes supresores de tumores y su inactivación o degradación depende de la vía ubiquitina-proteosoma (Piña y Alvarado, 2012), para los tipos VPH-BR estos eventos son poco claros.

Entretanto, el 78,6% fueron VPH-AR: VPH 16, 33, 45, 58, 73, 97. Entre los detectados se encontró tres tipos de VPH que han sido asociados más frecuentemente con el desarrollo de lesiones cervicales, VPH 16, VPH 33 y VPH 45, estos tipos se han utilizado como base para el diagnóstico molecular (Navarro *et al.*, 2011). La capacidad oncogénica de los VPH se debe a la expresión diferencial de los genes E6 y E7, involucrados en la transformación de epitelios escamosos. Se cree que VPH 16 es capaz de inducir transformación maligna sin integración viral, lo que conlleva a

considerar la participación de otros factores en los procesos de transformación maligna (Sánchez *et al.*, 2012).

De Villiers, 2013 encontró que VPH 97 está relacionado filogenéticamente con VPH 45 y 18, mientras que VPH 73 se relaciona filogenéticamente con VPH 34. Un estudio realizado por García *et al.*, 2013 demostró que en NIC II después de VPH 16 y 18, el VPH 45 es el tercer tipo más frecuente por lo cual, se puede considerar que su potencial oncogénico está en ascenso. Para esta investigación la detección de VPH 45 es relevante dado que se encontró en una mujer con citología (-) lo cual supone un importante riesgo para la progresión a cáncer si no se detecta tempranamente y se toman las medidas de terapia o seguimiento adecuados.

Según los resultados de la presente investigación, aquellas mujeres con citología (-), VPH 6 co- VPH 97 se podría suponer a VPH 6 como un “facilitador” de la cohabitación con VPH-AR, o contrario a esto y tal como sugieren algunos autores, el potencial oncogénico de VPH 97 podría influir en la activación oncogénica de VPH 6 (Graterol *et al.*, 2006).

#### 4.2.5 Concordancia entre resultado de citología y PCRL1+Secuenciación

El análisis de concordancia de las técnicas se realizó entre citología y PCR-L1 GP5+/GP6+; entre citología y RLB no se realizó este análisis debido a que los resultados del RLB fueron negativos para todas las muestras y en consecuencia no pueden ser utilizados en este tipo de análisis.

La concordancia entre el resultado de los resultados de la citología y la detección del VPH por PCR-L1 GP5+/GP6+ arrojó un valor estadístico Kappa de 0,14 lo que indica que existe poca concordancia entre estas técnicas, el p-valor obtenido fue menor a 0,05, el porcentaje de concordancia fue del 93,42. En la Tabla 19 se muestra el número de muestras positivas y negativas obtenidos con cada técnica y la concordancia obtenida.

Tabla 19. Tabla de contingencia Citología – PCR L1.

		Citología		Total
		Negativa	Positiva	
PCR	Negativa	141	8	149
	Positiva	2	1	3
Total		143	9	152

Fuente: Esta investigación.

La frecuencia de VPH en mujeres con citología (-) es menor a la de otros estudios, con reportes del 10% en países desarrollados y de aproximadamente 15,5% en países en desarrollo. En estas mujeres es muy probable que se elimine la infección por VPH, sin embargo estos mecanismos aún se desconocen (Chelimo *et al.*, 2013; Amirian *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el VPH puede afectar a cerca del 10% de las mujeres sin alteraciones en la citología (Arias *et al.*, 2010), y solo entre un 10-20% de mujeres con infecciones persistentes por VPH presentarían mayor riesgo si no se diagnostican a tiempo (Mendoza *et al.*, 2012).

La infección por VPH en mujeres con citología (-) se explica por la presencia de infecciones subclínicas en las que el VPH se presenta en forma episodal, y se mantiene en fase de incubación capaz de colonizar zonas del epitelio genital sin que se observen manifestaciones clínicas o histológicas por ser una infección latente (Consuegra *et al.*, 2004; Guglielmo y Rodríguez, 2010; Carrillo *et al.*, 2012). En esta etapa el VPH se establece en las células basales replicándose en un número bajo de copias y utilizando la maquinaria de replicación del DNA para la segregación del genoma viral durante la división de las células basales (García *et al.*, 2010; Palaoro *et al.*, 2013). De este modo las células basales se convierten en reservorios de virus una vez son infectadas (García *et al.*, 2010; Castro y Pérez, 2013) y debido a la expresión de proteínas como E2, inhibidor de la síntesis de oncoproteínas virales se garantiza el control sobre la proliferación celular y la capacidad de transformación de las células infectadas (García *et al.*, 2010).

Estos resultados también se explican por la sensibilidad de la citología que depende de factores del agente viral que potencializan los cambios celulares lo que se relaciona con una detección más sensible y específica de la citología (Méndez *et al.*, 2011). Otra limitación son los falsos negativos que dependen propiamente la toma y de todo el procesamiento de la muestra (Burd, 2003; Cendales *et al.*, 2010; Carrillo *et al.*, 2010). Por esta razón se ha sugerido que complementar la citología con la detección de VPH podría incrementar el valor predictivo positivo de una citología alterada (Almonte *et al.*, 2010)

En las mujeres con citología (-) las infecciones asintomáticas pueden tener un proceso de regresión de uno o dos años mediado por la inmunidad celular del hospedero (Chelimo *et al.*, 2013), estos procesos de resolución generan cierto grado de protección con respecto a reinfecciones con el mismo tipo viral (Méndez y Saínz, 2011). En estas mujeres también puede haber progresión a estadios neoplásicos que van a depender de la interacción del virus y el hospedero, y de factores como la respuesta inmune, inflamación crónica producto de otros agentes infecciosos, integración del genoma viral al genoma celular, la capacidad oncogénica de los tipos virales (Almonte *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2011)

Los resultados de infección por VPH en mujeres con ASCUS es menor a lo encontrado por López *et al.*, 2012 con el 57,7% de VPH y Farfán, 2009 con una frecuencia de VPH del 20,1%. En estas mujeres con ASCUS y VPH positivas para el tipo 16 se ha registrado un riesgo de 32,5% para el desarrollo de LIEAG (Guglielmo y Rodríguez, 2010).

Los casos de mujeres con ASCUS y VPH (-) podrían estar relacionado con el porcentaje de regresión de las infecciones por VPH mayor al 55% y que pudo ocurrir antes de la resolución de los cambios morfológicos, se sabe que solo entre el 10% y 20% de estas infecciones persisten siendo las que mayor potencia oncogénico presentan (Reina *et al.*, 2008). El proceso de regresión es mediado por el sistema inmune que en condiciones normales resuelve la infección por acción de una inmunidad innata, la activación de una respuesta tipo celular y la creación de anticuerpos dirigidos a las proteínas de la cápside L1 y L2 ( Rincón *et al.*, 2007). Además en estas mujeres es importante aclarar el origen de estas anomalías y descartar si se trató de reacciones asociadas a inflamación. Sin embargo solo el 44,4% presentaron inflamación. En las mujeres con ASCUS y VPH (-), es de considerar el aspecto subjetivo que involucra la evaluación por citología que va desde la toma de la muestra hasta la validación de los resultados mediante la comparación entre expertos (Cendales *et al.*, 2010), ya que existe la posibilidad de tener falsos positivos lo que probablemente explique la ausencia de infección por VPH, al respecto en países en desarrollo la citología ha tenido poco impacto debido a la difícil reproducibilidad de los resultados y a las altas tasas de falsos negativos (Cendales *et al.*, 2010).

El valor predictivo negativo calculado para la PCRL1 fue de 95%, similar al reportado en la literatura para los métodos basados en PCR para la detección de VPH. Teniendo en cuenta este valor predictivo, se puede considerar que las mujeres con ASCUS y VPH negativas tienen un riesgo reducido en comparación a las mujeres con ASCUS VPH positivas (Segovia y Mendoza, 2009). La falta de concordancia también se explica por aspectos de la técnica molecular, entre las cuales está el rompimiento del producto amplificado durante el almacenamiento, tipos de VPH que no amplifican de manera eficiente por discordancias en los residuos de los primers, bajo número de copias virales que no alcanzan a ser detectadas, o también por interrupciones en el ORF de L1 región que amplifican los primers GP5+/GP6+ (Reigosa *et al.*, 2004; Schmitt *et al.*, 2008; Molano *et al.*, 2010). Las discordancias entre la citología y la PCRL1, muestran la necesidad de evaluar alternativas en los procedimientos de tamizaje de CCU los cuales pueden tener efectos importantes en el manejo y orientación de las mujeres con esta infección, permitiendo una detección temprana de lesiones en CCU.

### 4.3 Análisis de asociación entre la infección por el VPH, características poblacionales y lesiones en CCU

#### 4.3.1 Características poblacionales de mujeres con citología (-), ASCUS e infección por VPH

##### 4.3.1.1 Características sociodemográficas e infección por VPH.

El análisis de esta población mediante la prueba Chi-cuadrado, realizado entre la infección por VPH y las características sociodemográficas, gineco-obstétricas y clínicas, demostró que no existe relación estadísticamente significativa, con un nivel de significación  $p < 0,05$ . Estos resultados sugieren que ninguna de las variables incluidas pueden explicar o predecir la infección en la población de estudio, sin embargo es de gran relevancia analizar algunos patrones observados entre los resultados, ya que una vez está presente la infección por el VPH, factores como la edad, el número de compañeros sexuales, infección con otros organismo, la inflamación pueden incrementar el riesgo de desarrollar lesiones en CCU (García et al., 2010; Zhang et al., 2013).

En este estudio con relación a la edad, se encontró la infección por VPH en dos mujeres con citología (-) de 25 y 49 años de edad distribuidas en los rangos de edad a y d. En las mujeres con ASCUS, se encontró infección en una mujer de 36 años. Respecto al Número de compañeros sexuales, se encontró la infección por VPH en mujeres con citología (-) y ASCUS, que registraron en promedio 1-2 compañeros sexuales, como se observa en la Tabla 20.

Tabla 20. Frecuencia de infección por VPH en relación con edad y número de compañeros sexuales de las mujeres con citología (-) y ASCUS.

Edad	C (-)	ASCUS	# compañeros sexuales	C (-)	ASCUS
	# M / (VPH +)	# M / (VPH +)		# M / (VPH +)	# M / (VPH +)
Rangos					
18-27 <sup>a</sup>	36/ (1)				
28-37 <sup>b</sup>	35	3/ (1)	1 – 2	111/ (2)	9/ (1)
38-47 <sup>c</sup>	43	3	Rangos 3 – 4	27	
48-57 <sup>d</sup>	25/ (1)	3	5 – 6	4	
58 y > <sup>e</sup>	4		7 >	1	
p-valor	0,577	0,325		0,900	K*

<sup>a,b,c,d,e</sup>: códigos de los rangos de edad. \*C (-): Citología negativa. # M: Número de Muestras; VPH+: Muestras positivas para la infección por VPH. Fuente: Esta investigación.

#### 4.3.1.1.1 Edad e infección por VPH

Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por Sánchez y Suarez, 2012 que no demostraron una relación estadísticamente significativa entre la edad y la infección por el VPH. Sin embargo, en las mujeres con citología (-) la edad y la infección por VPH, se presentaron acordes con los dos picos reportados en la literatura, de 15 y 25 años y en mujeres posmenopáusicas mayores de 50 años (Alonso, 2005; Delgado *et al.*, 2011). Aunque esta tendencia se ha encontrado de manera similar en otros estudios es importante considerar que pueden existir variaciones producto de las características de la población (Almonte *et al.*, 2008). Como se observa en un estudio desarrollado por de Sanjosé *et al.*, 2007, en un meta-análisis en el que se logró identificar una prevalencia global para el VPH del 26% en mujeres menores de 25 años, de 12% en mujeres entre 35 y 44 años, y del 22% en aquellas mujeres mayores de 54 años. Así también un estudio desarrollado por Xue *et al.*, 2009 demostraron que la tasa de infección por VPH se presentó acorde con dos picos el primero en mujeres  $\leq 20$  años y el segundo en mujeres  $> 60$  años. En Colombia esta distribución también fue observada así: un 26,1% en mujeres menores de 20 años, un 2,3% en aquellas de 45 - 54 años y un 13,2% en mujeres de 55 años y más (Molano *et al.*, 2002).

La infección en mujeres jóvenes puede explicarse debido al inicio de relaciones sexuales a temprana edad que las expone a esta infección (Dávila *et al.*, 2011), durante la adolescencia los tejidos cervico-uterinos son más susceptibles a la acción de carcinógenos y también a agentes infecciosos. Esto se debe a que la zona de transformación es compleja y dinámica, allí las glándulas endocervicales de células columnares epiteliales son sustituidas por células escamosas metaplásicas (Castro *et al.*, 2011). Además las células del cuello del útero son muy activas durante los años en que las mujeres menstrúan y debido a ese desarrollo constante se puede promover un crecimiento anormal siempre que existan otras condiciones (Rodríguez *et al.*, 2009). La zona de transformación es clave en el proceso de patogénesis, se ha comprobado que todas las displasias comienzan con metaplasia escamosa inmadura, que es susceptible a algunos factores vaginales como la acidez, el traumatismo, irritación crónica e infecciones (Tatti, 2008). En edades tempranas la inmadurez cervical junto con deficiencias del flujo cervical protector y la ectopia cervical más frecuente durante la edad reproductiva se involucran con la mayor susceptibilidad de adquirir una infección por VPH (Sánchez, 2012).

Según lo expuesto en la literatura sólo en algunas mujeres la infección persistente por el VPH permitirá el desarrollo de lesiones intraepiteliales y CCU (Almonte *et al.*, 2008; Kasap *et al.*, 2011). Al respecto se ha observado más probabilidad de persistencia de lesiones con cambios clínicos y morfológicos determinantes en la progresión neoplásica en mujeres mayores de 35 años (de la Fuente *et al.*, 2010), lo



que concuerda con lo encontrado en este estudio, infección por VPH en una mujer con ASCUS de 36 años. Además, con relación al grupo de mujeres entre 28-37 años de edad, se ha observado que del 80 - 90% de mujeres menores de 30 años debido a su exposición al VPH han desarrollado una inmunidad natural, que puede permitirles la resolución de la infección aproximadamente durante 24 meses (Mendoza *et al.*, 2012).

