



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Genotipificación del virus de papiloma humano por PCR tiempo real de muestras parafinadas de tejido cérvico uterino del año 2012, procedentes del hospital de Solca núcleo Loja

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Sotomayor Campoverde, Santiago Andre

DIRECTOR: Arévalo Jaramillo, Ana Paulina, Mg.

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Mg.

Ana Paulina Arévalo Jaramillo.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Genotipificación del virus de papiloma humano por PCR tiempo real de muestras parafinadas de tejido cérvico uterino del año 2012, procedentes del hospital de Solca núcleo Loja” realizado por Sotomayor Campoverde Santiago Andre, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2014

f).....

Mg. Ana Paulina Arévalo Jaramillo

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Sotomayor Campoverde Santiago Andre declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: “Genotipificación del virus de papiloma humano por PCR tiempo real de muestras parafinadas de tejido cérvico uterino del año 2012, procedentes del hospital de Solca núcleo Loja”, de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Ana Paulina Arévalo Jaramillo directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Sotomayor Campoverde Santiago Andre

C.I. 1900579374

DEDICATORIA

A Dios, a quien encontré en los momentos más difíciles y en todo este proceso de transición intelectual, en la realización de la presente tesis, por ser el único compañero y fiel amigo.

Dedico este trabajo a mis padres Lastenia y Rigoberto, a mis hermanos: Pablo, Cristina y Vivian, y a todos quienes me apoyaron en este período de formación profesional, constituyéndose en el pilar fundamental de mi vida, quienes con su ejemplo de superación, lucha, constancia y trabajo fueron claves esenciales para el logro de objetivos, para hoy ver mis sueños hechos realidad; gracias por creer en mí, siempre serán mi más grande inspiración.

Santiago Andre Sotomayor Campoverde.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTO

Al final de esta etapa de formación académica profesional, quiero dejar constancia de una sincera gratitud a Dios por permitirme la existencia, entrega, fortaleza y sabiduría necesaria para vencer dificultades, permitiéndome alcanzar con éxito la meta trazada, a las autoridades de la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia.

Un agradecimiento especial y sincero a Paulina Arévalo y Ana Belén Córdova por su paciencia y entrega en su labor como docentes. A María del Cisne Loján por compartir sus conocimientos, por su ejemplo, dedicación, perseverancia y solidaridad humana. Así mismo a Máximo Moreira, quien contribuyó para que este trabajo se lleve a cabo con éxito y responsabilidad. También quiero hacer llegar mis más sinceros agradecimientos al personal del departamento de Histopatología de SOLCA núcleo Loja, de manera personal a la Dra. Martha Murillo quien hizo posible que mi estancia durante este proyecto se lleve de la mejor manera.

Santiago Andre Sotomayor Campoverde.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
1 MARCO TEÓRICO.....	6
1.1 Cáncer de cervix uterino	6
1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical	6
1.2.1 Infección por HPV y su relación con el cáncer cervical.....	6
1.3 Generalidades del HPV	7
1.3.1 Estructura.....	7
1.3.1.1 Genes tempranos.....	7
1.3.1.2 Genes tardíos.....	8
1.3.1.3 Región larga de control.	8
1.3.2 Clasificación.	9
1.4 Patogénesis.....	11
1.4.1 Participación del HPV en la carcinogénesis.....	11
1.4.2 Manifestaciones patológicas.....	12
1.5 Diagnóstico.....	15
1.5.1 Diagnóstico tradicional de la enfermedad.	15
1.5.1.1 Citología.....	15
1.5.1.2 Colposcopia.....	15
1.5.1.3 Tipo de muestras utilizadas en citología cervical.	16
1.5.2 Diagnóstico molecular de la enfermedad.	18
1.5.2.1 Métodos de hibridación molecular.	18
1.5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
1.6 Tratamiento	19
1.7 Prevención de la infección	20
1.7.1 Vacunas contra el HPV.	20

CAPÍTULO II	21
2 METODOLOGÍA	22
2.1 Material de estudio	22
2.2 Manejo de biopsias y preparación de cortes parafinados.....	22
2.3 Estandarización de la técnica de desparafinación y extracción de ADN	22
2.3.1 Desparafinación del tejido.....	22
2.3.1.1 Protocolo de desparafinación A.	22
2.3.1.2 Protocolo de desparafinación B.	23
2.3.1.3 Protocolo de desparafinación C.	23
2.3.1.4 Protocolo de desparafinación D.	23
2.3.2 Extracción de ADN.....	24
2.4 Evaluación de la concentración y pureza del ADN.....	24
2.5 Determinación y genotipificación del HPV por PCR tiempo real.....	24
2.6 Análisis estadístico	25
CAPÍTULO III	26
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
3.1 Recolección de las muestras	27
3.2 Desparafinación y extracción de ADN.....	27
3.3 Control interno positivo y detección de HPV	28
3.4 Grado histopatológico de lesión y presencia de HPV.....	29
3.5 Genotipificación del HPV por PCR tiempo real	30
3.6 Grado de lesión y genotipos de HPV	32
3.7 Coinfecciones presentes en las muestras analizadas.....	33
3.8 Edad de detección del HPV y el desarrollo de cáncer cervical.....	34
CONCLUSIONES.....	37
RECOMENDACIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organización del genoma de HPV.	8
Figura 2. HPV en la carcinogénesis.	12
Figura 3. Patogenia del Cáncer de cuello uterino.	13

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de HPV y su asociación con las principales enfermedades.....	10
Tabla 2. Nomenclatura en citología cervical.	13
Tabla 3. Diagnósticos histopatológicos de las muestras analizadas.	27
Tabla 4. Evaluación de protocolos de desparafinación.....	28
Tabla 5. Amplificación del control interno β -globina y detección de HPV.	29
Tabla 6. Diagnósticos histopatológicos y presencia de HPV.	30
Tabla 7. Determinación de los genotipos de HPV por PCR tiempo real.	30
Tabla 8. Genotipos de HPV presentes por tipo de lesión.	32
Tabla 9. Combinaciones de genotipos de HPV relacionados con el tipo de lesión.	33
Tabla 10. Detección del HPV y el desarrollo de cáncer cervical en relación a la edad de la paciente.....	35

ABREVIATURAS

- HPV:** Virus de papiloma humano, (de las siglas en inglés human papillomavirus).
- NIC:** Neoplasia intraepitelial cervical, (CIN, de las siglas en inglés cervical intraepithelial neoplasia).
- SIL:** Lesión intraepitelial escamosa, (de las siglas en inglés squamous Intraepithelial lesion).
- HSIL:** Lesión intraepitelial escamosa de alto grado, (de las siglas en inglés high grade Squamous Intraepithelial Lesion).
- LSIL:** Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, (de las siglas en inglés low grade squamous intraepithelial lesion).
- ASCUS:** Atipia de células escamosas de significado indeterminado, (de las siglas en inglés atypical squamous cells of undetermined significance).
- AGUS:** Atipia de células glandulares de significado indeterminado, (de las siglas en inglés atypical glandular cells of undetermined significance).
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, (de las siglas en inglés polymerase chain reaction).
- LCR:** Región larga de control, (de las siglas en inglés long control region).
- P53:** Proteína p53.
- Rb:** Proteína Retinoblastoma.
- PAP TEST:** Papanicolaou o examen citológico cervical.
- INEC:** Instituto nacional de estadísticas y censos.
- SOLCA:** Sociedad de lucha contra el cáncer.
- OMS:** Organización mundial de la salud.

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es la segunda causa de mortalidad por enfermedades oncológicas en mujeres ecuatorianas, según los datos del INEC 2012. La infección persistente por ciertos genotipos de virus de papiloma humano (HPV) de alto riesgo oncogénico, es el principal factor etiológico para el desarrollo de esta neoplasia. No obstante, se conoce que la distribución de los tipos HPV varía de acuerdo a la ubicación geográfica, lo que hace relevante la determinación de los tipos de HPV en nuestra población. En este estudio se identificaron mediante PCR tiempo real los genotipos virales presentes en 45 muestras de tejido cérvico uterino parafinado con lesiones precancerosas (NIC I, NIC II, NIC III) y cáncer del año 2012, provenientes del hospital SOLCA Núcleo Loja. Los resultados muestran la presencia del virus en 82% de las muestras, y los genotipos de mayor prevalencia fueron: 16 y 18 con un 21%, 20%, respectivamente. Los datos obtenidos concuerdan con estudios realizados a nivel mundial que señalan a los genotipos 16 y 18 como los más frecuentes en cáncer cervical.

PALABRAS CLAVES: virus de papiloma humano, genotipo, cáncer cervical.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second cause of mortality in Ecuadorian women by oncological diseases, according to INEC 2012 data. Persistent infection by certain genotypes of high oncogenic risk of human papillomavirus (HPV) is the main etiological factor for the development of this neoplasia. However, it is known that the distribution of HPV types varies according to geographical location, which makes relevant the determination of the HPV types in our population. In this study we used real-time PCR to identify viral genotypes that were in 45 samples of cervical tissue previously fixed in paraffin with precancerous lesions (NIC I, NIC II, NIC III) and cancer in 2012, all of them were obtained from SOLCA-Loja. The results show the presence of the virus in 82% of the samples, and the most prevalent genotypes were: 16 and 18 with around 21%, 20% respectively. The data are consistent with studies conducted around the world that show that 16 and 18 genotypes are the most frequent in cervical cancer.

KEYWORDS: human papilloma virus, genotype, cervical cancer.

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de papiloma humano (HPV) es una enfermedad de transmisión sexual que en función del tipo viral contraído y situación inmunológica del paciente, produce lesiones que pueden variar desde verrugas o condilomas benignos hasta el cáncer de cuello uterino, además de carcinomas de otros órganos incluyendo de vagina, vulva, pene y ano en menor proporción (GMC, 2013).

Según los datos publicados en GLOBOCAN 2012-OMS a nivel mundial, el cáncer de cuello uterino es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres. En Ecuador, es la segunda causa de mortalidad por enfermedades oncológicas en mujeres, por detrás del cáncer de estómago. Se presentan cerca de 2094 nuevos casos (GLOBOCAN, 2012) y mueren alrededor de 697 (INEC, 2012), tomando como fuente el cuadro de defunciones femeninas según causas de muerte (tumores neoplasias).