En mujeres mayores de 49 años incluidas en este estudio, la infección por VPH puede explicarse principalmente por la reactivación de infecciones latentes asociadas con la inmunosupresión y los cambios hormonales relacionados con la disminución de la función ovárica generada en la menopausia, además se ha observado que en estas mujeres ocurre una disminución de las células T fundamentales en el control de la infección por el VPH y la progresión de lesiones en CCU (León *et al.*, 2011). También es posible que se trate de nuevas infecciones debido al cambio en la conducta sexual de la mujer como de su pareja, involucrándose con nuevas y más parejas sexuales (Tatti, 2008; Mendoza *et al.*, 2012). En estas mujeres la detección eficaz de VPH está sujeta a la calidad de la muestra de cepillado cervical, ya que a esta edad no es posible realizar una buena toma de la muestra para citología en la zona de transformación porque al pasar los años esta zona migra dentro del canal endocervical y se hace difícil su estudio (Safaeian *et al.*, 2007).

Establecer la relación entre la edad y la infección por VPH es importante en la determinación de la población diana para el cribado del VPH. Al respecto, una consideración en las pruebas moleculares es la especificidad, se ha observado que en mujeres jóvenes la especificidad de estas pruebas es menor a la de la citología, sin embargo en grupos de edad de 35 años o más la especificidad de estas pruebas es similar. Entonces en conjunto una mujer con citología normal y VPH negativo tiene un riesgo casi nulo de desarrollar CCU en los siguientes 6 años (Almonte *et al.*, 2010).

#### 4.3.1.1.2 Número de compañeros sexuales e infección por VPH

En este estudio no se encontró asociación estadísticamente significativa entre el número de compañeros sexuales y la infección por el VPH en las mujeres con citología (-), y para las mujeres con ASCUS esta relación no se pudo comprobar (Tabla 20). Estos resultados son similares a los encontrados por Mendoza *et al.*, 2012, que no hallaron una relación estadísticamente significativa con respecto a esta característica. En este estudio no se detectó infección por el VPH en mujeres con más de 2 compañeros sexuales, sin embargo, Roura *et al.*, 2012, demostraron que el riesgo de infección por VPH fue mayor a medida que aumentó el número de compañeros sexuales.

La relación entre la infección por el VPH y el número de parejas sexuales se explica debido al rol del hombre como vector y reservorio del virus (Silva *et al.*, 2013). Considerándose que tener más de dos compañeros sexuales es un factor de riesgo en la infección por el VPH que varía con el tiempo y el número (Silva *et al.*, 2008; Chelimo *et al.*, 2013). En este sentido se ha establecido que el inicio de vida sexual a temprana edad incrementa la probabilidad de tener mayor número de compañeros sexuales (Chávez *et al.*, 2008) y así el riesgo de contacto con la zona de transformación, donde tienen origen el mayor número de neoplasias (Navarro *et al.*, 2011; Carrero, 2012).

En la adolescencia la metaplasia activa puede interactuar con agentes carcinógenos (Chávez *et al.*, 2008), al respecto se conoce que el plasma seminal está constituido por componentes con propiedades inmunosupresoras que protegen a los espermatozoides contra las células del sistema inmune presentes en el cérvix y que son determinantes en la fertilización. Debido a estas propiedades se cree que en presencia de carcinógenos este efecto del plasma seminal puede ser un cofactor que contribuye al desarrollo de neoplasias (Navarro *et al.*, 2011; Carrero, 2012). En este sentido el crecimiento tumoral producto de la infección por VPH posiblemente sea regulado por vías inflamatorias inducidas por mediadores inflamatorios presentes en el líquido seminal, además el plasma seminal influye en la liberación de metaloproteinasas de la matriz lo que potencia la metástasis, puede promover la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-8 las cuales tienen la capacidad de regular el microambiente del tumor, por lo tanto se cree que una mujer que no utiliza métodos de barrera y está constantemente expuesta al plasma seminal por acción de varias parejas sexuales podría tener un desequilibrio en el nivel de mediadores inflamatorios potenciando la tumorigénesis de cuello uterino (Sutherland *et al.*, 2012).

Schillaci *et al.*, 2013, evaluaron 308 parejas que asistieron a los procedimientos de fertilización in vitro con el fin de analizar la relación entre la calidad del espermatozoide y la presencia de VPH, de este modo encontraron que 10/24 pacientes infectados con el VPH su pareja femenina también presentó la infección por VPH de las cuales el 90% fueron positivas para VPH de alto riesgo. También se encontró una concordancia entre el tipo viral del 50%, por lo que estos autores sugieren que el hombre presenta un papel importante en la transmisión y mantenimiento de la infección y como consecuencia el aumento del riesgo de desarrollar CCU. La presencia del VPH en los espermatozoides puede explicarse debido a que estos pueden actuar como portadores de VPH sin presentar una alteración en la calidad del semen, siendo el mecanismo de infección por el VPH a través de la interacción de un receptor específico localizado en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide. Lo anterior permite al VPH utilizar los espermatozoides como un vehículo lo cual puede tener efectos en la génesis de la infección (Schillaci *et al.*, 2013).

#### 4.3.1.2 Características gineco-obstétricas e infección por VPH

En el análisis de infección por VPH y método de planificación en las mujeres con citología (-), se encontró un resultado VPH+ y pomey y un resultado VPH+ sin ningún método de planificación. Y en las mujeres con ASCUS se encontró un resultado VPH+ y jabelle. El análisis entre infección por VPH e infección con otros microorganismos en mujeres con citología (-), se encontró un resultado VPH+ y sin infección con otros organismos y un resultado de VPH+ y Bacilo de Doderlein. En mujeres con ASCUS se encontró un resultado VPH+ y sin infección con otros organismos (Tabla 21).

Tabla 21. Frecuencia de infección por VPH en las mujeres con citología (-) y ASCUS que utilizan métodos de planificación y presentan otras infecciones.

Método de planificación	C (-) # M/ (VPH+)	ASCUS # M/ (VPH+)	Infección con otros organismos	C (-) # M/ (VPH +)	ASCUS # M/ (VPH +)
			Microbiota de Vaginosis Bacteriana	61	3
Pomey	50(1)	3	Bacilo Doderlein	43(1)	
Anovulatorios	19		Microbiota cocoide	7	
DIU	16	1	<i>Trichomonas vaginalis</i>	3	
Jabelle	7	1(1)	<i>Candida sp</i>	5	
Preservativo	6	1	<i>Actinomicetos spp</i>	2	1
Otro	2		Virus Herpes Simplex	5	
			<i>Actinomicetos spp + Bacilo Doderlein</i>	1	
Ninguno	43(1)	3	<i>Actinomicetos spp + Microbiota de Vaginosis Bacteriana</i>	1	
			Bacilo Doderlein + Microbiota de Vaginosis Bacteriana	3	
			No microorganismos	12(1)	5(1)
p-valor	0,126	0,704		0,840	0,638

\*C (-): Citología negativa. # M: Número de Muestras. VPH+: Muestras positivas para la infección por VPH. Fuente: Esta investigación.

#### 4.3.1.2.1 Método de planificación e infección por VPH

No se encontró relación estadísticamente significativa entre el uso de algún método de planificación en mujeres con citología (-) y ASCUS (Tabla 21). Estos resultados son similares a los reportados por Sánchez y Suarez, 2012 quienes no encontraron relación entre el método de planificación y la presencia de VPH en mujeres con citología normal. Sin embargo, considerando los métodos de planificación de las mujeres VPH + se observa que ninguno de estos métodos ofrece protección frente a infecciones de transmisión sexual lo que probablemente se relaciona con la presencia del VPH. En este sentido para Colombia una de las estrategias en la prevención de estas enfermedades fue el reconocimiento del condón como método de barrera y por tanto medida de protección contra las ITS, incluyendo la infección por el VPH (Arrivillaga *et al.*, 2012; Tafurt *et al.*, 2012) ya que es conocido que la falta de protección durante el coito es uno de los factores predisponentes asociados con la infección por VPH (Tamayo y Varona, 2006).

En Las mujeres con ASCUS e infección por VPH utilizan de preferencia el método de planificación Jadelle, anticonceptivo hormonal basado en un implante subdérmico que contiene levonorgestrel uno de los principios activos de algunos ACO y al igual que estos comparten efectos similares como, favorecer la ectopia cervical que induce una mayor exposición de la unión escamo-columnar a potenciales agentes carcinógenos y el incremento de infecciones bacterianas en el cérvix (Solís *et al.*, 2010; Pérez, 2011). Al respecto Tafurt *et al.*, 2012, encontraron que el uso de anticonceptivos hormonales fue mayor en mujeres con citología anormal, considerando que el uso de estos anticonceptivos puede ser uno de los factores implicados en la citología anormal.

El uso de anticonceptivos hormonales es importante de considerar en el desarrollo de cáncer de cuello uterino, se ha reportado que las hormonas esteroides como estrógenos y progesterona pueden ser agentes cancerígenos, y actuar sobre la zona de transformación celular del cuello uterino. Además se ha indicado que el genoma de VPH contiene un segmento de reconocimiento hormonal, que podría ocasionar una interacción entre los anticonceptivos orales y el VPH (Tafurt *et al.*, 2012). Sin embargo estas afirmaciones hasta el momento aplican solo al uso de anticonceptivos orales y el uso prolongado de estos por más de 5 años (Ortiz *et al.*, 2004; La Vecchia y Boccia, 2014), al respecto está documentado que Jadelle tiene un tiempo de duración aproximado de 5 años tiempo después debe ser removido y remplazado por tanto es cuestionable su eventual efecto en el desarrollo de neoplasias.

#### 4.3.1.2.2 Otros organismos e infección por VPH

En el total de población de mujeres con citología (-) y con ASCUS, la infección por el VPH no se asoció con algún organismo considerado patógeno en la vagina de la mujer, solo se encontró la presencia de Bacilo de Doderlein en una mujer de citología (-), entre tanto el resto de la población con infección por VPH no evidencio infección por otros organismo.

La infección por VPH identificada en presencia del Bacilo de Doderlein, concuerda con los reportes de Sánchez y Suarez, 2012, resultado que se consideró normal ya que este organismo hace parte de la microbiota habitual del cuello cervical. Sin embargo es de considerar que influencias hormonales pueden involucrarse en la disminución de los bacilos de Doderlein conllevando a una baja en la defensa de la autodepuración contra otros organismos permitiendo el desarrollo de otras infecciones (Sánchez *et al.*, 2008). En este estudio no se tienen los datos de cantidad de bacilos de Doderlein que permitirían establecer una relación entre el equilibrio de la microbiota normal y la defensa frente a agentes extraños como el VPH. En la población con ASCUS, VPH (-) y co-infección (-), las anomalías en células epiteliales del cuello uterino se explicarían en factores genéticos, inmunológicos o fisiológicos propios de cada tejido, de cada mujer.

#### 4.3.1.3 Cambios celulares reactivos asociados a inflamación e infección por VPH

En el análisis de infección por VPH y los cambios celulares reactivos en las mujeres con citología (-), se presentaron dos resultados con infección por VPH e inflamación leve y en las mujeres con ASCUS un resultado VPH+ sin ningún tipo de inflamación (Tabla 22).

Tabla 22. Frecuencia de la infección por el VPH y algunas variables clínicas.

Cambios celulares Reactivos	C (-) # M/ (VPH +)	ASCUS # M/ (VPH +)
Inflamación leve	32 (2)	1
Inflamación moderada	80	2
Inflamación severa	19	
Atrofia con inflamación	4	1
No reporta	8	5(1)
p-valor	0,137	0,825

\* C (-): Citología negativa. # M: Número de Muestras. VPH+: muestras positivas para la infección por VPH. Fuente: Esta investigación.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre los cambios celulares asociados a inflamación y la infección por el VPH en mujeres con citología (-) y ASCUS (p-valor = 0,137 y p-valor = 0,825) (Tabla 22). Lo que sugiere que el estado de este diagnóstico no permite predecir infecciones por el VPH, sin embargo es de relevancia que las mujeres con citología (-) e infección por VPH hayan presentado inflamación. También es relevante que las lesiones intraepiteliales podrían manifestarse por la presencia de células inflamatorias en la citología en fases tempranas de la enfermedad. Un estudio realizado por Gaitán *et al.*, 2004, encontraron que la prevalencia de lesión intraepitelial asociada a la citología inflamatoria severa fue del 48% por este tipo de resultados se ha propuesto la evaluación colposcópica con biopsia en aquellas mujeres con persistencia de cambios inflamatorios pos- tratamiento (Silva *et al.*, 2008; Cortiñas *et al.*, 2008).

Aunque algunos autores rechazan la utilidad de la citología inflamatoria como predictor de la lesión premaligna del cérvix, recientemente Zhang *et al.*, 2013 encontraron que la infección por VPH está relacionada con inflamación vaginal y erosión cervical moderada, esta relación también se ha encontrado en mujeres que no se sometieron a citología de rutina por más de 10 años. La asociación entre la infección por VPH y la inflamación a partir de los cambios celulares reactivos, se explica por la teoría inflamatoria que está relacionada en la exposición del epitelio cilíndrico del endocérnix con sus pliegues y glándulas hacia el exocérnix (Silva *et al.*, 2008). Según lo reportado en la teoría el proceso de transformación celular y la progresión tumoral en el cérvix está relacionado con un proceso inflamatorio, en estos casos el efecto de las células inflamatorias se relaciona dentro de la producción de mediadores e inhibidores de la infiltración leucocitaria y/o daño vascular y de células residentes tisulares, la estimulación a la expresión de factores de crecimiento y aumento del estrés oxidativo, en consecuencia la persistencia del proceso inflamatorio facilita la transformación celular y la malignización (Carrero, 2012)

#### 4.3.2 Análisis de las mujeres con lesiones LIEBG, LIEAG, CCU y la infección por VPH.

4.3.2.1 Edad de las mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU e infección por VPH. Los resultados de la detección molecular del VPH y la edad de las mujeres diagnosticadas con alguna lesión LIEBG, LIEAG y CCU no revelaron una relación estadísticamente significativa entre estas variables (Tabla 23). En general la infección por el VPH se presentó en mayor frecuencia en los rangos de edad de 38-47 y 58>.

Tabla 23. Frecuencia de infección por VPH según la edad de las mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU.

Edad	LIEBG # M/ (VPH +)	LIEAG # M/ (VPH +)	CCU # M/ (VPH +)	Total
18-27	1	2 (1)	2 (1)	5
28-37	1	6	-	7
38-47	3	5 (2)	1 (1)	9
48-57	2 (1)	1	1 (1)	4
58 y >	-	1	6 (4)	7
p-valor	0,670	0,358	0,736	32

<sup>a,b,c,d,e</sup>: códigos de los rangos de edad. \*# M: Número de Muestras. VPH+: Muestras positivas para la infección por VPH. Fuente: Esta investigación.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la edad de las mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU respecto a la infección por el VPH (Tabla 23). En las mujeres diagnosticadas con LIEBG se detectó infección por el VPH en una mujer de 41 años de edad, al respecto es de considerar que del 70-80% de estas lesiones se pueden autorresolver (Bosch *et al.*, 2013). Molano *et al.*, 2010 reportaron que la regresión de estas lesiones esta influenciada por la edad, así mujeres mayores de 30 años presentaron mayores tasas de regresión que las mujeres más jóvenes, demostrando lo contrario a los reportes de otros estudios en los cuales el aumento en la edad se asoció con el riesgo de persistencia de la infección y desarrollo de lesiones intraepiteliales de alto grado. Sin embargo, considerando el tipo viral en esta mujer una prueba positiva para el VPH 16 implica un mayor riesgo de progresión. Se ha reportado que para el VPH 16 el riesgo de progresión a NIC III durante 12 años de seguimiento, en mujeres con dos pruebas de VPH positivas una al inicio del estudio y otra a los dos años fue del 47,4% (Bosch *et al.*, 2013). En general en las mujeres con LIEBG no se reportó alta frecuencia de infección por VPH, lo que es diferente a los reportes en la literatura que plantea que la infección por VPH es una causa fundamental en la aparición de los NIC (Bosch *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2013).

En los reportes de LIEAG se encontró infección por el VPH en tres mujeres de 26, 41 y 47 años de edad. En este estudio la mayoría de mujeres con LIEAG fueron VPH negativas, contrario a lo reportado por del Pino *et al.*, 2011 que indicaron un alto porcentaje de mujeres con infección por VPH y este tipo de lesiones, de las cuales la mayor frecuencia de VPH se observó en mujeres mayores de 31 años, sin embargo también se reportó casos VPH negativos cuyo porcentaje aumento con la edad. En la presente investigación mujeres menores de 26 años con NIC II podrían tener un proceso de aclaramiento o resolver la infección pues se ha reportado que mujeres de 15 - 25 años tienen una probabilidad de regresión del 75% (Bosch *et al.*, 2013).

En las mujeres con CCU la infección se detectó en todos los rangos de edad que se establecieron para esta población. Sin embargo, la detección de VPH asociado a CCU fue más frecuente en el rango de 58 o más años de edad. Al respecto Low *et al.*, 2012 reportaron que el CCU fue más común en mujeres entre los 30-39 años. Según la teoría se ha demostrado que las mujeres menores de 25 años y mayores de 40 años son de alto riesgo para la infección por el VPH y el CCU, respectivamente (Silva *et al.*, 2008).

En la relación edad-infección por VPH, se ha indicado una alta frecuencia de infección en mujeres mayores de 40 años, al respecto Zhang *et al.*, 2013 demostraron que la tasa de infecciones continuas por VPH en mujeres mayores de 45 años fue más alta que la tasa de infecciones nuevas, sugiriendo que en estas mujeres la recurrencia de infección por VPH es mayor que en mujeres jóvenes. Sin embargo, el mecanismo por el cual se ha establecido la relación entre la infección por VPH y la edad falta por esclarecerse. En mujeres mayores de 48 años como las incluidas en nuestro estudio diagnosticadas con alguna lesión en CCU, esta relación edad-infección por VPH, ha sido explicada por la reducción en los niveles de estrógenos en la post-menopausia, que probablemente influye en la capacidad para eliminar la infección aumentando la susceptibilidad a infecciones múltiples por VPH (Zhang *et al.*, 2013) y la persistencia viral (Baldauf *et al.*, 2013).

En esta población la infección por el VPH se detectó en mujeres menores de 27 años con LIEAG y CCU, estos hallazgos permiten reconsiderar el cribado primario utilizando pruebas de detección de VPH en mujeres de 30 años o mayores reportado por Bosch *et al.*, 2013. Es evidente que en nuestra población la infección por el VPH así como las lesiones neoplásicas es diferente a lo conocido en otras poblaciones. Las mujeres jóvenes diagnosticadas con lesiones en CCU, probablemente estén relacionadas con el inicio precoz de la vida sexual, durante el periodo de metaplasia escamosa el cual es el momento más crítico para el riesgo potencial de transformación celular y para el desarrollo de neoplasia cervical. Durante este periodo el cuello uterino es más susceptible a las proteínas oncogénicas liberadas por los VPH y se puede albergar VPH en sus células metaplásicas con la consiguiente transformación de estas (Cartaya *et al.*, 2010; Tafurt *et al.*, 2012).

#### 4.3.2.2 Lesiones LIEBG, LIEAG, CCU e infección por VPH

El análisis de regresión logística entre las lesiones en CCU y la infección por el VPH, indicó que las mujeres con CCU tiene un alto riesgo de infección por el VPH con un OR=1, sin embargo, las LIEBG y LIEAGI también se asociaron con la presencia de VPH. En general se encontró una relación estadísticamente significativa entre la



detección molecular de VPH y las lesiones en CCU, p-valor < 0,05, cabe resaltar que el CCU fue la categoría que registró mayor frecuencia de infección por el VPH 70% (7/10), (Tabla 24).

Tabla 24. Frecuencias de infección por VPH en mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU.

Lesiones en CCU	# M/ (VPH +)	p-valor	OR	I.C 95% OR	
				Inferior	Superior
LIEBG	7 (1)	0,39	0,71	0,006	0,881
LIEAG	15 (3)	0,18	0,107	0,017	0,683
CCU	10 (7)	0,29	1		

\*#M: Número de Muestras. VPH+: Muestras positivas para la infección por VPH.  
Fuente: Esta investigación

La relación entre las lesiones LIEBG, LIEAG y CCU con respecto a la infección, fue significativa (Tabla 24), estos resultados concuerdan con los reportados por Silva *et al.*, 2013 quienes encontraron una fuerte asociación de la infección por el VPH con lesiones de alto grado y cáncer invasivo (OR = 10,56 y OR = 19,07), datos que permitieron corroborar que la infección por el VPH está implicada en el desarrollo de cáncer cervical. En esta investigación la infección por VPH fue más frecuente a medida que aumentó el grado de lesión, de esta manera se detectó infección por el VPH en el 14,3% de las mujeres con LIEBG, en el 20% de LIEAG y en el 70% de las mujeres con CCU. Estos resultados se pueden comparar con los reportados por López *et al.*, 2012 que demostraron que la frecuencia de VPH aumento conforme a la severidad de las anomalías en células epiteliales presentándose como sigue: 10,9% en pacientes con citología normal, del 31-75% en pacientes con células atípicas, 63,2% en LSIL y 83% en HSIL.

La detección de infección por VPH en mujeres con LIEBG y LIEAG fue menor a lo reportado por Carrillo *et al.*, 2010 que encontraron infección por VPH en el 97,5% de mujeres con LIEBG y en el 92,9% de mujeres con LIEAG. Al respecto según Bosch *et al.*, 2002 la infección por el VPH es indispensable en estos casos, siempre y cuando se tenga la certeza del diagnóstico histopatológico. Así también se cree que el CCU es el resultado de la infección no resuelta de ciertos tipos de VPH (Lizano *et al.*, 2009). Sin embargo, la detección del VPH en mujeres con CCU varía entre el 80 y 99,7%, lo que depende de la sensibilidad de la técnica utilizada y la veracidad del diagnóstico histológico (Molano *et al.*, 2010). En el presente estudio la frecuencia de infección por VPH en las mujeres con CCU fue menor a lo reportado por Molano *et al.*, 2010 quienes encontraron infección por VPH en el 94,6% de mujeres con CCU. Considerando lo anterior la ausencia del VPH en algunas de las lesiones en CCU, se podrían explicar por varios aspectos.

Las limitaciones en la técnica, al respecto en esta investigación, la metodología empleada PCRL1 utiliza los primers GP5+/GP6+ que amplifican sobre la diana L1, en este sentido es conocido que en las lesiones de alto grado y CCU, el DNA de VPH se integra en el genoma celular y que durante este proceso puede haber pérdida del fragmento de lectura abierta (ORF) de L1 por interrupciones o deleciones, por esta razón los ensayos que solo detectan el gen L1 de VPH pueden disminuir su sensibilidad en la detección del VPH y por tanto de una lesión grave, al respecto Molano *et al.*, 2010 demostraron casos de CCU positivos para VPH de alto riesgo utilizando como diana E7, los mismos casos VPH negativos utilizando como diana L1, lo anterior se pudo afirmar por el alto porcentaje de integración del VPH 16 alrededor del 60% .

Debido a estos inconvenientes el diseño de una herramienta de diagnóstico molecular integral debe permitir la detección de los genes virales que se expresan en diferentes etapas de la enfermedad (Molano *et al.*, 2010 del Pino *et al.*, 2011; 2010; Shen y Rebeles, 2013). Además en la detección de VPH a partir de sistemas de PCR se debe tener en cuenta que algunos primers amplifican de manera efectiva sobre algunos tipos específicos de VPH, en este sentido puede haber un agotamiento de reactivos como los dNTPs lo que interfiere en la amplificación de otros tipos de VPH con los cuales los primers no alinean completamente (Arroyo *et al.*, 2013).

La muestra utilizada también tiene limitaciones, en el caso de biopsias se debe contar con la confirmación histológica, ya que se ha observado que algunos casos de lesiones en CCU y VPH negativas, con frecuencia han tenido una colposcopia no satisfactoria, sin lesiones identificables o con lesiones más pequeñas que aquellas positivas para el VPH. Al respecto Eltoum *et al.*, 2007 reportaron una variación de 0-17% de falsos negativos producto de errores en el diagnóstico histológico. Molano *et al.*, 2010 realizaron una confirmación del diagnóstico histológico antes de iniciar la detección de VPH, concluyendo que un diagnóstico histológico inadecuado puede conllevar a discrepancias en las incidencias y prevalencias de VPH en lesiones pre neoplásicas de alto y bajo grado.

Las muestras incluidas en parafina pueden tener un DNA degradado o fragmentado, pueden existir problemas de inhibición en la PCR producto de los reactivos y la parafina utilizados durante la fijación del tejido (Molano *et al.*, 2010). Además la biopsia puede ser ineficiente para evidenciar la infección por VPH. Al respecto Webersinke *et al.*, 2013 realizaron un estudio para comparar muestras de frotis de cuello uterino y biopsia de la misma mujer con NIC, encontrando discrepancias en la detección de VPH de alto riesgo, por lo se concluyó que las muestras de frotis cervicales permiten detectar eficazmente la infección por VPH y

que las muestras de biopsias que en este caso fue muestra fresca (sin parafina), pueden pasar por alto en algunos casos el riesgo de progresión a CCU al no detectar infección por el VPH 16. En este mismo estudio 14 muestras de biopsias cervicales fueron negativas para la infección por VPH, mientras que los correspondientes frotis fueron VPH positivos, al respecto los autores sustentaron estos resultados debido a la recogida de muestras inadecuadas.

En 85,7% de las mujeres con LIEBG no se detectó la infección por VPH, en estos casos cabe considerar si se trata de infecciones que fueron resueltas y por lo tanto desaparecieron antes de la resolución de la lesión (Eltoum *et al.*, 2007). Al respecto Molano *et al.*, 2010 encontraron que el mujeres con LSIL y ASCUS/AGUS diagnosticadas por citología, al comparar el tiempo de eliminación de la infección vs tiempo de regresión del resultado citológico, el 21,5% de mujeres (43/200), resolvieron la infección antes que los cambios anormales detectados por citología. En las mujeres con LIEBG y VPH (+) es conocido que solo algunas de estas infecciones progresaran a LIEAG y CCU siempre y cuando las infecciones sean productivas y aumenten la probabilidad de progresión (Quintero *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2009; Lizano *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2013).

En mujeres con LIEAG y VPH (-) es posible la presencia de una infección latente en la cual no existe una replicación activa y el virus puede permanecer en forma episomal o integrado en el DNA celular del hospedero, en cuyo caso la interrupción en el ORF L1 durante este evento interferiría en su detección (Vinokurova *et al.*, 2008). El estado de latencia afecta la sensibilidad de la PCR, más aun si la muestra tomada no contiene las células portadoras o estas son escasas (Quintero *et al.*, 2008). En las LIEAG es de considerar que aun cuando el VPH no pueda ser detectado en un momento dado, existe la posibilidad que esa infección en forma latente se reactive y ocurra la progresión a CCU (Lizano *et al.*, 2009). Algunos estudios sugieren que la detección de DNA del VPH tiene una sensibilidad que varía entre 66 y 95% en mujeres que presentan Neoplasia Cervical Intraepitelial – NIC II y NIC III (Sherris *et al.*, 2010).

En la determinación de la progresión a CCU de las mujeres diagnosticadas con LIEBG y LIEAG, es importante además de la detección del VPH, conocer la carga viral que se asocia a la incidencia del VPH. En este sentido Jacquín *et al.*, 2013 reportaron que las mujeres con carga de DNA de VPH 16 por encima de 200 copias/10<sup>3</sup> células tienen más de 18 meses de incidencia acumulada que aquellas mujeres con carga viral menor a 200 copias/10<sup>3</sup> células, sin embargo cabe aclarar que la utilidad clínica de la carga viral del VPH sigue siendo controvertida.

#### 4.3.2.3 Lesiones LIEBG, LIEAG, CCU y tipos de VPH

Respecto a los tipos de VPH y su frecuencia en las lesiones en CCU, se observó que las mujeres con CCU fueron las que presentaron más tipos de VPH, como se observa en la Tabla 25.

Tabla 25. Frecuencia de tipos de VPH encontrados en las mujeres con LIEBG, LIEAG y CCU

Diagnostico	Tipo viral						Total
	16	33	58	6	73	N.I	
LIEBG	1(100%)	-	-	-	-	-	1
LIEAG	2(66,7)	1(33,3)	-	-	-	-	3
CCU	1(14,3%)	-	2(28,6%)	2(28,6%)	1(14,3%)	1(14,3%)	7

N.I: No identificado. Fuente: Esta investigación.