Loja, tiene el índice de cáncer más elevado del Ecuador, de los cuales el cáncer de cuello uterino y de estómago son los de mayor prevalencia, según un estudio de SOLCA-Loja, de 1997 al 2006. El 59 % de los casos está en las mujeres, relacionado principalmente al cáncer de cuello uterino. De los 783 casos de cáncer en mujeres, 422 son de cuello uterino y la tasa de mortalidad es de 9,6 por cada 100.000 habitantes en el 2006 (Garrido & Yunga, 2010).

Los mecanismos de tamizaje utilizados en la actualidad para combatir las altas tasas de incidencia y mortalidad por esta neoplasia, se basan en la detección temprana a través de exámenes de citología cervical como la prueba de Papanicolaou. Sin embargo, no se ha logrado una disminución significativa de éstos índices, debido a que algunas pacientes no se realizan los controles una vez iniciada la vida sexual, así como también a la baja sensibilidad que presenta este método de diagnóstico. Además los cambios celulares inducidos por la presencia del virus pueden tardar años en manifestarse, y ser tan leves al inicio que incluso pueden escapar al examen de un personal bien entrenado (ME, 2013).

Debido a la existencia de HPV de alto o bajo riesgo oncogénico en lesiones precursoras y el cáncer cervical, es de gran importancia identificar el tipo viral involucrado. La utilización de métodos moleculares en combinación con estudios citológicos, son una herramienta eficaz que contribuye a optimizar el diagnóstico, favoreciendo la implementación de tratamientos y protocolos más adecuados para el seguimiento de los pacientes afectados (De Guglielmo & Rodríguez, 2010).

En el país no hay datos nacionales de prevalencia de los subtipos más frecuentes del HPV de bajo o alto grado oncogénico, aunque sí se han realizado algunos estudios regionales de genotipos prevalentes, como por ejemplo en las ciudades de Guayaquil (tipos: 16,18, 39, 52, 53 y 66) (Feng, *et al.* 2010) y Cuenca (tipos: 16, 52, 43,53 y 68) (Picón, *et al.* 2006). En nuestra ciudad no existen datos publicados de la genotipificación del HPV y es por ello que se plantea el presente estudio retrospectivo.

En este estudio se utilizó muestras parafinadas de tejido cervical del banco de muestras del hospital de SOLCA núcleo Loja. Este material es de incalculable valor, ya que además de conservarse para análisis histopatológicos, representan una fuente importante para la investigación retrospectiva a nivel molecular, pues evita la necesidad de tejido fresco para el diagnóstico, son de fácil manejo y práctico almacenamiento, entre otras ventajas. El material genético obtenido a más de facilitar la identificación de presencia o ausencia del HPV, permite la diferenciación entre tipos de alto riesgo.

Así mismo, la genotipificación es de gran interés debido a que la distribución de los tipos de HPV y el potencial oncogénico de las variantes virales cambia de acuerdo a la ubicación geográfica de una población determinada, proporcionando datos que ayudarán a un diseño más eficiente de vacunas y protocolos de vacunación, lo cual permite desarrollar nuevos programas de prevención y manejo de esta enfermedad dirigidos a nuestra población.

El objetivo principal de este trabajo es estandarizar el proceso de extracción de ADN de HPV a partir de muestras parafinadas de tejido cervical, diagnosticadas con lesiones precancerosas (NIC I, NIC II, NIC III) y cáncer cervical por médicos patólogos durante el año 2012, y analizar los genotipos de alto riesgo presentes en las muestras mediante PCR tiempo real.

CAPÍTULO I

1 Marco teórico

1.1 Cáncer de cervix uterino

Cáncer es el término otorgado a un grupo de diferentes enfermedades que se pueden originar en casi cualquier parte del cuerpo, que se caracteriza por la presencia de células anormales que se multiplican sin control y tienen la capacidad de invadir los tejidos cercanos a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático en un proceso denominado metástasis. Esto se origina por cambios celulares ocurridos cuando el material genético ha sido alterado, por ende las células reciben mensajes erróneos y tiende a perder el control de su propio desarrollo, de modo que se dividen en más células a mayor velocidad que el resto, sin cumplir las funciones para las cuales han sido creadas (ACS, 2012).

El cáncer cervical es una enfermedad neoplásica maligna que se origina en el cérvix uterino y cuya progresión natural lleva a la muerte. Aún cuando el conocimiento de la enfermedad es incompleto, los estudios realizados han mostrado que la mayoría de estos tumores tienen una progresión gradual y sus lesiones precursoras pueden mantenerse en fase reversible o *in situ* por varios años en la mayoría de las pacientes. El cáncer cervical es el estadio final de un conjunto de alteraciones genéticas a nivel epitelial, donde cada cambio da lugar al siguiente de manera imperceptible (Dzul, *et al.* 2004).

1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical

El cáncer de cuello uterino y las lesiones pre-malignas se comportan como una enfermedad de transmisión sexual, asociada especialmente a la infección por HPV, el inicio precoz de la actividad sexual y la existencia de varias parejas sexuales (Kjaer, *et al.* 2007). Adicionalmente se han identificado como favorecedores de la progresión a la malignidad, la alta carga viral, la existencia de cuadros de inmunodeficiencia adquirida (tratamientos inmunosupresores, infección por VIH) o genéticas, factores hormonales, tratamientos con corticoesteroides o anti-conceptivos orales, así como el tabaquismo, la multiparidad y la existencia de otras infecciones de transmisión sexual (Bosch, *et al.* 2002).

1.2.1 Infección por HPV y su relación con el cáncer cervical.

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de cáncer de cuello uterino es la infección con ciertos genotipos de HPV considerados como oncogénicos o de alto riesgo, detectándose la presencia de ADN del virus en el 99.7% de los casos. Por lo que se estima que la infección persistente por genotipos de alto riesgo resulta una causa necesaria, aunque no suficiente, para el desarrollo del cáncer de cuello uterino, debido al gran número de infecciones que se resuelven espontáneamente (Chan, 2007).

Las infecciones genitales por HPV son extraordinariamente frecuentes, la mayor parte de ellas asintomáticas y se resuelven espontáneamente en uno o dos años. Sólo un 10% de los casos cuando la infección persiste durante varios años, las lesiones tienden a progresar a un cáncer de cuello uterino invasivo en un proceso que generalmente toma 10-20 años (Saslow, *et al.* 2007).

1.3 Generalidades del HPV

1.3.1 Estructura.

Los virus de papiloma humano pertenecen a la familia Papillomaviridae, las partículas virales de forma icosaédrica (72 capsómeros) miden aproximadamente 55 nm de diámetro y no poseen envoltura (Romero, 2007). Su genoma es de ADN de doble cadena circular de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) y codifica entre 9 a 10 proteínas de acuerdo al tipo de virus, 7 u 8 de expresión temprana y 2 tardíos (Murray, *et al.* 2009; McCance, 2009). Los virus de papiloma infectan con alta especificidad epitelios escamosos, mucosa genital, oral y conjuntival, produciendo la transformación e inmortalización de sus células blanco (Consuegra, *et al.* 2004).

El genoma del papilomavirus se divide en tres regiones denominadas: temprana, tardía y larga de control.

1.3.1.1 Genes tempranos.

Los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7 codifican proteínas no estructurales que regulan las funciones virales (Alonso & Lazcano, 2005). La región temprana (E), codifica proteínas que participan en funciones reguladoras a nivel del ciclo celular, replicación del ADN y la activación del ciclo lítico. La E2 codifica tres proteínas que funcionan como factores de transcripción; éstos son reguladores intragenómicos a través de la formación de dímeros en sitios específicos de unión. La expresión de E4 precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. E1 promueve la replicación viral. E5 participa en las fases tempranas de la infección, debido a que codifica una pequeña proteína capaz de unirse a varias proteínas de membrana, como receptores de factores de crecimiento e interviene en la transformación celular. E6 y E7 participan en el proceso de transformación viral mediante la unión a las proteínas celulares p53 y Rb, respectivamente, desregulando el crecimiento celular e inhibiendo la apoptosis (Murray, *et al.* 2009; Consuegra, *et al.* 2004).

1.3.1.2 Genes tardíos.

La región tardía (L) codifica las proteínas estructurales. Los genes tardíos L1 y L2 codifican las proteínas de la cápside viral (Consuegra, *et al.* 2004). La L1 tiene un peso molecular de 55 KD, es la proteína principal de la cápside y presenta similitudes en los diferentes tipos de HPV, a diferencia de la L2, que presenta muchas más variaciones. De acuerdo con el tipo de HPV se presentan variaciones en el tamaño y composición de nucleótidos (López & Lizano, 2006).

1.3.1.3 Región larga de control.

La región de control (LCR), corresponde a la porción no codificadora del genoma, puesto que no tiene marco de lectura. Está provista de secuencias que promueven y reprimen la expresión y replicación viral (Consuegra, *et al.* 2004). Corresponde a una sección muy variable entre los tipos virales, conservando únicamente elementos de regulación común tanto viral como celular que son requeridos para la regulación génica, la replicación del genoma y el empaquetamiento del material genético en las partículas virales (Butz & Hoppe-Seyler, 1993).