Los tipos de VPH detectados en las mujeres con lesiones en CCU fueron VPH 16 y VPH 33. Ciapponi *et al.*, 2011, encontraron VPH 16 en el 46,5% de las LIEAG. Silva *et al.*, 2013 reportaron VPH 16 en el 46% de LIEAG. Melo *et al.*, 2003 indicaron que el VPH 16, VPH 33 y VPH 45 fueron los más frecuentes en LIEAG y carcinomas. La frecuencia de tipos de VPH en mujeres con CCU de esta investigación es diferente a lo reportado por Molano *et al.*, 2010, quienes encontraron VPH 16 y VPH 58 en el 48% y 5% de mujeres con CCU, respectivamente, sin reportar infección por los tipos VPH 6 y VPH 73 (Tabla 25).

En nuestro estudio la detección de VPH 16 en LIEBG y LIEAG sugiere la eventual progresión a CCU, ya que existe evidencia de que el genoma del VPH 16 no siempre se ha encontrado de forma integrada en algunos carcinomas y que la infección por este tipo es más persistente lo que asegura una progresión a CCU en menor tiempo en comparación con otros tipos como el VPH 33 (Lizano *et al.*, 2009; Vinokurova *et al.*, 2008).

Vinokurova *et al.*, 2008 evidenciaron que los tipos VPH 16, VPH 18 y VPH 45 están presentes de forma integrada en algunos carcinomas más frecuente respecto a VPH 33, concluyendo que a medida que aumenta la severidad de la lesión aumentan los porcentajes de integración. En el estudio anterior también se concluyó que el tiempo de progresión de las lesiones precancerosas inducidas por los tipos VPH 16 y VPH 45 es más corto que el tiempo de progresión de estas lesiones inducidas por VPH 33.

La infección persistente por el VPH sigue siendo una de los principales factores de riesgo para las lesiones de alto grado y CCU (Lizano *et al.*, 2009). En estas mujeres

diagnosticadas con lesiones en CCU la determinación de los tipos de VPH resulta ser importante en el control post tratamiento, ya que es posible que existan otros factores influyentes en la persistencia de infección por VPH de alto riesgo posterior al tratamiento, al respecto Mongelós *et al.*, 2013 encontraron que el 28% de mujeres con lesiones en cáncer de cuello uterino previamente sometidas a tratamiento presentaron infección por el VPH, por tanto este resultado sugiere la importancia de considerar la detección de VPH y la carga viral en forma complementaria a la citología con el objetivo de identificar mujeres tratadas por lesiones en CCU con mayor riesgo de desarrollar recidivas.

Más del 80% de las LIEBG y el 100% de las LIEAG están asociadas con VPH-AR (Dávila *et al.*, 2011), aproximadamente el 10% de la infección causada por estos tipos evoluciona aun proceso de transformación, provocando la desregulación de oncogenes virales E6 y E7, que a su vez repercuten en la inestabilidad cromosómica y acumulación de mutaciones, necesarias para el proceso de carcinogénesis. Se ha demostrado que la integración viral, proceso característico en la transformación depende del tipo viral y que su papel es garantizar una expresión constitutiva de los oncogenes virales en un nivel requerido para el mantenimiento transformado de la célula (Vinokurova *et al.*, 2008; Dauphin *et al.*, 2010; Schmitz *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONES

El análisis de asociación de características tales como edad, infección con otros microorganismos, uso de métodos anticonceptivos no permitió explicar la infección por VPH.

La detección de LIEAG en mujeres >60 años permite evidenciar el problema relacionado con el diagnóstico tardío y el mayor riesgo de complicaciones y mortalidad en estas mujeres respecto a aquellas en edad reproductiva, quienes acuden con mayor frecuencia a la toma de citología y a quienes se dirigen los programas de prevención de CCU.

La PCR –L1 + Secuenciación permitió determinar tipos de VPH a partir de cepillado cervical de muestras negativas para VPH mediante RLB.

Se implementó una metodología de tipificación de VPH a partir de lisado celular, sin extracción previa de DNA, mediante PCR-L1 + Secuenciación DNA, que podría servir en la detección temprana e intervención oportuna de la población en riesgo de cáncer de cuello uterino.

Mediante el análisis de secuenciación se encontraron los tipos de VPH 6, 16, 33, 45, 58, 73 y 97, en la población de estudio, y en una muestra se logró detectar infección por co-tipos 6 y 97, lo cual deja ver el potencial de la metodología empleada en el tamizaje de mujeres en riesgo de infección por VPH.

Los tipos más frecuentes detectados fueron VPH 16, 6 y 58, la variación en la frecuencia de detección de los tipos de VPH puede estar relacionada con eventos de transmisión viral propios en cada población.

La detección de VPH AR tipo 16 mediante PCR-L1 + secuenciación en mujeres con ASCUS indica la importancia de implementar metodologías moleculares para el diagnóstico temprano de la infección por VPH en mujeres con riesgo de progresión a CCU.

El análisis de regresión logística determinó que las mujeres con CCU fueron las que presentaron mayor frecuencia de VPH, por tanto la infección por VPH constituye un factor determinante en el desarrollo de CCU.

En la detección molecular de VPH, el índice Kappa demostró concordancia entre citología y PCR-L1/Secuenciación, esta última permitió la detección y tipificación de VPH-AR 16, 58 y 33 en tanto que la citología solo permitió la detección de anormalidad sin identificación del tipo de VPH.

## RECOMENDACIONES

Es necesario continuar hacia la validación de la metodología empleada en esta investigación para conocer la verdadera aplicabilidad, sensibilidad, robustez, reproducibilidad y costo-efectividad respecto a otras metodologías de tipificación de VPH, comercialmente disponibles.

Es recomendable realizar el seguimiento a aquellas mujeres con citología (-), ASCUS (+) y VPH (+), con el fin de motivar a las empresas prestadoras de salud la intervención oportuna y así minimizar la aparición de nuevos casos de CCU.

En futuras investigaciones es recomendable incluir metodologías que evalúen la presencia de genes como E6 y E7, ya que permitirían detectar la infección por VPH en muestras con CCU y evaluar la carga viral, inicio de las relaciones sexuales y otros factores han sido reportados en la génesis del CCU.



## BIBLIOGRAFÍA

Adamopoulou M., Vairaktaris E., Nkenke E., Avgoustidis D., Karakitsos P., Sioulas V., Nisyrios T., Yapijakis C., Prevalence of human papillomavirus in saliva and cervix of sexually active women. *Gynecologic Oncology*. 129 (2013) 395-400.

Aguayo F., Meneses M., Corvalan A., Munoz M., Koriyama C., Eizuru Y., Akiba S., Identificación de virus papiloma humano 16 (VPH-16) en carcinoma queratinizante de pulmón. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*. 18 (2002).

Almonte M., Albero G., Molano M., Carcamo C., García P., Pérez G., Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 26 (2008) L16-L36.

Almonte M., Murillo R., Sánchez G., Jerónimo J., Salmerón J., Ferreccio C., Lazcano E., Herrero R., Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Salud pública de México*. 52,6 (2010) 544-559.

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

Alp G., Genomic organization and proteins of human papillomavirus. *Mikrobiyol Bul*. 46, 3 (2012) 507-15.

Alterio G., Mendoza I., Mendoza R., Peraza E., Pérez H., Sánchez A., Hallazgos citológicos y factores de riesgo para patología preinvasora e invasora de cuello uterino. Área de influencia del ambulatorio urbano tipo II "Dr. Rafael Pereira". Barquisimeto, Estado Lara (Venezuela). *Revista Salud Pública y Nutrición*. 8, 3 (2007).

Álvarez A., Sepúlveda J., López F., Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. *Investigaciones Andina*. 24, 14 (2011) 130p.

Álvarez S., Principales afecciones en los contextos familiar y social. Medicina General Integral. Editorial ciencias médicas volumen II segunda edición. La Habana (2008).

Alvis N., Mattar S., Garcia J., Conde E., Diaz A., Infecciones de transmisión sexual en un grupo de alto riesgo de la ciudad de Montería, Colombia. *Revista de Salud Pública*. 9, 1 (2007) 86-96.

Amirian S., Adler K., Scheurer M., Associations between human herpesvirus-6, human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Letters*. 336 (2013) 18–23.

Antonsson A., Michael K., Pawlita M., Lehmann M., Nindl I., Detection and typing of cutaneous human papillomavirus types—A comparison of three different methods. *Journal of Virological Methods*. 189 (2013) 305– 310.

Arias A., Botero S., Castaño J., Chicué J., Díaz D., Giraldo G., López A., Sánchez S., Villegas O., Zamudio M., Hallazgos en la citología vaginal y colposcopia y su asociación con infección con VPH y otros factores de riesgo para Cáncer de cérvix en mujeres atendidas en entidades de Manizales (Colombia), 2000-2007. Universidad de Manizales, Facultad de Medicina, Centro de investigaciones (2010).

Arrivillaga M., Tovar M., Correa D., Evidencia poblacional y análisis crítico de determinación social sobre el uso del condón en Colombia. *Revista Cubana de Salud Pública*. 38, 4 (2012) 553-561.

Arroyo S., Smelov V., Bzhalava D., Eklund C., Hultin E., Dillner J., Next generation sequencing for human papillomavirus genotyping. *Journal of Clinical Virology*. 58 (2013) 437-442.

Baldauf J., Averous G., Baulon E., Thoma V., Talha-Vautravers A., Sananes N., Akladios Y., Néoplasies intraépithéliales du col. *Encycl Méd Chir, Gynécologie*. 49,3 (2013) 1-23.

Berdayes M., Valléz M., lesiones preinvasivas de cuello uterino. Departamento de terapéutica oncológica. Hospital Universitario Ruiz y Páez (H.U.R.P.). Tesis para obtener el título de médico. Ciudad Bolívar (2010).

Bernard U., The clinical importance of the nomenclature evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 32 (2005) 1-6.

Bosch F., Lorincz A., Muñoz N., Meijer C., Shah K., The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 55, 4 (2002) 244-265.

Bosch X., Broker T., Forman D., Moscicki A., Gillison M., Doorbar J., Stern P., Stanley M., Arbyn M., Poljak M., Cuzick J., Castle P., Schiller J., Markowitz L., Fisher W., Canfell K., Denny L., Franco E., Steben M., Kane M., Schiffman M., Meijer C., Sankaranarayanan R., Castellsagué X., Kim J., Brotons M., Alemany L., Albero G., Diaz M., de Sanjosé S., Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. *Vaccine*. 31S (2013) I1–I31.

Bousarghin L., Touzé A., Sizaret P., Coursaget P., Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *Journal of Virology*. 77 (2003) 3846-50.

Bravo M., Medina O., Melgarejo D., Serrano M., Infección por virus del papiloma humano en una muestra de mujeres jóvenes con citología normal. *Revista Colombiana de Cancerología*. 8, 2 (2004) 5-10.

Brebi M., Ili G., López M., García M., Melo A., Montenegro H., Leal R., Guzmán G., Roa S., Detección y tipificación de Virus Papiloma Humano en adenocarcinoma de cuello uterino mediante *Reverse Line Blot*, región de la Araucanía-Chile. *Revista Médica de Chile*. 3, 137 (2009) 377-382.

Burd E., Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 16 (2003) 1-17.

Burk R., Harari A., Chen Z., Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 445, 1-2 (2013) 232-243

Camargo S., Determinación de la prevalencia de infección y co-infección por virus del papiloma humano (VPH) y asociación con diferentes factores de riesgo. Universidad del Rosario Escuela De Medicina y Ciencias de la Salud Unidad de Genética. Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de Maestría en Ciencias con énfasis en Genética Humana (2011).

Camejo M., Mata M., Díaz M., Alteraciones en la citología cervical y respuesta inmune contra *Chlamydia trachomatis* en trabajadoras sexuales. *Investigación clínica*, Maracaibo. 44, 4 (2003).

Cañadas M., Lloveras B., Lorincz A., Ejarque M., Font R., Bosch X., de Sanjosé S., Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud pública de México*. 48, 5 (2006) 373-378.

Carrero Y., Callejas D., Estévez J., Gotera J., Nuñez J., Atencio R., Porto L., Molsalve F., Relación entre el Herpes simple tipo 2 y las lesiones preinvasivas de cuello uterino. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 23, 4 (2006).

Carrero Y., Patrones de infiltración leucocitaria y de expresión tisular de quimioquinas, factor de crecimiento endotelial vascular y mediadores del metabolismo oxidativo en lesiones inflamatorias y neoplásicas del cervix. Universidad de Alcalá. Departamento de medicina unidad i+d asociada AL CNB-CSIC. Tesis Doctoral. Alcalá de Henares (2012).

Carretero M., Cáncer de cuello de útero. Nuevas perspectivas en la prevención. *Offarm Farmacia y Sociedad*. 27, 5 (2008).

Carrillo A., Hernández M., Hernández T., Zárate A., Terapéutica en infección por virus del papiloma humano. *Ginecología y Obstetricia de México*. 80, 11 (2012) 712-719.

Carrillo A., López G., González M., Caraballo L., Venegas C., Detección del virus papiloma humano: influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión intraepitelial cervical. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela* 70, 4 (2010) 240-248.

Cartaya M., Hernández I., González Y., Álvarez N., Factores de riesgo del cáncer cérvico-uterino. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 14, 5 (2010).

Castellsagué X., Bosch F., Muñoz N., The male role in cervical cancer. *Salud pública de México*. 45, (2003) 345-353.

Castro A., Pérez M., Virus del Papiloma Humano. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica*, 70, 606 (2013) 211-217.

Castro J., Hernández C., Madrid M., La anticoncepción hormonal como factor de riesgo para cáncer cérvicouterino: evidencias biológicas, inmunológicas y epidemiológicas. *Ginecología y Obstetricia de México*. 79, 9 (2011) 533-539.

Cavazza M., Correnti M., Pruebas moleculares para la detección del virus papiloma humano. Desafíos y posibilidades. *Dermatología Venezolana*. 3, 42 (2004) 6-10.

Cendales R., Wiesner C., Murillo R., Piñeros M., Tovar S., Mejía J., La calidad de las citologías para tamización de cáncer de cuello uterino en cuatro departamentos de Colombia: un estudio de concordancia. *Biomédica*. 30, 1 (2010).

Chávez M., Virelles M., Bermejo W., Viñas S., Intervención comunitaria sobre factores de riesgo del cáncer cervicouterino. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 12, 5 (2008).

Chelimo C., Wouldes T., Cameron L., Elwood J., Risk factors for and prevention of Human Papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *Journal of Infection*. 66, 3 (2013) 207-217.

Chen X., Garcea R., Goldberg I., Casini G., Harrison S., Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Molecular Cell*. 5, 3 (2000) 557-567.

Ciapponi A., Bardach A., Glujovsky D., Gibbons L., Picconi M., Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 6, 10 (2011) e25493.

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.

Cortes C., Programas para el control de cáncer de cuello uterino. Análisis Sociopolítico 1975-1995. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de medicina. Instituto de Salud Pública. Bogotá, Colombia (2007).

Cortiñas P., Ríos K., Sánchez J., Citología cervical como pesquisa: Factores para mejorar la sensibilidad. *Gaceta Médica de Caracas*. 116, 1 (2008) 37-40.

Cruz J., Quesada Y., Valdés A., Hernández P., Turcios S., Anticoncepción y enfermedades de transmisión sexual. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 23, 2 (2007).

Cuschieri C., Heather A., The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *Journal of Clinical Virology*. 32 (2005) 34-42.

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

Dauphin N., Kobetz E., Hnatyszyn J., Twiggs L., Lucci J., Women with HIV are more commonly infected with non-16 and -18 high-risk HPV types. *Gynecologic Oncology*. 116 (2010) 572–577.

Dávila B., Leal R., López L., Maya R., Mendoza A., Mora K., Alteraciones citológicas y algunos factores de riesgo para patología de cuello uterino en pacientes mayores de 15 años. Ambulatorio Urbano Tipo I “Santa Rosa”, Municipio Iribarren estado Lara. Diciembre 2009-Mayo 2010. Universidad centroccidental “Lisandro Alvarado” Decanato de ciencias de la salud Dr. “Pablo Acosta Ortiz” Departamento de Medicina Integral en el medio Urbano. Tesis. 2010.

Dávila H., García A., Álvarez F., Cáncer de cuello uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 36, 4 (2010) 603-612.

Dávila H., García A., Álvarez F., Castillo Y., Imengana L., Matos Z., Neoplasia intraepitelial de cuello uterino en un área de salud de la Isla de la Juventud, Cuba: 1999-2008. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*. 76, 4 (2011) 236 – 243.

De la Fuente D., Guzmán S., Barboza O., Gonzáles R., Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria*. 12, 49 (2010) 231-238.

De Larrea G., Martín F., Sosa C., Ávila J., Lloret M., Román M., Vega G., Cáncer cérvicouterino y Virus del Papiloma Humano. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 77, 4 (2012) 315-321.

De Palo G., Chanen W., Dexeus S., Infección del cuello uterino por el papiloma virus humano en patología y tratamiento del tracto genital inferior. Barcelona: Editorial Masson. (2001) 42-61.

De Sanjosé S., Diaz M., Castellsagué X., Clifford G., Bruni L., Muñoz N., Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 7 (2007) 453-9.

De Villiers E., Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 445(2013) 2-10.

De Villiers E., Fauquet C., Broker T., Bernard H., Zur Hausen H., Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324 (2004) 17–27.

Del Pino M., Rodriguez L., Alonso I., Torné A., Rodriguez A., Fusté P., Castillo P, Nonell R., Lhiga N., Ordi J., Clinical, colposcopic and pathological characteristics of cervical and vaginal high-grade lesions negative for HPV by Hybrid Capture 2. *Gynecologic Oncology*. 122 (2011) 515-520.

Delgado I., Rizo A., Zulueta G., Factores de riesgo de Neoplasia Intraepitelial Cervical en mujeres de 25-60 años. III Congreso Regional de Medicina Familiar Wonca Iberoamericana - CIMF X Seminario Internacional de Atención Primaria de Salud Versión Virtual. (2011).

Denslow S., Westreich D., Firnhaber C., Michelow P., Williams S., Smith J., Bacterial vaginosis as a risk factor for high-grade cervical lesions and cancer in HIV-seropositive women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 114 (2013) 273–277.

Doorbar J., Molecular biology of human papilloma-virus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 110 (2006) 525-41.

Duarte D., Asociación de la infección por VPH y la presencia de Anticuerpos IGG e IGA específicos en mujeres colombianas con Citología normal. Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana (2011).

Eltoum I., Chhieng D., Crowe D., Roberson J., Jin G., Broker T., Significance and possible causes of false-negative results of reflex human Papillomavirus infection testing. *Cancer*. 25, 111 (2007) 154-9.

Encuesta Nacional de demografía y salud – ENDS [en línea] 2010. [Fecha de consulta: 24 de octubre de 2012] Disponible en: <[www.profamilia.org.co/encuestas/Profamilia/Profamilia/documentos/boletines/departamentales/Narino.pdf](http://www.profamilia.org.co/encuestas/Profamilia/Profamilia/documentos/boletines/departamentales/Narino.pdf)>

Estrada L., Archivos Médicos de Actualización en Tracto Genital Inferior. Sistema Bethesda, diez años después. 6 (2012).

Fajardo Á., Méndez F., Molina L., Factores que inciden en la no realización de la citología vaginal en las mujeres Bogotanas. 2008. *Investigación Andina*. 12, 21 (2010) 61-69.

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: Magister Scientiae en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Postgrado Inter facultades, 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 (ASCUS) en Bogotá, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas*. 39, 1 (2010) 42-54.

Feller L., Khammissa R., Wood N., Lemmer J., Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infectious Agents and Cancer*. 25 (2009) 4-16.

Flores R., Rivera R., García E., Arriaga A., Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. *Salud Pública de México*. 45,5 (2003) S694-S697.

Gaitán H., Rubio J., Eslava 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. *Revista Salud Pública*. 6, 3 (2004) 253-269.

García A., Briceno I., Castillo M., Aristizabal 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).

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 A., Aristizábal F., Briceño I., Castillo M., Niveles de expresión de virus del papiloma humano de alto riesgo en mujeres sin lesiones cervicales y pacientes con lesiones preneoplásicas y neoplásicas de cuello uterino en la ciudad de Bogotá. *Revista Colombiana de Cancerología*. 17,4 (2013)



García C., Amaya J., Naranjo E., Prevalencia de lesión escamosa intraepitelial de cérvix en pacientes con diagnóstico citológico de atipia escamosa de significado indeterminado (ASCUS), en una institución de complejidad media en Bogotá, Colombia. *Revista Colombiana de obstetricia y Ginecología*. 58,2 (2007) 124-128.

García M., García S., Copolillo E., Cora E., Barata A., Vay C., Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas: Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Argentina de Microbiología*. 38, 1 (2006) 9-12.

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

Gómez T, Sobreexpresión del ARN mensajero de las oncoproteínas E6-E7 del Virus del Papiloma Humano y detección de P16ink4a en la lesión escamosa intraepitelial de bajo grado de cérvix uterino. Tesis doctoral. Universitat autònoma de Barcelona, Facultat de Medicina Departament de Pediatria, Obstetricia I Ginecologia I Medicina Preventiva (2009).

González M., Murillo R., Osorio E., Gamboa O., Ardilla J., Prevalencia de anomalías citológicas e histológicas de cuello uterino en un grupo de mujeres en Bogotá, Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. 14, 1(2010) 22-28.

González M., Patología cervical y el reporte de ASCUS en la citología. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 54, 3 (2003) 193-198.

Graterol I., Finol H., Correnti M., Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino. Tipificación y ultraestructura. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 26, 2 (2006) 89-94.

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

Grillo C., Martínez M., Morales B., Virus del papiloma humano: aspectos moleculares y cáncer de cérvix. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*. 4, 59 (2008) 310-315.

Grisales H., Vanegas A., Gaviria A., Castaño J., Mora A., Borrero M., Rojas C., Arbeláez M., Sánchez G., Prevalencia de anormalidades de células epiteliales y factores asociados en mujeres de un municipio rural colombiano. *Biomédica*. 28 (2008) 271-83.

Guglielmo Z., Rodríguez A., Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 33, 1 (2010) 71-77.

Guillén M., Moreno F., López M., Omaña T., Altuve F., Toro M., Hallazgos microbiológicos cervicovaginales en pacientes de pesquisa de cáncer. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 45, 1 (2003).

Gutiérrez L., Plett T., Madrid C., Madrid V., Diagnóstico molecular del virus del papiloma humano en el desarrollo de cáncer cervical. *Salud Pública de México*. 51 (2009) S479-S488.

Gutiérrez M., Alemán E., Suárez A., Hurtado M., Resultados de la atención a pacientes con lesión intraepitelial escamosa cervicouterina de bajo grado. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*. 40, 3 (2013) 120-126.

Gutiérrez R., Comunicación científica utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH en el control y prevención del cáncer cervicouterino. *Archivos Médicos de Actualización en Tracto Genital Inferior [AMATGI]*. 5 (2011) 16-23.

Hebner C & Laimins L., Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in medical virology*. 16, 2 (2006) 83-97.

Holowaty P., Miller A., Rohan T., To T., Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute*. 91, 3 (1999) 252-8.

Howley P., Lowy D., Knipe D., Papillomaviruses and their replication. *Fields Virology*. 2 (2001) 2231-2264.

Instituto Nacional de Cancerología., Boletín Hechos y Acciones. 5, 1 (2013).

Instituto Nacional de Cancerología (INC). Recomendaciones para la tamización de neoplasias del cuello uterino en mujeres sin antecedentes de patología cervical (preinvasora o invasora) en Colombia. Bogotá: INC (2007).

Isaza M., Pérez G., Morales Olga., Suárez R., Alvarado C., Trujillo L., Exactitud del test ADN-HPV para la detección de la enfermedad cervical de alto grado (NIC 2+) en mujeres con anormalidades citológicas (ASC-US y LSIL), afiliadas a la seguridad social en Bogotá (Colombia). *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 60, 3 (2009) 213-222.

Jacquín E., Saunier M., Mauny F., Schwarz E., Mougin C., Prétet J., Real-time duplex PCR for simultaneous HPV 16 and HPV 18 DNA quantitation. *Journal of Virological Methods*. 193 (2013) 498-502.

Janicek M., Averette H., Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics cancer. *Journal Clinical*. 51 (2001) 92-114.

Jenkins A., Allum A., Strand L., Aekre R., Simultaneous detection, typing and quantitation of oncogenic human papillomavirus by multiplex consensus real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. 187 (2013) 345-351.

Kasap B., Yetimalar H., Keklik A., Yildiz A., Cukurova K., Soylu F., Prevalence and risk factors for human papillomavirus DNA in cervical cytology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 159 (2011) 168–171.

Lau Serrano D., Millán M., Fajardo Y., Sánchez C., Lesiones preinvasivas del cuello uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 38, 3 (2012) 366-377.

La Vecchia C., Boccia S., Oral contraceptives, human papillomavirus and cervical cancer. *European Journal of Cancer Prevention*. 23, 2 (2014) 110-112.

Leiva N., Montecinos M., Caracterización biodemográfica de usuarias con resultado papanicolaou j del Cesfam de San José de la Mariquina durante los años 2009-2010 .Universidad Austral de Chile. Facultad de Medicina Escuela de Obstetricia y Puericultura. Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Matrona o Matron. Valdivia – Chile (2011).

León G., Bosques D., Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 31, 1 (2005).

León G., Bosques D., Silveira P., de la Torre A., Soto P., Rodríguez B., Incidencia de los factores de riesgo en mujeres cubanas con diagnóstico de lesiones oncológicas de cérvix. *Revista Cubana Médica*. 48,1 (2009).

León G., Arango M., Faxas M., Soto P., Bosque O., Beltrán C., Respuesta inmune celular en pacientes con lesiones benignas y malignas del cuello uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 37, 4 (2011) 524-532.

Lizano A., Carrillo A., Contreras A., Infección por el virus del papiloma humano: Epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Revista Cancerología*. 4 (2009) 205-216.

Longworth M., y Laimins L., Pathogenesis of Human Papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68, 2 (2004) 362-372.

Lopera E., Acosta P., Tafurt Y., Uribe M., Córdoba C., Acosta P., Quintero K., Arboleda Y., Sierra H., Sánchez G., Bedoya A., Distribución de variantes del virus del papiloma humano 16 (VPH 16) en mujeres con y sin neoplasia intraepitelial cervical grado 3 y cáncer cervical. *Revista Colombiana de Cancerología*. 16, 4 (2012) 205-216.

López J., Aristizábal F., Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 35, 1 (2006) 5-32.

López M., Morella F., Vega Q., Cruz J., Infección por virus papiloma humano en pacientes con células escamosas atípicas de un programa de pesquisa de cáncer cervical. *Obstetricia y Ginecología*. 72,4 (2012) 19-27.

López O., Benítez J., Paternina A., Ospino L., Prevalencia de anomalías citológicas del cuello uterino en pacientes atendidos en el Centro de Atención Primaria (CAP) de la Esperanza, Cartagena-Colombia, de Enero-Diciembre de 2010. *Duazary*. 8, 2 (2011).

Low E., Simon A., Lyons J., Romney D., Waller J., What do British women know about cervical cancer symptoms and risk factors? *European Journal of Cáncer*. 48, 16 (2012) 3001-3008.

Luhn P., Walker J., Schiffman M., Zuna R., Dunn S., Gold M., Wentzensen N., The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 128, 2 (2013) 265-270.

Martínez W., Actualización sobre vaginosis bacteriana. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 39, 4 (2013) 427-441.

Mazarico E., Relación existente entre la infección por los diferentes genotipos del Virus del Papiloma Humano y la presencia de patología premaligna y maligna del cuello uterino. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Facultat de Medicina. Barcelona (2012).

Melo A., García P., Capurro I., Guzmán P., Brebi P., Ili C., López J., Roa J., Genotipificación del virus papiloma humano en mujeres con adenocarcinoma cervical de la Región de La Araucanía-Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 27, 4 (2010) 297-301.

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. *Revista Médica de Chile*. 133 (2005) 639-644.

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. *Revista médica de Chile*, 131, 12 (2003) 1382-1390.

Méndez A., Sainz E., Consideraciones sobre el Virus del Papiloma Humano. *Medicentro*. 15,3 (2011) 205-211.