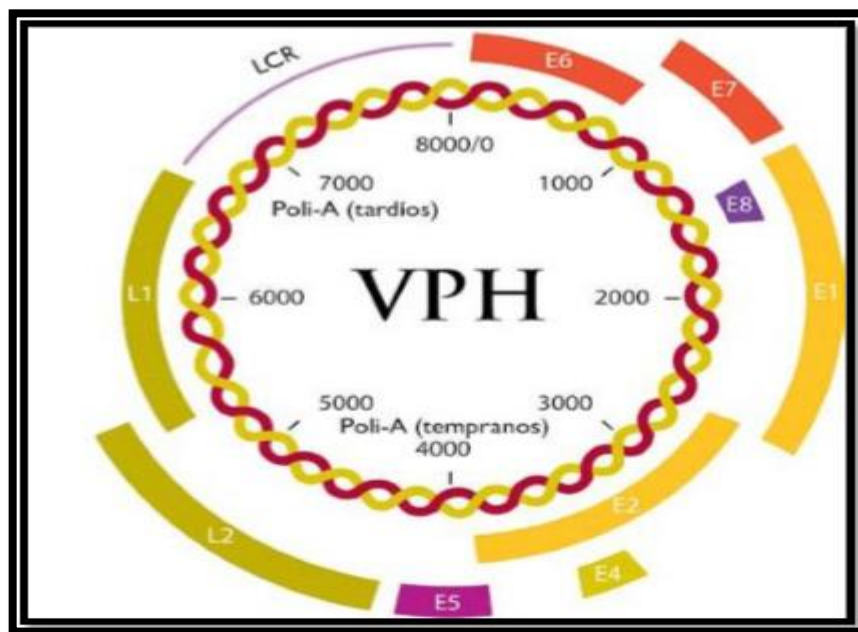


Figura 1. Organización del genoma de HPV.

E) Región temprana, L) región tardía y LCR) región larga de control.

Fuente: López & Lizano, 2006.

1.3.2 Clasificación.

La clasificación de genotipos virales está basada en la descripción de tipos y subtipos en relación con el grado de homología del ADN que comprenden la región L1, una de las regiones más conservadas dentro del genoma viral (Bernard, 2005). Un nuevo tipo viral es aquel en el que la variación en L1 es mayor al 10%, un subtipo cuando la variación está entre 10 y 2%, y una variante cuando esta diferencia es menor a 2% (López & Lizano, 2006).

Hasta el momento se han identificado más de 100 tipos diferentes de HPV. Los datos acumulados sugieren una posible asociación del HPV con un amplio espectro de tumores en diferentes órganos (tracto genital inferior, tracto digestivo superior e inferior, tracto urinario, tracto respiratorio, piel, conjuntiva). A estos virus se los ha clasificado en dos grupos de riesgo tomando en cuenta la gravedad de la lesión ocasionada y su potencial oncogénico para el ser humano (Consuegra, *et al.* 2004).

1.3.2.1 Tipos de HPV de “bajo riesgo”: (6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 y 81) aquellos que no causan cáncer cervical, pero que están relacionados con lesiones proliferativas benignas, tales como verrugas genitales o cambios diminutos en el cuello uterino, que tienen poca probabilidad de progresar a la malignidad. Los tipos 6 y 11 (se asocia con cerca del 90 % de las verrugas genitales) son los más comunes (Qiagen, 2013).

1.3.2.2 Tipos de HPV de “alto riesgo”: (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.) asociados a lesiones pre-neoplásicas, carcinoma in situ y el carcinoma invasor. Los tipos 16 y 18 son los más peligrosos, ya que causan el 70 % de los cánceres cervicales (Qiagen, 2013).

El HPV es específico del huésped y cada tipo está en gran parte asociado con distintos procesos histopatológicos. En la tabla 1 se hace referencia a los principales tipos de HPV implicados en cada uno de los procesos patogénicos en los que intervienen, y se expone, además, aquellos tipos relacionados con procesos de inmunodeficiencia y los descritos como HPV con potencial maligno. Los HPV varían en su tropismo, potencial oncogénico y asociación con distintas enfermedades (Muñoz, *et al.* 2006).

Tabla 1. Tipos de HPV y su asociación con las principales enfermedades.

Enfermedad	HPV frecuentes	HPV menos frecuentes
VERRUGAS		
Verruga plantar	1, 2	4, 6, 3
Verruga común	1, 2, 7, 10	3, 4, 26**, 26, 27, 28, 29, 41, 57, 65
Verruga plana	3, 10	27**, 38, 41, 49**
CONDILOMAS		
	6, 11	30, 42-44, 45*, 51*, 54, 55, 70
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DEL TRACTO GENITAL INFERIOR Y ANO		
Bajo grado	6, 11	16*, 18*, 31*, 33*, 35*, 42-44, 45*, 51*, 52*
Alto grado	16*, 18*	6, 11, 31*, 33*, 35*, 39*, 42-44, 45*, 51*, 52*, 56*, 58*, 66*
PAPULOSIS BOWENOIDE		
	16*	31*, 34, 39*, 42, 45
CÁNCER DE CÉRVIX		
	16*, 18*	31*, 33*, 35*, 39*, 45*, 51*, 52*, 56*, 58*, 66*
CÁNCER DE PENE, VULVA, VAGINA, CANAL ANAL		
	16*, 18*	31*, 33*, 35*, 39*, 45*, 51*, 52*, 56*, 58*, 66*
OTROS CÁNCERES		
Cáncer de piel escamoso y basocelular	2, 3, 5*, 8*, 9, 10	12, 14*, 15, 17*, 19, 20*, 21-25, 36, 37, 38*, 47, 50
Cáncer de amígdala y orofaringe	16*	31, 33
Cáncer periungueal y conjuntival	16*	
OTRAS ENFERMEDADES		
Enfermedad verruciforme	2, 3, 5*, 8*, 9, 10	12, 14*, 15, 17*, 19, 20*, 21-25, 36, 37, 38*, 47, 50
Papilomatosis respiratoria recurrente	6, 11	32
Papilomas conjuntivales	6, 11, 16*	

** Frecuentes en pacientes inmunodeprimidos.

* Tipos con alto potencial oncogénico

Fuente: modificado de Vilata, 2001.

1.4 Patogénesis

1.4.1 Participación del HPV en la carcinogénesis.

Estudios del mecanismo molecular del proceso de transformación, han demostrado un complejo modelo de interacciones de proteínas virales con reguladores celulares, que intervienen en procesos biológicos como: la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular (Von Knebel, 2002). Se estima que la relación del HPV y el desarrollo de cáncer es mayor a 99,7% (Krämer, *et al.* 2010).

Se considera que el proceso de integración del genoma del HPV al genoma de la célula hospedera es el evento fundamental en la progresión a cáncer, debido a que causa la sobre expresión de los oncogenes E6 y E7 y la interrupción de genes celulares. Estos tienen la capacidad de immortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión continua de estos genes, es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células (Mahy & Marc, 2010).

A nivel celular la proteína p53 es la encargada de incrementar su expresión cuando hay un daño en el ADN y detiene el ciclo celular en G1 hasta que se repare el daño, y en caso de no lograrse esta reparación, inhibe al gen bcl-2, que es un represor de la apoptosis. La proteína Rb retinoblastoma o proteína supresora de tumor, tiene como función inhibir la actividad del factor de transcripción E2F, deteniendo el ciclo celular en fase G1 de forma normal, a medida que la célula recibe señales de mitógenos Rb es fosforilada liberando a E2F permitiendo así que la célula entre en fase S (Maldonado, 2002).

La infección por HPV de alto riesgo tiende a forzar la pérdida de las funciones de algunas vías de regulación celular. Las oncoproteínas E6 y E7 del virus, forman complejos e inactivan funcionalmente a las proteínas p53 y Rb respectivamente. Además E6 puede activar la telomerasa (una ribonucleoproteína con función enzimática, importante para el mantenimiento de las estructuras teloméricas contenidas al final de los cromosomas) como un paso importante para la immortalización celular. Como consecuencia, las señales de transducción reguladas por estas proteínas son afectadas lo que contribuye a la inestabilidad genómica (Maldonado, 2002).

Una vez que las células son infectadas por el HPV comienza la replicación del virus gracias a factores de transcripción de la célula hospedera y la proteína E1 viral. E7 se une a la proteína retinoblastoma dejando libre al factor de transcripción E2F, lo que permite la activación de genes que aumentan la proliferación celular. La oncoproteína E6 es capaz de inducir la ubiquitinación y posterior degradación de p53, lo que conlleva a disminución de la

apoptosis mediada por p53. E2 regula la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7. La proteína E5 aumenta la acción de las quinasas celulares lo cual promueve la proliferación y disminuye la diferenciación celular. E4 ayuda al ensamblaje de las proteínas de la cápside viral L1 y L2 para el empaquetamiento de los viriones de HPV (Silva, *et al.* 2013).

Por otra parte se ha observado que la actividad de los tipos virales de bajo riesgo, son menos eficaces que los de alto riesgo para interferir con p53 y Rb. De este modo, los genotipos de bajo riesgo son asociados con el desarrollo de proliferaciones benignas, como verrugas genitales y lesiones intraepiteliales de bajo grado, que tienden a eliminarse espontáneamente (Alonso & Lazcano, 2005).

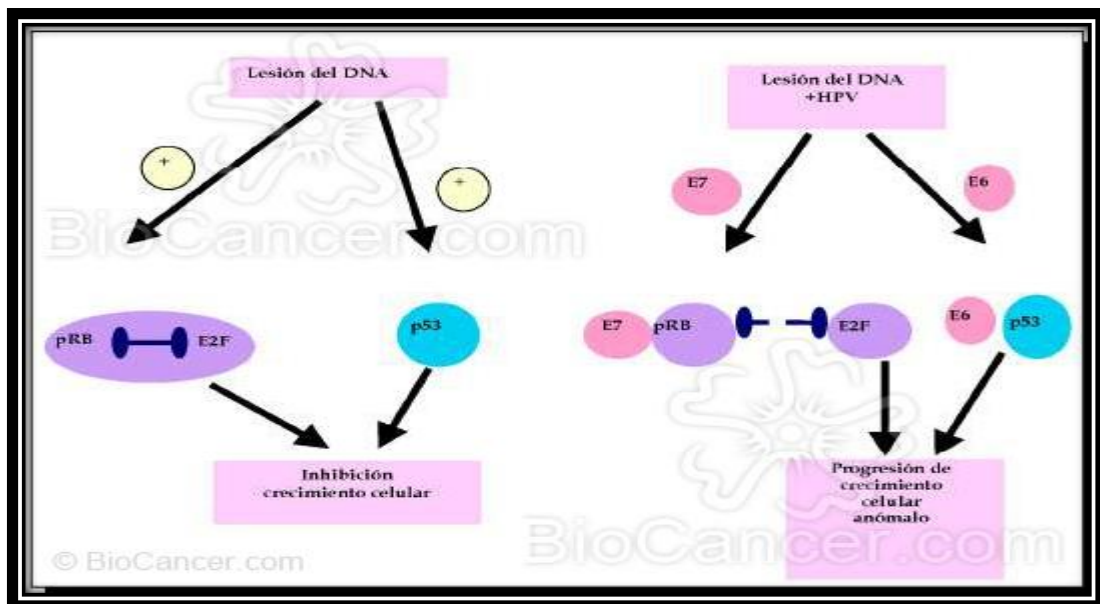


Figura 2. HPV en la carcinogénesis. Alteración en el funcionamiento de p53 y Rb mediado por las oncoproteínas virales E6 y E7. Fuente: biocancer, 2013.

1.4.2 Manifestaciones patológicas.

La patogenia del cáncer de cuello uterino se caracteriza porque las células normales se transforman primero en células desdiferenciadas con displasias leves, luego moderadas, después severas o carcinomas *in situ* para finalizar como un carcinoma invasor, desarrollándose en un proceso continuo hacia la malignidad, lo que ha servido como modelo para las diferentes neoplasias (Steben & Duarte-Franco, 2007).

Además una de las características del cáncer de cuello uterino es que el proceso requiere de un periodo de tiempo de varios años para desarrollarse, permitiendo, en el caso de dicha patología, sentar las bases de la oncología preventiva, mediante el examen de Papanicolaou

en forma periódica, que permita dar seguimiento a los cambios celulares que pueden presentarse (Steben & Duarte-Franco, 2007).

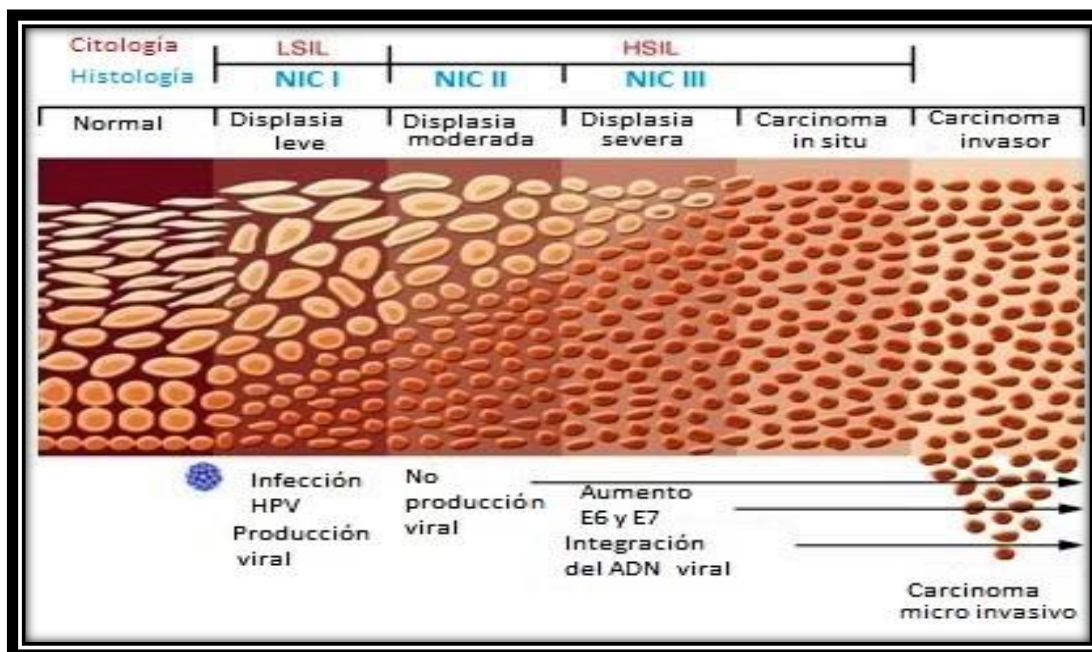


Figura 3. Patogénesis del Cáncer de cuello uterino.

Fuente: Modificado de Ojeda, 2010.

En lo referente a la nomenclatura para la citología cervical, existen diferentes clasificaciones; la primera descrita en la historia de la Ginecología fue la propuesta por la OMS en 1960, después en 1967 Richart y otros describieron la clasificación que se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y finalmente en 1988, a través de una reunión de las diferentes sociedades de patólogos-ginecólogos acordaron una nueva nomenclatura conocida como sistema Bethesda determinada por el National Cancer Institute de los Estados Unidos, la cual contribuye con una interpretación más descriptiva de los hallazgos en citología cervical, introduciendo los términos lesión intraepitelial escamosa (SIL), adicional a atipias de tejido escamoso y glandular de significados indeterminados o inciertos respectivamente (ASCUS – AGUS) (Varela, 2005).

Tabla 2. Nomenclatura en citología cervical.

OMS	RICHART	BETHESDA
Displasia Leve	Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 1 (NIC 1)	Lesión Intraepitelial Escamosa de bajo grado (LSIL)
Displasia Moderada	Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2 (NIC 2)	Lesión Intraepitelial

Displasia Severa	Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 3 (NIC 3)	Escamosa de alto grado (HSIL)
Carcinoma <i>In situ</i>		
Carcinoma invasor	Carcinoma epidermoide Invasor	Carcinoma epidermoide invasor

Fuente: Fleider & Tatti, 2008.

Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) propuesta por Richart, abarca tres grados progresivos que permiten el reconocimiento del proceso patológico, lo cual de acuerdo a cuan anormal aparecen los cambios en las células: leve, moderado y severa, establecerá el riesgo de desarrollar cáncer con el aumento en cada grado de NIC (Varela, 2005).

NIC I, representa menor riesgo y está asociado con displasia leve caracterizado por la presencia de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio cervical.

NICII, el riesgo acrecienta y se representa una displasia moderada con presencia de células inmaduras hasta el tercio central del epitelio cervical.

NICIII, asociada con displasia severa y carcinoma in situ, representando el mayor riesgo ya que las células inmaduras recubren la totalidad del revestimiento de su cérvix y si no es tratada oportunamente, es frecuente que esta fase se convierta en un cáncer que podría propagarse.

Lesión intraepitelial escamosa (SIL) establecida por el sistema Bethesda, designaron dos términos diagnósticos dentro de esta categoría:

LSIL - bajo grado, incluye infección por HPV y NIC I (displasia leve).

HSIL - alto grado, incluye NIC II y NIC III (displasia moderada, displasia severa y carcinoma *in situ*).

Adicionalmente, cuando existe la presencia de atipias de células escamosas y/o glandulares en la que los hallazgos citológicos son de significación dudosa debido a que los cambios observados pueden deberse a un proceso benigno pero intenso, o a una lesión potencialmente grave, por lo que pueden ser clasificados erróneamente, son interpretados como de significado indeterminado o incierto, ya que estos cambios son cuantitativa y/o cualitativamente insuficientes para un diagnóstico final (Varela, 2005).

ASCUS, Atipia de células escamosas de significado indeterminado.

AGUS, Atipia de células glandulares de significado indeterminado.

1.5 Diagnóstico

1.5.1 Diagnóstico tradicional de la enfermedad.

La infección causada por el HPV puede evidenciarse indirectamente mediante examen citológico o histopatológico a partir de cambios morfológicos, por lo cual las técnicas tradicionales, como la citología y la colposcopia son en la actualidad la herramienta más usada para el cribado del cáncer cervical (De Guglielmo & Rodríguez, 2010).

1.5.1.1 Citología.

La prueba de Papanicolaou (Pap test) es esencial en la detección temprana de atipias. Lleva el nombre del médico que lo hizo conocido, el Dr. Papanicolaou y se ha convertido en el método universal para el cribado de lesiones tumorales de cérvix mediante análisis citológico. Esta prueba consiste en raspar la superficie del cuello uterino para adquirir una muestra de células que subsiguientemente se analizarán con el objetivo de detectar la presencia de alguna anomalía (Cisterna & Gobernado, 2005).

Los resultados citológicos de esta prueba, no se pueden emplear para hacer un diagnóstico definitivo e iniciar un tratamiento. El test de Papanicolaou solo nos permite examinar las células, pero no la estructura de los tejidos. El diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical o carcinoma de cuello uterino requiere una muestra de tejido, obtenida por biopsia de lesiones sospechosas (Varela, 2005).

No obstante, los falsos negativos en el cribado de las anomalías citológicas dependen mucho del observador y se pueden deber además a la mala realización de la toma de la muestra en la zona de transformación, deficiente lectura y un incorrecto seguimiento de la paciente. Por lo tanto, la eficacia de la prueba está limitada por este rango de errores, presentando un 15% de precisión en la detección de infección por HPV en los estadios tempranos (Varela, 2005).

1.5.1.2 Colposcopia.

Este método de exploración fue creado por el Dr. Hinselmann H. en 1928, se realiza después de una prueba de Papanicolaou anormal, para determinar si las células anormales son el resultado de una infección vaginal o debido a una inflamación o algo más grave (Chavez, 2007).

Esta prueba se caracteriza por una alta sensibilidad pero baja especificidad, la misma que permite ver la existencia de lesiones del cérvix con aumento a través de utilización de un

sistema estereoscópico, lo cual después de dicha observación facilitara pintar el cérvix colocando una solución de ácido acético al 3 o 5% que hará que las células anormales se vean mejor por reacción acetoblanco del epitelio y permitir la toma de biopsia dirigida al sitio de la lesión (Dzul, *et al.* 2004).

Posterior a esta técnica de diagnóstico se realiza la observación histopatológica de las biopsias extraídas, pero este paso dependerá especialmente del ojo del observador y su experiencia, no obstante, siempre habrá que considerar un margen de error humano (Sellors & Sankaranarayanan, 2003).