Méndez F., Muñoz N., Posso H., Molano M., Moreno V., Van den Brule A., Ronderos M., Meijer C., Muñoz A., Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the preventions of cervical cancer by HPV vaccines. *Journal of Infectious Diseases*. 192, (2005) 1158-1165.

Méndez L., Rodríguez A., López M., Toro M., Signos citológicos no clásicos asociados a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) en pacientes de Mérida, Venezuela. *Investigación Clínica*. 52, 2 (2011) 162-169.

Mendoza L., Arbiza J., Páez M., Kasamatsu E., Castro A., Giménez G., Basiletti J., González J., Mongelós P., Picconi M., Características clínico-demográficas y tipificación del virus de papiloma humano en mujeres paraguayas con citologías negativas para lesión escamosa intraepitelial. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 10 (2012) 46-5.

Mendoza L., Picconi M., Mirazo S., Mongelós P., Giménez G., Basiletti J., Arbiza J., Distribution of HPV-16 variants among isolates from Paraguayan women with different grades of cervical lesión. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 122, 1 (2013) 44-47.

Meyrelles A., Siqueira J., Hofer C., Costa T., Azevedo A., Guimaraes B., Seuánez H., Soares M., Almeida G., Soares E., Machado E., HIV/HPV co-infection during pregnancy in southeastern Brazil: Prevalence, HPV types, cytological abnormalities and risk factors. *Gynecologic Oncology*. 128, 1 (2013) 107-112.

Meza S., Pacheco R., Petit D., Querales Y., Vásquez P., vegas N., Frecuencia de los hallazgos citológicos de cuello uterino y los factores de riesgo asociados en la población femenina del ambulatorio urbano tipo I “Dr. Antonio Maria Sequera” de Tamaca. Febrero–Mayo. 2005. Universidad Centro Occidente. Departamento de Medicina Preventiva y Social. Barquisimetro (2005).

Ministerio de salud – Dirección General de Promoción y Prevención. Norma técnica para la detección temprana del cáncer de cuello uterino y guía de atención de lesiones preneoplásicas de cuello uterino de Colombia [en línea]. [Fecha de consulta: 20 de octubre de 2012] Disponible en: <[http://www.odm.colnodo.apc.org/Norma\\_tecnica\\_para\\_la\\_deteccion\\_temprana\\_d. .](http://www.odm.colnodo.apc.org/Norma_tecnica_para_la_deteccion_temprana_d.)>.

Modis Y., Trus B., Harrison S., Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal*. 21 (2002) 4754-62.

Molano M., González M., Gamboa O., Ortiz N., Luna J., Hernández G., Posso H., Murillo R., Muñoz N., Determinants of LSIL Regression in Women from a Colombian Cohort. *Revista Colombiana de Cancerología*. 14, 4 (2010) 199-209.

Molano M., Murillo R., Cano A., Gamboa O., Ardila J., Mejía J., Martínez G., Detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) en mujeres con cáncer de cuello uterino en Bogotá y Barranquilla. Procedimientos técnicos y de diagnóstico. *Revista Colombiana de Cancerología*. 14, 2 (2010) 78-87.

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

Mongelós P., Páez M., Rodríguez I., Giménez G., Castro A., Mendoza L., Detección del virus del papiloma humano de alto riesgo por captura híbrida II® según hallazgos citológicos en mujeres tratadas por lesiones escamosas intraepiteliales de cuello uterino, período 2006/2010. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 16, 1 (2013) 40-48.

Moore K., Bannon R., Lanneau G., Zuna R., Walker J., Gold M., Cervical dysplasia among women over 35 years of age. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 199, 5 (2008) 471e1-471e5.

Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T., Agarwala R., Schäffer A., "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics*. 24 (2008) 1757-1764.

Muñoz G., Sánchez J., Mendoza E., Incidencia de Flora cocoide en muestras cervico-vaginales en pacientes atendidas en el Departamento de Biología Celular FMBUAP del 2000 al 2007. Acta científica estudiantil *Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico*. (2009), ISSN 1856-8157.

Muñoz N., Bosch F., De Sanjosé S., Herrero R., Castellsague X., Shah K., Epidemiologic classification of human papilloma virus types cervical cancer. *New England Journal of Medicine*. 348 (2003) 518-27.

Muñoz N., Human papillomavirus and Cancer: the epidemiological Evidence. *Journal of Clinical Virology*. 19 (2000) 1-5.

Murta E., Souza M., Araújo E., Adad S., Incidence of Gardnerella vaginalis, Candida sp and human papilloma virus in cytological smears. *Sao Paulo Medical Journal*. 118, 4 (2000) 105-108.

Navarro F., Marin B., Frecuencia de infecciones cervicovaginales. San José de Bongo. Estado Bolívar. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente Nucleo Bolívar. Escuela de Ciencias de la Salud. Departamento de Bioanálisis. (2010).

Navarro S., Campusano M., Mendoza I., Pereira R., Polo F., Ríos E., Olivares J., Bernal M., Cáncer de cervix y su relación con el Virus del Papiloma Humano. *Ciencia y Salud*. 3, 1 (2011) 160-168.

Niño E., Intervención profesional de trabajo social en la liga santandereana de lucha contra el cáncer. Tesis para optar al título de trabajadora social. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Trabajo Social. Bucaramanga (2011).

Orozco C., Martínez A., Cock R., Barrientos C., Hoyos A., Ruiz C., Mattos., Identificación del virus del papiloma humano de alto riesgo utilizando la prueba inmunohistoquímica Viroactiv-HPV en pacientes con resultados citológicos de células ASCUS en un laboratorio de Patología Medellín-Colombia 2005-2006. *médicas uis*. 20 (2007) 81-90.

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

Pachón del Amo I., Arteaga A., Virus del papiloma Humano, Situación actual, Vacunas y perspectivas De su utilización. [seriada en línea] [citado 10 Oct 2012]. 2007. Disponible en:[http://www.msc.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/docs/VPH\\_2007pdf](http://www.msc.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/docs/VPH_2007pdf).

Palaoro L., Rocher A., De Torres R., Respuesta inflamatoria genital en la detección de alteraciones por virus del papiloma humano. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 47, 4 (2013).

Pananá E., Camorlinga M., Maldonado C., Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Salud Pública de México*. 51 (2009) 427-433.

Peláez L., Pinos J., Prevalencia de anomalías citológicas en frotis cervical y factores asociados en citología realizadas en el Hospital Vicente Corral Moscoso Año 2010. Tesis para opta al título de Médico. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Médicas Escuela de Medicina. Cuenca-Ecuador 2010.

Pérez E., Atención integral de la infertilidad. Endocrinología, Cirugía y Reproducción Asistida. Editorial médica Panamericana. 3ª edición (2011) 680 p.

Pérez L., Mantilla Y., Pérez R., Relación de algunas variables epidemiológicas en pacientes con el diagnóstico de NIC asociado a VPH. *MEDICIEGO*. 19, 2 (2013).

Piña P., Alvarado I., Infección del virus del papiloma humano como un factor de riesgo para carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. *GAMO*. 11, 3 (2012).

Pista A., Oliveira A., Barateiro A., Costa H., Verdasca N., Paixao M., Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal. *Journal of Medical Virology*. 79 (2007) 1889-1897.



Prado J., Calleja M., Berdard H., Kalantari M., Macay S., Allan B., Williamson A., Chung L., Collins R., Zuna R., Dunn S., Ortiz R., Barrera S., Ha C., Von D., Sánchez G., Bosch F., Villa L., Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology*. 340 (2005) 95-104.

Quintero M., Cruz J., Bastidas M., Márquez L., Puig J., Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 68, 1 (2008) 25-31.

Raj K., Berguerand S., Southern S., Doorbar J., Beard P., E1-E4 Protein of Human Papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *Journal Virology*. 78, 13 (2004) 7199-207.

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

Reina J., Muñoz N., Sánchez G., El estado del arte en las infecciones producidas por el Virus del Papiloma Humano. *Colombia Médica*. 39, 2 (2008).

Rincón O., René L., Pareja L., Jaramillo S., Aristizábal B., Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 58, 3 (2007) 58-68.

Ríos J., Ríos M., El Virus del Papiloma Humano y su relación con el cáncer cutáneo no melanoma. *Revista Médico Científica*. 23, 2 (2010) 33-44.

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 Obstetricia y Ginecología*. 71, 2 (2006) 135-140.

Rodríguez E., Reynolds J., Jenkins S., Winter S., Henry M., Nassar A., Atypical squamous cells of undetermined significance in patients with HPV positive DNA testing and correlation with disease progression by age group: an institutional experience. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 5, 5 (2012) 428-435.

Rodríguez O., Pichardo R., Escamilla G., Hernández M., Estudio de la patología del cérvix. *Perinatología y Reproducción Humana*. 23 (2009) 12-17.

Rojas R., Sariego I., Sarría C., Fraga J., Comportamiento "in vivo" de aislamientos de *Trichomonas vaginalis*, utilizando ratones NMRI como modelo experimental. *Revista chilena de infectología*. 21, 3 (2004) 179-185.

Rosell E., Muñoz A., Cepero F., Cardoso J., Fernández A., Factores de riesgo del cáncer de cuello uterino. *Archivo Médico de Camagüey*. 11, 1 (2007).

Roura E., Iftner T., Vildart J., Kruger S., Bosch X., Muñoz N., Palacios S., Rodriguez M., Morillo C., Serradell L., Torcel L., Cortes J., Castellsague X., Predictors of human papillomavirus infection in women undergoing routine cervical cancer screening in Spain: the CLEOPATRE study. *BioMed Central Infectious Diseases*. 12, 145 (2012).

Safaeian M., Solomon D., Wacholder S., Schiffman M., Castle P., Risk of precancer and follow-up management strategies for women with human papillomavirus-negative atypical squamous cells of undetermined significance. *Obstetrics y Gynecology*. 109, 6 (2007) 1325-31.

Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnheim N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 4732 (1985) 1350-4.

Sánchez C y Suarez K., Marcadores moleculares y epidemiológicos en la infección por VPH en mujeres sisbenizadas de los estratos 1, 2 y 3 del municipio de Pasto. Trabajo de grado para optar al título de Biólogo. Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y Naturales. Departamento de Biología, San Juan de Pasto (2012).

Sánchez C., Suárez K., Yépez M., Guerrero M., Infección por VPH en mujeres del municipio de Pasto (Colombia) con resultados de citología normal. *Universidad y Salud*. 15, 1 (2013) 7-21.

Sánchez E., Distribución de genotipos en mujeres conizadas por lesión escamosa intraepitelial de alto grado (CIN 2-3) y Análisis de los cofactores de cáncer de cérvix en Málaga. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Facultad de Medicina (2012).

Sánchez G., Villegas C., Vilariño A., Baró D., Sánchez D., Correlación citohistológica de las lesiones intraepiteliales del cérvix. Cytohistological correlation of cervical intraepithelial lesions. *MEDICIEGO*. 19 (2013).

Sánchez J., Coyotécatl L., Enríquez M., Mendoza E., Muñoz G., Rivera J., Incidencia del bacilo de Döderlein y su influencia en la presencia de otros microorganismos en el canal vaginal. Bogotá (Colombia). *Universitas Médica*. 49, 2 (2008) 172-179.

Sapp M., Bienkowska M., Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *The FEBS Journal*. 276 (2009) 7206-7216.

Sarduy M., Neoplasia Intraepitelial Cervical: Preámbulo del cáncer cérvicouterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 34, 2 (2008).

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 370, 9590 (2007) 890-907.

Schillaci R., Capra G., Bellavia C., Ruvolo G., Scazzone C., Venezia R., Perino A., Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertility and Sterility*. 100 (2013) 1236-40.

Schmitt M., Dondog B., Waterboer Tim., Pawlita M., Homogeneous Amplification of Genital Human Alpha Papillomaviruses by PCR Using Novel Broad-Spectrum GP5+ and GP6+ Primers. *Journal of Clinical Microbiology*. 46, 3 (2008) 1050-1059.

Schmitz M., Driesch C., Jansen L., Runnebaum I., Dürst M., Non-Random Integration of the HPV Genome in Cervical Cancer. *PLoS ONE*. 7, 6 (2012) e39632.

Segovia E., Mendoza L., Tipificación del virus del papiloma humano en muestras cervicales de 15 mujeres atendidas en el Instituto Nacional del Cancer, Año 2007. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 7, 1 (2009).

Sepúlveda J., Henao J., Mantilla L., Porras G., Angarita L., Detección del virus del papiloma humano (VPH) en pacientes con citología anormal: un estudio preliminar. *Revista Médica de Risaralda*. 12, 2 (2006).

Serman F., Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 67, 4 (2002) 318-323.

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

Shen J., Rebeles J., Genotyping human papillomaviruses: Development and evaluation of a comprehensive DNA microarray. *Gynecologic Oncology*. 128 (2013) 433-441.

Sherris J., Wittet S., Kleine A., Sellors J., Luciani S., Sankaranarayanan R., Barone M., Enfoques basados en evidencia para el tamizaje alternativo del cáncer cervical, en entornos de bajos recursos. Perspectivas internacionales en salud sexual y reproductiva. Número especial de 2010. *Guttmacher* 8pp.

Silva H., Acosta M., Erazo J., Rivera D., lesiones premalignas del cérvix en pacientes con ectopia cervical y citología negativa para malignidad en el Centro de Patología Cervical del Hospital Susana López de Valencia de Popayán-Cauca. Universidad del Cauca. *Revista Facultad Ciencias de la Salud*. (2008).

Silva I., Muniz Y., Sousa M., Silva K., Castelli E., Filho J., Osta A., Lima M., Simoes R., HLA-G 3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervico-vaginal cancer. *Human Immunology*. 74 (2013) 452-458.

Smith M., Tellier P., Roger M., Coutlee F., Franco E., Richardson H., Determinants of human papillomavirus coinfections among Montreal university students: the influence of behavioural and biological factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. CEBP-1255 (2014).

Sociedad Americana contra el Cáncer. Resumen sobre Cáncer de cuello uterino. *American Cancer Society*. (2013) 39pp.

Solís M., Aguayo F., Vargas M., Olcay F., Puschek K., Corvalan A., Ferreccio C., Factores de riesgo de alteraciones citológicas del cuello uterino en mujeres chilenas: Un estudio de casos y controles. *Revista Médica de Chile*. 138 (2010) 175-180.