1.5.1.3 Tipo de muestras utilizadas en citología cervical.

1.5.1.3.1 Muestras frescas.

1.5.1.3.1.1 Raspado cervical.

Hace referencia a la toma de una muestra de células de la superficie del endo y exocervix, mediante la cual se procederá a realizar el frotis de las mismas. Una vez realizada una pre limpieza del exocervix, la toma de la muestra puede efectuarse mediante el uso de una espátula de madera, aplicador de algodón hisopo o de un cepillo cervical de nylon, cytobrush, que por su flexibilidad penetra con mayor eficacia en el canal cervical y logrando mejor recolección de las células para el análisis (Varela, 2005).

1.5.1.3.1.2 Biopsia fresca.

Una vez realizada la colposcopia, si se observa alguna anomalía en las células cervicales se extraerá una pequeña muestra de tejido usando pequeñas pinzas para biopsia. Seguidamente tras la extracción del corte de tejido este debe ser introducido rápidamente en solución salina estéril y enviar al laboratorio para el análisis por el patólogo (Sellors & Sankaranarayanan, 2003).

1.5.1.3.2 Muestras fijadas en parafina.

Los tejidos fijados y embebidos en parafina tienen como fundamento básico la estabilización de las proteínas del espécimen y evitar los cambios post-mortem típicos, ataques microbianos y procesos metabólico-enzimáticos como la autólisis celular (SL, 2013).

Éstos brindan la posibilidad de estudiar un gran número de individuos con patologías diversas, que de otro modo habrían sido muy difíciles de obtener, prescindiendo del manejo de los pacientes. Pero quizás el beneficio más importante es que obvian la necesidad de tejido fresco para el diagnóstico molecular, lo cual resulta muy ventajoso en casos post-mortem constituyendo un importante material de archivo para la realización de estudios

clínicos retrospectivos y, además, representan un recurso invaluable para estudiar la patogénesis molecular de las enfermedades y la expresión génica diferencial. (Bernstein, *et al.* 2002; Mies, 1996).

Sin embargo este tipo de muestras presentan ciertas desventajas que por lo general se relacionan con aspectos técnicos, ya que a pesar de que la arquitectura de los tejidos se preserva, la extracción de los ácidos nucleicos generalmente se reduce a recuperar ADN degradado, debido a que durante todo el proceso de parafinación de la muestra tiende a fragmentar el material genético por el entrecruzamiento con otras biomoléculas y cambio de bases nitrogenadas. Por lo tanto, el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de bloques de parafina es usualmente, pero no siempre, exitosa (Coombs, *et al.* 1999).

1.5.1.3.2.1 Proceso de inclusión en parafina.

1.5.1.3.2.1.1 Fijación.

La fijación tiene como finalidad conservar la morfología y la composición de los tejidos. Debe realizarse inmediatamente para evitar que los tejidos sufran alteraciones ocasionadas por la anoxia, la autólisis, la proliferación de bacterias y hongos (Alzola, 2001).

La función de los fijadores en el tejido es desnaturalizar las proteínas por coagulación, inactivando enzimas, esto posibilita que el citoplasma sufra una transformación convirtiéndose en una red proteica porosa. Entre los fijadores comúnmente utilizados están la formalina, aldehídos y alcoholes, estos se los selecciona dependiendo el propósito a conseguir, sin embargo el de mayor elección es el formol debido a su bajo precio, eficiencia y penetración. El proceso de fijación se lleva a cabo durante 12 horas, dependiendo del fijador y del tamaño de la muestra; una vez transcurrido este tiempo, la muestra debe ser lavada para eliminar el exceso (Villalobos, 2006).

1.5.1.3.2.1.2 Deshidratación.

Los tejidos están formados principalmente por agua y debido a que la parafina no es miscible con esta, se produce la necesidad de extraerla y reemplazarla por parafina. La deshidratación se consigue principalmente con alcoholes (etílico y en ocasiones isopropílico) en concentraciones crecientes empezando en 70% y terminando en absoluto durante un periodo de 6 a 24 horas, sacando el agua de forma progresiva para evitar un cambio brusco de volumen que distorsione el tejido y afecte su morfología. (Alzola, 2001).

1.5.1.3.2.1.3 Aclaramiento.

Este proceso consiste en sustitución del agente deshidratante que se encontraba en el tejido por una sustancia que pueda disolver la parafina al momento de la inclusión. La característica de estos solventes es que tienden a transparentar el tejido, aunque no es su finalidad. Los solventes utilizados pueden ser benceno, xileno, tolueno, etc. El xileno es el de uso más frecuente, con un tiempo de duración de 1 a 6 horas dependiendo del tamaño de la muestra, pero no se debe dejar más tiempo ya que tiende a endurecer los tejidos y provocan problemas al hacer la secciones (Alzola, 2001).

1.5.1.3.2.1.4 Inclusión y formación del bloque de parafina.

Es la etapa final en la que la parafina fundida, generalmente en una estufa a 60°C, penetra en el tejido a través de diferentes lavados en bandejas independientes, con una duración de 30 minutos a 6 horas, dependiendo del tamaño de la muestra; luego se deja solidificar a la parafina con el tejido incluido y de esta forma el solvente es reemplazado por la parafina que encerrará el tejido manteniendo estable la muestra, formando de esta manera los bloques histológicos (Alzola, 2001).

1.5.2 Diagnóstico molecular de la enfermedad.

La mayor parte de los métodos de identificación directa de la infección por HPV están basados en la detección del genoma del virus. De manera ideal, estos métodos deben ser capaces de detectar, identificar y cuantificar con alta sensibilidad y especificidad la presencia de los múltiples tipos de virus (Rodríguez, *et al.* 2008).

Las técnicas que se utilizan actualmente son sistemas de hibridación directa en soporte sólido (hibridación *in situ*, Southern blot), hibridación en soporte líquido (captura de híbridos) y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes: PCR anidada, PCR múltiplex, PCR tiempo real, PCR y estudio de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción o RFLP (De Guglielmo & Rodríguez, 2010).

1.5.2.1 Métodos de hibridación molecular.

1.5.2.1.1 Southern blot.

En este método de hibridación, el ADN de HPV se rompe en fragmentos utilizando una enzima de restricción, este producto se integra dentro de un gel para ser sometida a electroforesis y finalmente se utiliza una sonda marcada complementaria al fragmento que queremos detectar. Para esta técnica las muestras con alta carga viral pueden ser analizadas en forma confiable, entretanto que las que tienen baja carga viral pueden ser analizados únicamente por técnicas muy sensibles (Malloy, *et al.* 2000).

1.5.2.1.2 Captura de híbridos.

Esta técnica se basa en la hibridación del ADN de HPV con sondas de ARN, en la cual, cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido ARN-ADN que es capturado por anticuerpos monoclonales específicos que luego se revelan por quimioluminiscencia con amplificación de la señal. Este sistema proporciona una sensibilidad cercana a la PCR y detecta 13 tipos de HPV de alto riesgo (16,18,31,33,35,39,45,52,56,58,59,68) y 5 de bajo riesgo oncogénico (6,11, 42,43,44). Está estandarizado y es sumamente reproducible. (Evans & Cooper, 2004).

1.5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR en la detección de la infección por HPV, tienen como fundamento un proceso en el que se amplifica el número de copias de un segmento de ADN viral, determinando la presencia o ausencia de los genotipos virales en la muestra. Las diversas variantes de esta técnica se diferencian según el diseño del sistema de amplificación, en función de que detecten tipos específicos, o bien aquellos capaces de identificar un amplio número de tipos. La alta sensibilidad de esta técnica permite detectar la presencia de escasas copias de ADN viral en pocas o varias miles de células; siendo el método de mayor elección para procesar aquellas muestras con escasa cantidad de células o muy baja carga viral (De Guglielmo & Rodríguez, 2010).

1.6 Tratamiento

Existen diferentes tipos de tratamientos estándar para cada paciente con cáncer de cuello uterino, los cuales se basan generalmente en cirugía, radioterapia y quimioterapia, pero todos estos van a depender de la etapa o estadio en la que se encuentra el cáncer. En los casos de NIC I, estos pueden desaparecer espontáneamente o se puede erradicar la lesión con métodos más sencillos como criocirugía, laser o una pequeña extracción quirúrgica; conforme exista la presencia de una lesión más grave como NIC II o III, requerirá una extirpación quirúrgica de una porción del cuello uterino denominada conización o en el peor de los casos la extracción del útero, proceso denominado histerectomía simple. Además es posible utilizar la radioterapia para tratar los casos en que el cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino o en la que ha reaparecido y finalmente otra alternativa es la quimioterapia que utiliza medicamentos para destruir o interrumpir el crecimiento de células cancerosas (ACS, 2012).

1.7 Prevención de la infección

1.7.1 Vacunas contra el HPV.

Se han desarrollado dos nuevas vacunas con el objetivo de prevenir la enfermedad ocasionada por la infección con determinados tipos de HPV; **Gardasil** producida por Merck, Sharp & Dohme y **Cervarix** de GlaxoSmithKline (GSK). Ambas aprobadas por la FDA (ACS, 2012).

Gardasil es una vacuna tetravalente ya que protege contra cuatro tipos de HPV: 6, 11,16 y 18. Está aprobada para prevenir el cáncer y el precáncer de ano, vagina y vulva, así como para prevenir verrugas anales y genitales. La vacuna ha sido certificada para usos en hombres y mujeres de 9 a 26 años de edad. Cervarix es una vacuna bivalente porque está dirigida a dos tipos de HPV: 16 y 18. La misma está aprobada para niñas y mujeres jóvenes de 10 a 25 años de edad. Previene el cáncer cervical causado por los tipos 16 y 18 del virus (ACS, 2012).

Ambas vacunas se administran en una serie de tres inyecciones en tejido muscular por un periodo de 6 meses. Los efectos adversos son muy leves. Los más frecuentes son enrojecimiento breve, inflamación y eritema en el área de la piel donde se administra la inyección. Finalmente es de gran importancia resaltar que Gardasil y Cervarix sólo funcionan para prevenir la infección por HPV, estas no tiene efecto terapéutico contra una infección existente. Motivo por el cual para mayor efectividad, la vacuna contra el HPV se debe aplicar antes de que una persona se exponga al virus (como a través de la actividad sexual) (ACS, 2012).

CAPÍTULO II

2 Metodología

2.1 Material de estudio

Para este estudio se utilizó únicamente muestras de tejido cérvico uterino que hayan sido parafinadas siguiendo el protocolo del laboratorio de histopatología del hospital SOLCA Núcleo Loja. Solo fueron incluidas aquellas muestras diagnosticadas con lesiones precancerosas (NIC I, NIC II, NIC III), y cáncer cervical por médicos patólogos durante el año 2012. Se excluyeron las muestras que provenían de bloques en mal estado y/o aquellas que no presentaban un área de superficie de tejido representativo.

2.2 Manejo de biopsias y preparación de cortes parafinados

Todos los bloques se ubicaron sobre hielo, durante 20 minutos, para suavizar el tejido y luego se colocaron sobre papel absorbente para descartar el exceso de agua. Los cortes se realizaron con un micrótopo de rotación (AO' ROTARY MICROTOME 820), estos fueron de 10 micras de espesor (área de superficie promedio de las muestras de tejido: aproximadamente 10-15 mm), descartando los 5 primeros cortes para evitar contaminación, se tomaron entre 8 a 10 cortes de cada bloque dependiendo de la cantidad de tejido que contenía. Con la ayuda de pinzas estériles se colocaron los cortes dentro de tubos eppendorf estériles. Entre cada muestra se limpió el micrótopo con etanol, se lavó las cuchillas con detergente y se aplicó DNase con el fin de prevenir contaminación cruzada.

2.3 Estandarización de la técnica de desparafinación y extracción de ADN

Este estudio evaluó cuatro protocolos para el proceso de desparafinación de la muestra y posteriormente se realizó el proceso de extracción del material genético mediante el kit comercial PureLink Genomic DNA mini kit de la marca Invitrogen (FFPE TISSUE LYSATE).

2.3.1 Desparafinación del tejido.

2.3.1.1 Protocolo de desparafinación A.

Protocolo tomado del KIT Invitrogen FFPE TISSUE LYSATE.

En un microtubo estéril de 1.5 ml se colocaron de 1 a 8 cortes de tejidos parafinados de 10 um de espesor con un área de superficie de tejido de 20-50 mm² (no más de 20 mg de tejido), se añadió 1 ml de CitriSolv o (XILENO) a la muestra y se dio vortex durante pocos segundos. Se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiental para sedimentar el tejido. Se retiró con cuidado el sobrenadante sin perturbar el sedimento (pellet), luego se añadió 1 ml de etanol al 96-100 % y se dió vortex para resuspender el pellet. Nuevamente se centrifugó para sedimentar el tejido, retirando con cuidado el

sobrenadante. Se adicionó etanol una vez más y finalmente se incubaron los microtubos con la tapa abierta a 37°C durante 5-10 minutos para evaporar cualquier residuo de etanol.

2.3.1.2 Protocolo de desparafinación B.

Protocolo tomado del trabajo de tesis: identificación del virus de papiloma humano mediante PCR-RFLP y posterior genotipificación en muestras de tejido cervical parafinado de los años 2005 hasta 2011, realizado en el departamento de ingeniería en biotecnología de la escuela politécnica del ejército, Quito, Ecuador (Vaca, 2012).

Se colocaron en un microtubo estéril 10 cortes de tejido de 10µm de espesor, se agregó a cada tubo 750 µL de xilol y se agitó por 10 minutos, seguidamente los tubos se centrifugaron a 13300 rpm durante 9 minutos, eliminando el sobrenadante de cada tubo y se repitió la adición de xilol una vez más. Luego se adicionó 1 ml de etanol al 100% a cada microtubo, se agitó la mezcla por 10 minutos y se centrifugo, se procedió a retirar el sobrenadante de cada microtubo y se repitió la adición de etanol una vez más. Para concluir se dejó evaporar el etanol colocando los microtubos con la tapa abierta en el termobloque a 55°C por 10 minutos.

2.3.1.3 Protocolo de desparafinación C.

Protocolo tomado del trabajo de estandarización de un método para la extracción de ADN a partir de muestras clínicas parafinadas, realizado por el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones (FCEQyN - UNaM), Argentina (Tiscornia, *et al.* 2012).

De cada muestra parafinada se utilizaron 5 a 10 cortes de 10 µm (aproximadamente 30 mg) por cada microtubo, los tejidos fueron desparafinados a través de inmersión en 1 ml de xileno a 55°C por 30 minutos, luego se procedió a lavar y centrifugar cada muestra con etanol en concentraciones decrecientes (100%, 95% y 70%), finalmente se adiciono agua destilada hasta observar un tejido transparente.

2.3.1.4 Protocolo de desparafinación D.

Protocolo tomado del trabajo de evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas, realizado en el periodo 2002-2007 por los departamentos de patología y microbiología de la Universidad del Valle, Cali, Colombia (Bustamante, *et al.* 2011).

Se utilizaron 8 a 10 cortes de 10 μm de cada muestra parafinada, se adicionó 800 μL de xilol por microtubo y se mezclaron por inversión manual durante 5 min. Después se agregaron 400 μL de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezclaron 1 minuto y luego se llevaron a centrifugación por 2 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se repitió la adición del xilol y etanol en conjunto y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se adicionó 1 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente y se continuó centrifugando por 2 min a 13000 rpm, el sobrenadante se descartó una vez más, se repitió la adición de etanol y se incubó los microtubos en el termobloque a 55 °C durante 10 min para secar el tejido totalmente.

2.3.2 Extracción de ADN.

La extracción del ADN a partir del tejido se llevó a cabo con un protocolo de dos días de duración, el primer día se realiza el corte de los bloques de parafina y el proceso de desparafinación del tejido. En el segundo día se procede con la extracción del ADN con el protocolo para tejidos parafinados del kit comercial Invitrogen FFPE TISSUE LYSATE, basado en la unión selectiva de ADN a una membrana a base de sílica, a través del paso por una serie de columnas de centrifugación en presencia de sales caotrópicas, recomendado por el fabricante.

2.4 Evaluación de la concentración y pureza del ADN

Una vez extraído el ADN del tejido embebido en parafina, se procedió a evaluar la concentración y pureza del material genético utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 200c-Thermo scientific. Esto se realizó mediante la medición de su densidad óptica 260/280 - 260/230 nm, en la que sus valores determinan la presencia o ausencia de contaminantes como proteínas, fenoles y otros dados durante el proceso de la extracción.

2.5 Determinación y genotipificación del HPV por PCR tiempo real

La determinación de los genotipos del HPV, se realizó mediante PCR tiempo real, para la cual se utilizó el kit comercial AmpliSens®HPV HCR genotype-FRT PCR. Esta es una prueba in vitro de amplificación del ácido nucleico para la detección cualitativa y diferenciación de genotipos de alto riesgo cancerígeno del HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), a partir de material clínico (raspaduras cervical y uretral) mediante detección de hibridación por fluorescencia de los productos amplificados (Ecoli, 2013).

La prueba se basa en la PCR simultánea (PCR- multiplex) y detección en tiempo real de tres tipos de HPV y el gen de β -globina, que se utiliza como control interno, en un solo tubo. El análisis de los 12 tipos de HPV se lleva a cabo en cuatro tubos. Cada tipo de HPV está

registrado en su propio canal, que permite no sólo detectar, sino también diferenciar el genotipo del virus. El ADN diana seleccionado como control interno es un fragmento de genoma humano que siempre debe estar presente en la muestra, permitiendo valorar no sólo las etapas de control de la PCR (aislamiento del ADN y rendimiento de la PCR), sino también la calidad del material.

El análisis de los resultados obtenidos, se basó en la detección del ciclo umbral o threshold cycle (Ct), el cual es el primer incremento de fluorescencia que sobrepasa la línea base, umbral o threshold, siendo la cantidad del producto de PCR con el cual se partió al inicio de la reacción. Este es inversamente proporcional a la cantidad del producto de amplificación, mientras mayor es el producto menor es el Ct, mientras menor es el producto mayor es el Ct. Teniendo esto en cuenta se consideró una muestra como positiva para algún genotipo con un Ct menor o igual a 35 ciclos, según las especificaciones del kit.

2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron mediante estadística descriptiva, tanto para la valoración de los diferentes protocolos planteados en la estandarización de la técnica de extracción de ADN, así como para analizar los resultados de genotipificación del HPV, en el que se realizaron tablas de datos con frecuencias y porcentajes correspondientes.

CAPÍTULO III

3 Resultados y discusión

3.1 Recolección de las muestras

Se analizaron un total de 175 muestras correspondientes al año 2012 con diagnóstico histopatológico de NIC I, NIC II, NIC III y cáncer cervical, de las cuales 65 cumplieron con todos los criterios de inclusión, el resto fueron excluidas del estudio porque provenían de bloques en mal estado y/o no presentaban un área de superficie de tejido representativo para la extracción del material genético.

En la tabla 3 se muestran los diagnósticos histopatológicos que presentaron las 65 muestras analizadas, determinando que el más relevante fue el cáncer de cérvix (n=21) con un 32%.

Tabla 3. Diagnósticos histopatológicos de las muestras analizadas.

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NIC I	18	28%
NIC II	12	18%
NIC III	14	22%
CÁNCER	21	32%
TOTAL	65	100%

Elaboración: Sotomayor, S. (2014)

3.2 Desparafinación y extracción de ADN

Para la selección del protocolo de desparafinación se tomó en cuenta parámetros como la concentración y la calidad del ADN final. Los valores de referencia para material genético de buena calidad, según especificaciones del equipo son de 1.8-2.0 y 2.0-2.2 para las relaciones 260/280 - 260/230, respectivamente.

La tabla 4 muestra los valores obtenidos en cada uno de los protocolos de desparafinación evaluados, determinando que con el método B se obtuvo ADN en mayor concentración y relativamente menos contaminado; por lo tanto, todas las muestras que formaron parte del estudio se procesaron con este protocolo.

Tabla 4. Evaluación de protocolos de desparafinación.