Soto S., Camargo M., Sanchez R., Leon S., Urquiza M., Acosta J., Monsalve D., Rodriguez E., Patarroyo M., Patarroyo M., Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia. *Clinical Microbiology and Infection*. 15 (2009) 100-102.

Stanley M., Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Practice y Research Clinical Obstetrics y Gynaecology*. 15 (2001) 663-76.

Steben M., Duarte F., Human Papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology*. 107 (2007) S2-S5.

Sutherland J., Sales K., Jabbour H., Katz A., Seminal Plasma Enhances Cervical Adenocarcinoma Cell Proliferation and Tumour Growth In Vivo. *PLoS ONE*. 7, 3 (2012) e33848.

Tafurt Y., Acosta C., Sierra C., The prevalence of abnormal cytology and inflammation and their association with risk factors for uterine cervical neoplasms in Cauca, Colombia. *Revista de Salud Pública*. 14,1 (2012) 53-66.

Tamayo L., Varona J., Infección por papiloma virus humano en adolescente. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 32, 2 (2006).

Tanzi E., Amendola A., Bianchi S., Fasolo M., Beretta R., Pariani E., Zappa A., Frati E., Orlando G., Human Papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy. *Vaccine*. 27 (2009) A17-A23.

Tapia L., Citología del tracto genital femenino y de la glándula mamaria, editorial Vértice, Málaga. (2008) 114p.

Tatti S., Colposcopia y patologías del tracto genital inferior *en la era de la vacunación*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina 2008, 1ªedición (2008). 368.p

Tornesello M., Losito S., Benincasa G., Fulciniti F., Botti G., Greggi S., Buonaguro F., Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic oncology*. 121, 1 (2011) 32-42.

Van den Brule A., Pol R., Franssen 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 Clinical Microbiology*. 3, 40 (2002) 779-787.

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

Vinokurova S., Wentzensen N., Kraus I., Klaes R., Driesch C., Melsheimer P., Kisseljov F., Durst M., Schneider A., Knebel M., Type dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Research*. 68 (2008) 307-313.

Webersinke C., Doppler S., Roithmeier F., Stummvoll W., Silye R., Cervical biopsies and cytological smears – A comparison of sample materials in HPV diagnostics. *Journal of Clinical Virology*. 56 (2013) 69-71.

Wentzensen N., Vinokurova S., Doeberitz M., Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Research*. 64 (2004) 3878-84.

Wiesner C., Cendales R., Murillo R., Piñeros M., Tovar S., Seguimiento de mujeres con anormalidad citológica de cuello uterino, en Colombia. *Revista Salud pública*. 12, 1 (2010) 1-13.

Wiesner C., Vejarano M., Caicedo J., Tovar S., Cendales R., La citología de cuello uterino en Soacha, Colombia: representaciones sociales, barreras y motivaciones. *Revista Salud Pública*. 8, 3 (2006) 185-96.

Xue Y., Zhang W., Chen M., Han L., Luo M., U shape of age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in women attending hospitals in Shanghai, China. *European Journal of Obstetrics y Gynecology and Reproductive Biology*. 145 (2009) 214-8.

Yépez M., Cerón E., Hidalgo A., Cerón C., Supervivencia de mujeres con cáncer de cuello uterino. Municipio de Pasto – Colombia. *Revista Universidad y Salud*. 2, 14 (2011) 7-18.

Zhang R., Shie Y., Rena Y., Luc H., Weic Z., Houc W., Zhangg M., Xua C., Risk factors for human papillomavirus infection in Shanghai suburbs: A population-based study with 10,000 women. *Journal of Clinical Virology*. 58 (2013) 144-148.



Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W., "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *Journal of Computational Biology*. 7 1-2, (2000) 203-14.

Zheng Z., Baker C., Papillomavirus genome structure, expression and post-translational regulation. *Frontiers in Bioscience*. 11 (2006) 2286-2302.

Zur Hausen H., Papillomaviruses in the causation of human cancers a brief historical account. *Virology*. 348, 2 (2009) 260-265.

## ANEXOS

### Anexo A. Formato de consentimiento informado

	<b>CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN:</b> Tipificación del virus del papiloma humano-VPH y su relación con características poblacionales y lesiones en cáncer de cuello uterino en mujeres del municipio de Pasto.	POE: No 1	
	Elaborado por: Claudia Sánchez, Karen Suárez, Nathaly Nicola y Milena Guerrero F.	Pág 1	

#### Fase 2

“Marcadores Moleculares y Epidemiológicos en la Infección por VPH y su Asociación con el Desarrollo de Cáncer de Cuello Uterino”

Proyecto de investigación:

“Tipificación del virus del papiloma humano-VPH y su relación con características poblacionales y lesiones en cáncer de cuello uterino en mujeres del municipio de Pasto”

El presente estudio incluirá Mujeres en edad reproductiva entre los 18 y 80 años de edad, activas y no activas sexualmente, no histerectomizadas con y sin 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 y su asociación con el desarrollo de CCU, 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.

\*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.



	<b>CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR LA INVESTIGACIÓN:</b> Tipificación del virus del papiloma humano-VPH y su relación con características poblacionales y lesiones en cáncer de cuello uterino en mujeres del municipio de Pasto	POE: No 1	
	Elaborado por: Claudia Sánchez, Karen Suárez, Nathaly Nicola y Milena Guerrero F.	Pág 2	

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



Teléfono: 317-705-2340

Cristina Santacruz M.: MD. Pasto Salud-ESE

Teléfono: 7201372-110

Nathaly Nicola Benavides. Estudiante de Biología. Universidad de Nariño

Teléfono: 316-685-7742

	<b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	POE: No 1	
	Elaborado por: Claudia Sánchez, Karen Suárez, Nathaly Nicola 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

\_\_\_\_\_  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Firma de la participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Firma de la participante

\_\_\_\_\_  
Fecha



\_\_\_\_\_  
Dirección

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

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

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 de la participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Dirección

Anexo B. Formato "Historia clínica prevención de cáncer"



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

OCCUPACIÓN: \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES FAMILIARES: \_\_\_\_\_ PERSONALES: \_\_\_\_\_

TRAUMÁTICOS: \_\_\_\_\_ QUIRÚRGICOS: \_\_\_\_\_

TÓXICOS: \_\_\_\_\_ ITS: \_\_\_\_\_ GINECOLÓGICOS: MENARQUIA: \_\_\_\_\_ AÑOS

CON CICLOS REGULARES  IRREGULARES  \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_ FECHA DE LA ÚLTIMA MENSTRUACIÓN: \_\_\_\_\_

SEXARCA: \_\_\_\_\_ AÑOS \_\_\_\_\_ NÚMERO DE PAREJAS SEXUALES: \_\_\_\_\_

MÉTODO DE PLANIFICACIÓN FAMILIAR: \_\_\_\_\_ TIEMPO: \_\_\_\_\_

FECHA ÚLTIMA CITOLOGÍA: / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ RESULTADO DE LA CITOLOGÍA: \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS: E:  P:  A:  C:  V:  M:  FECHA DEL ÚLTIMO PARTO: \_\_\_\_\_

EXAMEN FÍSICO PESO: \_\_\_\_\_ TALLA: \_\_\_\_\_ T.A.: \_\_\_\_\_ FC: \_\_\_\_\_ FR: \_\_\_\_\_

CABEZA: \_\_\_\_\_ CARA: \_\_\_\_\_

CUELLO: \_\_\_\_\_

TÓRAX: \_\_\_\_\_

ABDOMEN: \_\_\_\_\_

DENTALES: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

MIEMBROS INFERIORES: \_\_\_\_\_

ESPECULOSCOPIA: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

LÉX: \_\_\_\_\_

CONDUCTA: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

PLAN: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

FECHA PRÓXIMA CITA: DÍA \_\_\_\_\_ / MES \_\_\_\_\_ / AÑO \_\_\_\_\_

FIRMA DE LA USUARIA \_\_\_\_\_ FIRMA DEL PROFESIONAL \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

C.C. \_\_\_\_\_ C.C. \_\_\_\_\_

www.pastosalud.gov.co

Anexo C. Formato de resultado de citología



PROGRAMA DE PATOLOGIA CERVICOUTERINA  
RESULTADO DE CITOLOGIA  
SIS 032

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

**IDENTIFICACIÓN**

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: \_\_\_\_\_

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

**ASPECTOS DE CERVIX**

SANO  AUSENTE  ANORMAL QUIEN TOMÓ LA CITOLOGÍA: \_\_\_\_\_  
 OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_ 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**

<b>C. NEGATIVA PARA LESION INTRAEPITELIAL O MALIGNIDAD</b>	<b>D. OTROS RESULTADOS NO NEOPLASICOS</b>
<b>1. ORGANISMOS</b>	<b>2. CAMBIOS CELULARES REACTIVOS ASOCIADOS A:</b>
<input type="checkbox"/> TRICHOMONAS VAGINALIS	INFLAMACIÓN (INCLUYENDO REPARACIÓN TÍPICA) <input type="checkbox"/> LEVE <input type="checkbox"/> MODERADA <input type="checkbox"/> SEVERA
<input type="checkbox"/> CONSISTENTE CON CÁNDIDA SPP	<input type="checkbox"/> RADIOTERAPIA
<input type="checkbox"/> FLORA SUGESTIVA DE VAGINOSIS BACTERIANA	<input type="checkbox"/> CONTRACEPCIÓN
<input type="checkbox"/> BACTERIAS COMPATIBLES CON ACTINOMICETOS SPP	<input type="checkbox"/> CÉLULAS GLANDULARES POST-HISTERECTOMIZADAS
<input type="checkbox"/> CAMBIOS CELULARES CONSISTENTES CON VIRUS HERPES SIMPLE	<input type="checkbox"/> ATROFIA CON INFLAMACIÓN (VAGINITIS ATRÓFICA)
<input type="checkbox"/> BACILO DE DODERLEIN (FLORA NORMAL)	3. OTRAS <input type="checkbox"/> PRESENCIA DE CÉLULAS ENDOMETRIALES MUJERES > -40

**ANORMALIDADES EN CELULAS EPITELIALES**

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

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

LEYÓ LA CITOLOGÍA \_\_\_\_\_ FECHA (DD/MM/AAAA) \_\_\_\_\_  
 NOMBRE: \_\_\_\_\_ FIRMA (SELLO): \_\_\_\_\_ REGISTRO \_\_\_\_\_

Anexo D. Ensayo de optimización de Mg<sup>++</sup> para PCR/L1 GP5+/GP6+

Reactivo	Cantidad (µl) de los componentes de reacción				
	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5
Agua ultrapura	8,75	8,75	8,75	8,75	8,75
<i>Buffer</i> (1X)	5	5	5	5	5
dNTPs(200 µM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
GP5+ (1µM)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
GP6+ (1µM)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
DNA VPH 33	1	1	1	1	1
Taq pol (1,25 U)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
MgCl <sub>2</sub> (C)	(1mM)	(1,5 mM)	(2,0 mM)	(2,5 mM)	(3,0 mM)
Agua ultrapura adicional	3,5 µl	3 µl	2,5 µl	2 µl	1,5 µl

E = ensayo de optimización de MgCl<sub>2</sub>. (C)= Concentración

Anexo E. Resultados negativos de *Reverse Line Blot*.

Columna 2 control VPH 33, columnas 3- 40, muestras de cepillado cervical, columna 41 control VPH 33.



Fuente: Esta investigación

Anexo F. Alineamiento de las secuencias de muestras de cepillado cervical y biopsia

UDN 217 F

Human papillomavirus type 16 isolate HPV16-AH2, complete genome

Sequence ID: [gb|KF954093.1](#)|Length: 7906

Related Information

Range 1: 6667 to 6767. Strand: Plus/Plus

Query 18 ATT-TGTTCTGCCACATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTA 76

||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct 6667 ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTA 6726

Query 77 CCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC 117

||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct 6727 CCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC 6767

UDN 217 R

Human papillomavirus type 16 isolate Ir52 major capsid protein (L1) gene, partial cds

Sequence ID: [gb|GU076521.1](#)|Length: 144Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 92. Strand: Plus/Minus

Query 31 AGTTCGTATTTTTATATGTAGTTTCCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATT 90

||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct 92 AGTTAGTA-TTTTATATGTAGGTTT-TGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATT 35

Query 91 TGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAAA 124

||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct 34 TGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAAA 1

UDN 290 F

Human papillomavirus type 45 isolate BF134, complete genome

Sequence ID: [gb|KC470256.1](#)|Length: 7841Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6647 to 6740. Strand: Plus/Plus

Query 25 TCTTCACAGAATCCTGTGCCAGGTACATATGACCCTACTAAGTTTAAGCAGTATAGTAGA 84

||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct 6647 TCTACACAAAATCCTGTGCCAGGTACATATGACCCTACTAAGTTTAAGCAGTATAGTAGA 6706

Query 85 CATGTGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC 118

||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct 6707 CATGTGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC 6740

UDN 290 R

Human papillomavirus type 45 isolate BF134, complete genome

Sequence ID: [gb|KC470256.1](#)|Length: 7841Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6596 to 6690. Strand: Plus/Plus

Query 27 AACCTAGTAGGGTCATATGTACCTGGCACAGGATTTTGTGTAGAGGCACATAATGTTAAA 86

||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct 6690 AACCTAGTAGGGTCATATGTACCTGGCACAGGATTTTGTGTAGAGGCACATAATGTTAAA 6631

Query 87 TTAGTACTGCGGGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 121

||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Sbjct 6630 TTAGTACTGCGGGTAGTGTCCACTACAGTAACAAA 6596



UDN 292 F  
Human papillomavirus type 97 isolate W15189, complete genome  
Sequence ID: [gb|EF202168.1](#)|Length: 7843|Number of Matches: 1  
Related Information  
Range 1: 6576 to 6625. Strand: Plus/Plus  
Query 82 TAAAAAGTAGTTGT-GTCATGTGGAAGAGTATGATTTACAGTTTATTTTC 131  
|||||||||  
Sbjct 6576 TAAACAGTA-TAGTAGACATGTGGAAGAGTATGATTTACAGTTTATTTTC 6625