PROTOCOLOS	MUESTRAS	CONCENTRACIÓN (ng/uL)	260/280	260/230
A	1	11.9	1.63	0.59
	2	7.0	1.68	0.48
	3	17.5	1.70	0.87
B	1	37.8	1.80	1.40
	2	9.6	1.70	0.83
	3	59.3	1.88	1.94
C	1	8.2	1.62	0.71
	2	6.5	1.69	0.59
	3	6.6	2.01	0.59
D	1	18.3	1.77	1.34
	2	6.7	1.74	0.76
	3	15.6	1.79	1.21

Elaboración: Sotomayor, S. (2014)

A pesar que la pureza de las muestras obtenidas con el protocolo B no es la óptima, es el método con el cual se obtuvo mayor concentración de ADN. Esto es frecuente cuando se trabaja con muestras parafinadas, y concuerda con lo descrito por Zafra, *et al.* 2004, quienes mencionan que aunque los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina tienen gran valor en el diagnóstico histopatológico al preservar su arquitectura, la extracción de los ácidos nucleicos generalmente se reduce a recuperar ADN degradado, limitando los análisis moleculares. Esto se debe a múltiples factores, como el tipo de tejido, hipoxia antes de la excisión, agente fijador (naturaleza, concentración, temperatura, pH), tipo y tiempo de almacenamiento, método de desparafinación y extracción del material genético (Jiménez, *et al.* 2007; Bustamante, *et al.* 2011).

3.3 Control interno positivo y detección de HPV

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis por PCR-tiempo real, el cual revela que de las 65 muestras incluidas en el estudio, 45 muestras (69%) amplificaron el control interno de β -globina. Las muestras restantes se excluyen de análisis de resultados ya que no cumplen con este parámetro de calidad de la prueba. Asimismo, se determinó la presencia del HPV en el 82% (n=37) de las muestras válidas para el estudio.

Tabla 5. Amplificación del control interno β -globina y detección de HPV.

CONTROL INTERNO	FRECUENCIA %	DETECCIÓN DE HPV	FRECUENCIA %
β -globina positiva	45 (69%)	Muestras positivas	37 (82%)
		Muestras negativas	8 (18%)
β -globina negativa	20 (31%)		
TOTAL MUESTRAS	65 (100%)		

Elaboración: Sotomayor, S. (2014)

Los resultados revelan que un 31% de las muestras no cumple los criterios de calidad requeridos para una determinación confiable. El control interno positivo empleado en este caso es el gen de β -globina humana. Este gen constitutivo de cualquier célula actúa como un marcador de amplificación, permitiendo verificar presencia de inhibidores o ausencia de ADN proveniente de extractos celulares.

En general las muestras incluidas en parafina constituyen muestras complicadas para ser sometidas a amplificación mediante PCR, puesto que su ADN se encuentra frecuentemente fragmentado en tamaños menores a 200 pares de bases, por todos los procesos que conlleva este tipo de material, tanto en el momento de la fijación y la remoción de la parafina como en la posterior extracción y purificación del ADN (Murase, *et al.* 2000; Srinivasan, *et al.* 2002; Zafra, *et al.* 2004). Al evaluar los protocolos de desparafinación, se puede evidenciar las duras condiciones a las que es sometido el material genético, condiciones que inevitablemente afectan su calidad final.

3.4 Grado histopatológico de lesión y presencia de HPV

Una vez establecidas las muestras válidas para el estudio (n=45), se determinó la presencia de HPV según el grado histopatológico de lesión. La tabla 6 muestra los resultados de este análisis expresados en porcentaje, donde se observa que el tipo de lesión con mayor número de muestras positivas es el cáncer de cérvix con 31% (n=14).

Tabla 6. Diagnósticos histopatológicos y presencia de HPV.

TIPO DE LESIÓN	MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS NEGATIVAS	TOTAL
NIC I	6(13%)	4(9%)	10(22%)
NIC II	7(16%)	2(4.5%)	9(20.5%)
NIC III	10(22%)	0(0%)	10(22%)
CANCER	14(31%)	2(4.5%)	16(35.5%)
TOTAL	37(82%)	8(18%)	45(100%)

Elaboración: Sotomayor, S. (2014)

3.5 Genotipificación del HPV por PCR tiempo real

De las muestras positivas para HPV se pudo establecer que los genotipos más frecuentes fueron HPV-16 (21%), 18(20%) y 31(10%) (Tabla 7).

Tabla 7. Determinación de los genotipos de HPV por PCR tiempo real.

GENOTIPOS ALTO RIESGO	CASOS	PORCENTAJE
16	15	21%
18	14	20%
31	7	10%
33	3	4%
35	4	6%
39	4	6%
45	1	1%
51	5	7%
52	5	7%
56	5	7%
58	5	7%
59	3	4%
TOTAL	71	100%

Elaboración: Sotomayor, S. (2014)

Los resultados obtenidos en este trabajo, revelan que los genotipos más frecuentes fueron el HPV-16 y 18, datos que concuerdan con los resultados preliminares de un estudio sobre genotipificación del HPV realizado por el departamento de ciencias de la salud de la UTPL en asociación con SOLCA núcleo Loja, donde se analizaron 454 muestras de raspado cervical del periodo 2012-2013 y se determinó que los genotipos 16 y 18 fueron los más prevalentes con un 40% y 39%.

Estos resultados están en concordancia con los publicados a nivel mundial, en los que se reporta a los tipos 16 y 18 como los principales responsables del desarrollo de cáncer cervical (Smith, *et al.* 2007; Khan, *et al.* 2005; Clifford, *et al.* 2003).

Los reportes a nivel nacional también muestran al HPV-16 como el más frecuente en los diferentes estudios realizados en las ciudades de: Guayaquil (tipos: 16, 18, 39, 52, 53, 66) (Feng, *et al.* 2010); Santa Elena (tipos: 16, 52, 58,59) (Brown, *et al.* 2009); Cuenca (tipos: 16, 52, 43, 56, 68) (Picón, *et al.* 2006); Quito (tipos: 16, 81, 31, 53, 56, 58) (Tornesello, *et al.* 2008). Sin embargo, el HPV-18 encontrado en este trabajo como el segundo tipo más frecuente, solo concuerda con los datos reportados en la ciudad de Guayaquil. La frecuencia de los otros tipos virales fue variable en cada ciudad, revelando que no hay una prevalencia específica del resto de genotipos en las poblaciones evaluadas de las regiones costa (Guayaquil, Santa Elena) y sierra (Quito, Cuenca y Loja). Las variaciones en la prevalencia de los diferentes genotipos de HPV, podrían explicarse debido a la interacción compleja que existe entre los diferentes genotipos y factores inmunogenéticos de los individuos de cada población (Clifford *et al.* 2005).

En un metaanálisis realizado por Smit *et al.* 2007 se indica que la prevalencia global del HPV en cáncer cervicouterino en poblaciones de África, América, Asia, Europa y Oceanía es del 87%, y el HPV 16 es el más frecuente, con un porcentaje que va desde el 52% en Asia a un 56% en Europa. El segundo tipo más frecuente es el 18, con un 13 al 22% en Centro - Sudamérica y Norteamérica, respectivamente. La prevalencia de los tipos 16 y 18 alcanza el 70% de forma general, con variaciones desde el 65% en Centro - Sudamérica al 76% en Norteamérica. Los siguientes tipos virales más frecuentes en cáncer cérvico uterino fueron los mismos en todos los continentes (31, 33, 35, 45, 52 y 58), aunque su importancia relativa difiere un tanto por continente. Los genotipos 58 y 52 mostraron una prevalencia mayor en los casos de cáncer cervicouterino en poblaciones de Asia respecto del resto de continentes.

Finalmente, los datos obtenidos en este trabajo se presentan en relación a los diferentes trabajos expuestos en los que se menciona a los genotipos 16 y 18 como causantes de cerca del 70% de todas las lesiones precursoras y los cánceres cervicales a nivel mundial, con pocas variaciones regionales, y siendo los más agresivos con desarrollo de lesiones más tempranas y de mucho mayor riesgo que otros tipos oncogénicos (khan, *et al.* 2005; Almonte, *et al.* 2010).

La demostración de la variación regional en las proporciones de los genotipos virales, especialmente de los tipos 16 y 18, sugiere que la efectividad de las vacunas contra estos genotipos, presenta algún grado de variación según la población (Clifford *et al.* 2005).

3.6 Grado de lesión y genotipos de HPV

La frecuencia de genotipos encontrados por tipo de lesión se indica en la tabla 8. Los datos se muestran como frecuencias y porcentajes n(%) de los casos encontrados.

Tabla 8. Genotipos de HPV presentes por tipo de lesión.

TIPO DE LESIÓN	GENOTIPOS												TOTAL
	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	
NIC I	1(9%)	2(19%)	0(0%)	0(0%)	2(18%)	1(9%)	0(0%)	1(9%)	1(9%)	2(18%)	0(0%)	1(9%)	11(100%)
NIC II	2(18%)	3(25%)	1(8%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(8%)	1(8%)	1(8%)	2(17%)	1(8%)	12(100%)
NIC III	5(28%)	1(6%)	1(6%)	2(11%)	1(6%)	2(11%)	1(6%)	1(6%)	1(5%)	1(5%)	1(5%)	1(5%)	18(100%)
CANCER	7(23%)	8(27%)	5(17%)	1(3%)	1(3%)	1(3%)	0(0%)	2(7%)	2(7%)	1(3%)	2(7%)	0(0%)	30(100%)
TOTAL	15(21%)	14(20%)	7(10%)	3(4%)	4(6%)	4(6%)	1(1%)	5(7%)	5(7%)	5(7%)	5(7%)	3(4%)	71(100%)

Elaboración: Sotomayor, S. (2014)

En los datos obtenidos se puede observar la presencia mayoritaria de los genotipos 16 y 18 en cada una de las diferentes lesiones precancerosas y cáncer cervical. Como se ha mencionado anteriormente las infecciones causadas por estos tipos de HPV, preferentemente, tienden a progresar a cáncer cervical debido a su potencial oncogénico (Smith, *et al.* 2007; khan, *et al.* 2005).