UDN 292 R  
Human papillomavirus type 6 isolate 1767 major capsid protein L1 gene, partial cds  
Sequence ID: [gb|EU056598.1](#)|Length: 342|Number of Matches: 1  
Related Information  
Range 1: 43 to 121 Strand: Plus/Minus  
Query 26 TGTAATCCTCCTCTCC-CCTGACGCATGTTCTTTATAATCAAATGGTGTATGTG 84  
|||||||||  
Sbjct 121 TGTAATCATACTCTCCACATGACGCATGACTCTTTATAATCAAATGGTGTATGTG 62

Query 85 GAACATGTACTTACGGATG 103  
|||  
Sbjct 61 GAAGATGTAGTTACGGATG 43

UDN 325 F  
Human papillomavirus type 16 isolate TV158a L1 protein (L1) gene, partial cds  
Sequence ID: [gb|FI645037.1](#)|Length: 276|Number of Matches: 1  
Related Information  
Range 1: 4 to 94. Strand: Plus/Plus  
Query 21 GCCGTATCTACTTCGTAACCTAACTATAATAATACAACTTTAAAGAGTACCTACGA-GT 79  
|||||||||  
Sbjct 4 GCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTAAAGGAGTACCTACGACAT 63

Query 80 GGGGAGGAATATGATTTACTGTTATTTTC 110  
|||||||||  
Sbjct 64 GGGGAGGAATATGATTTACTGTTATTTTC 94

UDN 325 R  
Human papillomavirus type 16 isolate 6  
Sequence ID: [gb|AF548821.1](#)|Length: 138|Number of Matches: 1  
Related Information  
Range 1: 2 to 105. Strand: Plus/Minus  
Query 14 CGGT-CTCTCAAAGTTAGTATTTTATATGTAAGGTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACA 72  
|||||||||  
Sbjct 105 CGGTACTCTTTAAAGTTAGTATTTTATATGTA-GGTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACA 47

Query 73 TAATGACATATTGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 117  
|||||||||  
Sbjct 46 TAATGACATATTGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 2

UDN 328F  
Human papillomavirus type 6 isolate 7 major capsid protein L1-like (L1) gene, partial sequence  
Sequence ID: [gb|KC706454.1](#)|Length: 403|Number of Matches: 1  
Related Information  
Range 1: 223 to 305. Strand: Plus/Minus

Query 28 AACTACATCTTCCCACATACACCAATTTCTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAA 87  
|||||

Sbjct 305 AACTACATCTT-CCACATACACCAATT-CTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAA 248

Query 88 GAGTATGATTTACAGTTTATTTTTC 112  
|||||

Sbjct 247 GAGTATGATTTACAATTTATTTTTC 223

UDN 328 R

Human papillomavirus isolate Isfahan EL2R L1 protein gene, partial cds

Sequence ID: [gb|GQ179959.1](#)|Length: 139|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 34 to 139. Strand: Plus/Plus

Query 4 GACGCATGTACTCTTAT-ATCAGAATTGGTGTATGTGGAAGATGTAGTTACGGATGCAC 62  
|||||

Sbjct 34 GACGCATGTACTCTTATAATCAGAATTGGTGTATGTGGAAGATGTAGTTACGGATGCAC 93

Query 63 ATAATGTCATGTTGGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 108  
|||||

Sbjct 94 ATAATGTCATGTTGGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 139

UDN 329 F

Human papillomavirus type 58 genomic DNA, complete genome, isolate: JP1870

Sequence ID: [dbj|AB819279.1](#)|Length: 7836|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6686 to 6767. Strand: Plus/Plus

Query 32 AACTAAGGAAGGTACATATAAAAATGATAATTTTAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGA 91  
|||||

Sbjct 6686 AACTAAGGAAGGTACATATAAAAATGATAATTTTAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGA 6745

Query 92 ATATGATTACAGTTTATTTT 113  
|||||

Sbjct 6746 ATATGACTTACAGTTTGTTTTT 6767

UDN 329 R

Human papillomavirus type 58 genomic DNA, complete genome, isolate: JP1870

Sequence ID: [dbj|AB819279.1](#)|Length: 7836|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6630 to 6727. Strand: Plus/Minus

Query 18 TATTCCTT-ACATTATCATTTGTGTATATGTACCTTCCTTAGTTACTTCAGTGCATAATG 76  
|||||

Sbjct 6727 TATTCCTTAAAATTATCATTT-T-TATATGTACCTTCCTTAGTTACTTCAGTGCATAATG 6670

Query 77 TCATATTAGTGCTACGAGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 116  
|||||

Sbjct 6669 TCATATTAGTGCTACGAGTGGTATCAACCACGGTAACAAA 6630

UDN 331 F

Human papillomavirus isolate 06JAN\_PHL\_MY099\_08 L1 capsid protein (L1) gene, partial cds

Sequence ID: [gb|EU911303.1](#)|Length: 409|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 25 to 161. Strand: Plus/Plus

Query 1 TGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTA ACTAC 60  
|||||  
Sbjct 25 TGTTACTGTGGTAGATACTACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTA ACTAC 84

Query 61 ATCTTCCACATACACCAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCCGTCATGTGGAAGAGTATGA 120  
|||||  
Sbjct 85 ATCTTCCACATACACCAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCCGTCATGTGGAAGAGTATGA 144

Query 121 TTTACAGTTTATTTTTC 137  
|||||  
Sbjct 145 TTTACAATTTATTTTTC 161

UDN 331 R

Human papillomavirus isolate Isfahan M49-MF nonfunctional ORF-L1 gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|GQ452050.1](#) | Length: 140 | Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 107. Strand: Plus/Minus

Query 4 GACGCATGTTCTCCTAACAAATCAAGAAATTGGTGGAAATGGTGGGAAAGAATGTAGTTACG 63  
|||||

Sbjct 107 GACGCATGTACTCTTTATAATCA-GAATTTGGT-GTAT-GT-GG-AAG-ATGTAGTTACG 54

Query 64 GATGCACATAATGTCATGTTGGTACTGCGTTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 117  
|||||

Sbjct 53 GATGCACATAATGTCATGTTGGTACTGCGT-GTAGTATCTACCACAGTAACAAA 1

UDN 333 F

Human papillomavirus type 6 isolate 7 major capsid protein L1-like (L1) gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KC706454.1](#) | Length: 403 | Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 219 to 314. Strand: Plus/Minus

Query 2 TGCATTCCGTA ACTACATTTCCTTCCCACATTACACCAATTCTGATTATAAAGAGTACA 61  
|||||

Sbjct 314 TGCA-TCCGTA ACTACAT--C-TT-CCACA-TACACCAA-TTCTGATTATAAAGAGTACA 262

Query 62 TCGTCATGTGGAAGAGTATGATTACAGTTTATTTTCCATT 104  
|||||

Sbjct 261 TCGTCATGTGGAAGAGTATGATTACAAATTTATTTTCAATT 219

UDN 333 R

Human papillomavirus isolate Isfahan M49-MF nonfunctional ORF-L1 gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|GQ452050.1](#) | Length: 140 | Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 86. Strand: Plus/Minus

Query 13 CAGAATTTGGTGTATGTGGAA-ATGTAGTTACGGATGCACATAATGTCATGTTGGTACTG 71  
|||||

Sbjct 86 CAGAATTTGGTGTATGTGGAAAGATGTAGTTACGGATGCACATAATGTCATGTTGGTACTG 27

Query 72 CGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 97  
|||||

Sbjct 26 CGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 1

UDN 337 F

Human papillomavirus type 16 isolate HPV16-AH2, complete genome

Sequence ID: [gb|KF954093.1](#)|Length: 7906|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6684 to 6767. Strand: Plus/Plus

Query 32 CTAAGGAAGGTACATATAAAAATGATAATTTAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGAAT 91

|||||

Sbjct 6684 CTAAGGAAGGTACATATAAAAATGATAATTTAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGAAT 6743

Query 92 ATGATTACAGTTTATTTTTC 115

|||||

Sbjct 6744 ATGATTACAGTTTATTTTTC 6767

UDN 337 R

Human papillomavirus type 16 isolate Ir-PC97 L1 protein (L1) gene, partial cds

Sequence ID: [gb|GU344766.1](#)|Length: 142|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 87. Strand: Plus/Minus

Query 31 AGTATTTTATATGTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACT 90

|||||

Sbjct 87 AGTATTTTATATGTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACT 28

Query 91 GCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 117

|||||

Sbjct 27 GCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 1

UDN 338 F

Human papillomavirus type 58 genomic DNA, complete genome, isolate: JP1870

Sequence ID: [dbj|AB819279.1](#)|Length: 7836|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6688 to 6768. Strand: Plus/Plus

Query 32 CTAAGGAAGGTACATATAAAAATGATAATTTAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGAAT 91

|||||

Sbjct 6688 CTAAGGAAGGTACATATAAAAATGATAATTTAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGAAT 6747

Query 92 ATGATTACAGTTTATTTTTC 112

|||||

Sbjct 6748 ATGACTTACAGTTTGTTTTTC 6768

UDN 338 R

Human papillomavirus type 58 genomic DNA, complete genome, isolate: JP1870

Sequence ID: [dbj|AB819279.1](#)|Length: 7836|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6630 to 6719. Strand: Plus/Minus

Query 25 AAACATAATCA-TTTTATATGTACCTTCCTTAGTTACTTCAGTGCATAATGTCATATTAG 83

|||||

Sbjct 6719 AAA-ATTATCATTTTATATGTACCTTCCTTAGTTACTTCAGTGCATAATGTCATATTAG 6661

Query 84 TGCTACGAGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 114

|||||

Sbjct 6660 TGCTACGAGTGGTATCAACCACGGTAACAAA 6630

UDN 339 F

Human papillomavirus type 16 isolate HPV16-AH2, complete genome

Sequence ID: [gb|KF954093.1](#)|Length: 7906|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6679 to 6766. Strand: Plus/Plus

Query 28 CATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGG 87  
|||||

Sbjct 6679 CATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGG 6738

Query 88 GGAGGAATATGATTACAGTTTATTTTT 115

|||||

Sbjct 6739 GGAGGAATATGATTACAGTTTATTTTT 6766

UDN 339 R

Human papillomavirus type 16 isolate 6

Sequence ID: [gb|AF548821.1](#)|Length: 138|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 2 to 110. Strand: Plus/Minus

Query 10 TCGTAC-GTACTCCTT-ACGTTAGTATTTTATATGTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAG 67

|||||

Sbjct 110 TCGTACGGTACTCTTTAAAGTTAGTATTTTATATGTAGGTTCTGAAGTAGATATGGCAG 51

Query 68 CACATAATGACATATTTGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 116

|||||

Sbjct 50 CACATAATGACATATTTGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 2

UDN 345 F

Human papillomavirus type 16 isolate HPV16-AH2, complete genome

Sequence ID: [gb|KF954093.1](#)|Length: 7906|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6683 to 6766. Strand: Plus/Plus

Query 32 TCTACTTCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAG 91

|||||

Sbjct 6683 TCTACTTCAGAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAG 6742

Query 92 GAATATGATTACAGTTTATTTTT 115

|||||

Sbjct 6743 GAATATGATTACAGTTTATTTTT 6766

UDN 345 R

Human papillomavirus type 16 isolate HPV16-AH2, complete genome

Sequence ID: [gb|KF954093.1](#)|Length: 7906|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 6626 to 6732. Strand: Plus/Minus

Query 9 CGTACGT-CTCCTATAAGTTAGTATTTTATATGTAGTTTCTGAAGTA-ATATGGCAGCA 66

|||||

Sbjct 6732 CGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTATATGTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCA 6673

Query 67 CATAATGACATATTTGTACTGCGTGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 113

|||||

Sbjct 6672 CATAATGACATATTTGTACTGCGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAA 6626

UDN 347 F

Human papillomavirus, isolate IS601, major capsid protein L1 (L1) gene, partial cds

Sequence ID: [gb|U45937.1|HPU45937](#)|Length: 458|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 102 to 190. . Strand: Plus/Plus

Query 32 GGCTAGTAGCTCTACTACAACGTATGCCAACTCTAATTTTAAAGAATATTTAAGACATGC 91  
|||||  
Sbjct 102 GGCTAGTAGCTCTACTACAACGTATGCCAACTCTAATTTTAAAGAATATTTAAGACATGC 161

Query 92 AGAAGAGTATGATTTACAGTTTATTTTTC 120  
|||||  
Sbjct 162 AGAAGAGTATGATTTACAGTTTGTTTTTC 190

UDN 347 R

Human papillomavirus type 73 isolate M20 L1 protein (L1) gene, partial cds

Sequence ID: [gb|JQ902134.1](#)|Length: 460|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 52 to 145. Strand: Plus/Minus

Query 28 TAACATTAGAATTGGCATAACGTTGTAGTAGAGCTACTAGCCTGTGTACCTACACATACAG 87  
|||||

Sbjct 145 TAAAATTAGAGTTGGCATAACGTTGTAGTAGAGCTACTAGCCTGTGTACCTACACATACAG 86

Query 88 AAAAATTAGTGCTTCTAGTAGTATCTACCACAGT 121  
|||||

Sbjct 85 AAAAATTAGTGCTTCTAGTAGTATCTACAACAGT 52

UDN 351 F

Human papillomavirus type 33, isolate IS827, major capsid protein L1 (L1) gene, partial cds

Sequence ID: [gb|U45897.1|HPU45897](#)|Length: 449|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 99 to 181. Strand: Plus/Plus

Query 35 CACTAGTGACAGTACATATAAAAATGAAAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGA 94  
|||||

Sbjct 99 CACTAGTGACAGTACATATAAAAATGAAAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGA 158

Query 95 ATATGATTTACAGTTTATTTTTC 117  
|||||

Sbjct 159 ATATGATTTACAGTTTGTTTTTC 181

UDN 351 R

Human papillomavirus type 33 isolate 3 major capsid protein L1 (l1) gene, partial cds

Sequence ID: [gb|KC706450.1](#)|Length: 403|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 258 to 360. Strand: Plus/Plus

Query 13 TTATCTATTCTGTTACATTTTCATTTTATATGTACTGTCACTAGTACTTGTGTGCATA 72  
|||||

Sbjct 258 TTATATATTCTTTAAAATTTTCATTTTATATGTACTGTCACTAGTACTTGTGTGCATA 317

Query 73 AAGTCATATTAGTACTGCGAGTAGTATCTACCACAGTAACAAA 115  
|||||

Sbjct 318 AAGTCATATTAGTACTGCGAGTGGTATCTACCACAGTAACAAA 360