3.7 Coinfecciones presentes en las muestras analizadas

En este trabajo se determinó la presencia de coinfecciones con 2, 3 y hasta 4 genotipos de HPV. El porcentaje de coinfección con 2 genotipos fue del 59% constituyendo la mayoría, seguido de coinfección con 3 genotipos 27% y con 4 genotipos 14%, respectivamente.

En la tabla 9 se detalla las combinaciones de los genotipos con respecto al tipo de lesión en el que fueron encontrados.

Tabla 9. Combinaciones de genotipos de HPV relacionados con el tipo de lesión.

COINFECCIONES CON 2 GENOTIPOS			COINFECCIONES CON 3 GENOTIPOS			COINFECCIONES CON 4 GENOTIPOS		
Tipo de lesión	Genotipos	casos	Tipo de lesión	Genotipos	casos	Tipo de lesión	Genotipos	Casos
NIC I	35, 56	1	NIC I	16, 35, 56	1	NIC III	18, 31, 51, 52	1
NIC I	18, 59	1	NIC II	16, 18, 58	1	CANCER	16, 18, 31, 58	1
NIC I	51, 52	1	NIC III	45, 59, 33	1	CANCER	16, 18, 51, 52	1
NIC II	51, 52	1	CANCER	16, 51, 52	1			
NIC II	18, 31	1	CANCER	18, 31, 39	1			
NIC II	18, 59	1	CANCER	16, 18, 31	1			
NIC III	35, 56	1						
NIC III	16, 39	1						
NIC III	16, 58	1						
CANCER	18, 33	1						
CANCER	18, 31	2						
CANCER	35, 56	1						
	TOTAL	13		TOTAL	6		TOTAL	3

Elaboración: Sotomayor, S. (2014)

Según la literatura la presencia de coinfecciones no aumenta el riesgo de desarrollar cáncer (Herrero, *et al.* 2000; Giorgi Rossi, *et al.* 2011), apoyándose en la idea de que el cáncer cervical es el resultado de la expansión clonal de una célula infectada con un solo tipo de HPV (Ho, *et al.* 1998). Sin embargo, se ha demostrado que el riesgo de adquirir una posterior infección por HPV se acrecienta en pacientes ya infectadas con un tipo viral, especialmente, si esta infección es por un genotipo de alto riesgo. Estas coinfecciones no necesariamente tendrían una relación filogenética, sino más bien podrían ser el resultado de la deficiencia del sistema inmunológico, lo que facilita la persistencia del virus en el sitio de la infección (Rousseau, *et al.* 2003).

En este trabajo los tipos HPV-16 y 18 se encontraron asociados con la presencia de casi cualquier otro tipo viral (tabla 9), lo que coincide con reportes previos, donde las pacientes infectadas con estos dos tipos virales tienen un mayor riesgo de contraer una infección subsiguiente con otro genotipo (Rousseau, *et al.* 2001; Méndez, *et al.* 2005).

En un estudio realizado por De Villiers, *et al.* 2004 se encontró que las coinfecciones se presentaban no solo con genotipos clasificados dentro del mismo grupo filogenético, sino con genotipos pertenecientes a diferentes grupos A7 (HPV-18, 39, 45, 59, 68) y A9 (HPV-16, 33, 35, 52, 58); según Méndez, *et al.* 2005 existe una mayor predisposición de coinfecciones con genotipos de HPV pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos, situación que se muestra parcialmente en este trabajo, ya que también se identificaron coinfecciones entre virus del mismo grupo filogenético.

No se observó una combinación de genotipos específica asociada a determinada lesión, lo que ha sido indicado anteriormente en un estudio de Thomas, *et al.* 2000 quienes mencionan que no existe una asociación o frecuencia predeterminada entre genotipos, ni tampoco mayor probabilidad de encontrar combinaciones de ciertos genotipos juntos en lesiones específicas.

3.8 Edad de detección del HPV y el desarrollo de cáncer cervical

Las 45 muestras que formaron parte del estudio corresponden a pacientes con una edad comprendida entre los 20 y 83 años, con una media de 46,68 años.

Se determinó que la edad más frecuente en que se detectó la presencia del virus fue entre los 30-49 años con un porcentaje del 38%. Si consideramos únicamente los casos de cáncer cervical, los rangos de edad en los que se encontró la mayoría de casos fueron entre los 50-59 y 70-83 años.

Tabla 10. Detección del HPV y el desarrollo de cáncer cervical en relación a la edad de la paciente.

HPV EN TODOS LOS TIPOS DE LESION (NIC I, NIC II, NIC II, CANCER)							HPV EN CANCER	
EDAD	POSITIVO	%	NEGATIVO	%	TOTAL	%	CASOS	%
20-29	6	13%	1	2.25%	7	16%	0	0%
30-39	8	18%	1	2.25%	9	20%	3	7%
40-49	9	20%	6	13.5%	15	33%	1	2%
50-59	6	13%	0	0%	6	13%	4	9%
60-69	3	7%	0	0%	3	7%	2	4%
70-83	5	11%	0	0%	5	11%	4	9%
TOTAL	37	82%	8	18%	45	100%	14	31%

Elaboración: Sotomayor, S. (2014)

La edad es un factor de riesgo importante involucrado en esta patología, según López y Lizano, 2006 establecen que la infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas de 18 a 30 años de edad. Después de los 30 años decrece la prevalencia. El cáncer cervical es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer. En este estudio se encontró algo similar, la mayor frecuencia de infección se encontró en mujeres de 30 a 49 años, y la mayor presencia de cáncer se detectó en personas de edad avanzada.

La mayoría de estudios respecto al desarrollo de cáncer cervical muestran edades tardías debido al tiempo que tarda en progresar la lesión inicial hasta carcinoma. Ojeda, 2010 señala que a partir de los 50 años vuelven a aumentar las infecciones por el HPV, lo que coincide con la menopausia y con los cambios del switch hormonal. La explicación reside en que los HPV tienen dentro de su genoma una región LCR que a pesar de ser una secuencia que no codifica para proteínas virales, es una secuencia blanco para receptores de estrógeno, que al ser reconocidos, promueve el aumento de la transcripción de los oncogenes E6 y E7, desencadenando la reactivación de infecciones y progresión al cáncer.

En Ecuador según el INEC, tomando como fuente el anuario de egresos hospitalarios del 2011, se reporta una mayor incidencia de cáncer cervical en pacientes de entre 31 a 64 años, con el aumento de casos de cáncer en edades tardías, sin embargo, para las lesiones precancerosas los rangos de edad son más difusos y lastimosamente no existe información bibliográfica en el país para comparar estos datos.

Los resultados de este trabajo muestran a los genotipos HPV 16 y 18 como los más frecuentes en la población analizada, genotipos de alto riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino. Conociendo que el cáncer cervicouterino es una causa importante de muerte en mujeres ecuatorianas, estudios de este tipo son de gran ayuda ya que brindan información sobre los genotipos presentes en nuestra población; información que es vital para establecer políticas de prevención y control de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- Tras la aplicación de protocolos preliminares de extracción de ADN, se concluyó que el protocolo B basado en la desparafinación con xileno más etanol y posterior extracción de ADN con el kit comercial invitrogen, resultó ser el más eficiente para obtener el material genético a partir de muestras parafinadas y ser utilizado en PCR tiempo real; sin embargo, desventajas importantes como tiempo de procesamiento, toxicidad de reactivos deben ser considerados.
- La amplificación de un control interno, en este caso β -globina es indispensable para validar los resultados. La no determinación del control interno puede deberse al daño causado en el ADN por condiciones propias del proceso de fijación-parafinación-almacenamiento a los que han sido sometidos los tejidos, aspectos que se encuentran fuera del control del investigador.
- Los tipos de HPV más frecuentes en lesiones precancerosas y cáncer cervical fueron HPV- 16 y 18 los que se encuentran en total concordancia con la literatura a nivel mundial.
- Se presentaron coinfecciones, estas incluyeron muestras con 2, 3 y 4 genotipos diferentes en una misma lesión. No se detectó ninguna relación entre combinaciones específicas de virus y tipo de lesión, pero se destaca la presencia de los genotipos 16 y 18 en la mayoría de las combinaciones virales.
- La mayor parte de las infecciones por HPV se presentaron entre los 30-49 años de edad, y el desarrollo de cáncer cervical a edades posteriores de 50-59 y 70-83 años.
- Finalmente, la técnica molecular utilizada en este estudio mostró ser eficaz para lograr la identificación y genotipificación de HPV en tejido cervical parafinado, gracias a su alta sensibilidad y especificidad.

RECOMENDACIONES

- Una vez determinados los genotipos de alto riesgo de mayor prevalencia en lesiones precancerosas y cáncer cervical (HPV-16 y 18), sería beneficioso seguir con el tamizaje a través de estudios prospectivos a largo plazo para obtener datos reales de los genotipos circulantes en la población; además, dejando planteada la posibilidad de analizar otros tipos de muestras como cáncer de ano, vagina, pene y orofaringe, causados también por la infección de este virus. La información que brindan los estudios de este tipo son de gran importancia en el desarrollo de programas de prevención y tratamiento dirigidos a la población.

BIBLIOGRAFÍA

- ACS. American Cancer Society. Virus del papiloma humano (VPH), cáncer, pruebas y vacunas del VPH: preguntas frecuentes - Virus del papiloma humano (VPH). Datos publicados en el 2012. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002781-pdf.pdf>
- Almonte, M., Murillo, R., Sánchez, G., Jerónimo, J., Salmerón, J., Ferreccio, C., Lazcano, E., Herrero R. (2010). Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Salud Publica Mex*, 52:544-559.
- Alonso P., & Lazcano E. (2005). *Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, Prevención y Control*. Editorial Médica Panamericana. México.
- Alzola, R. (2001). *Curso de Histología, embriología y teratogenia*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Biológicas. Buenos Aires – Argentina.
- BC. BioCancer. Gen del Retinoblastoma. Datos publicados en el 2013. <http://www.biocancer.com/journal/596/31-gen-del-retinoblastoma>
- Bernard, H. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *ELSEVIER Journal of Clinical Virology*, 32:1-6.
- Bernstein, J., Thompson, W., Casey, G., Dicioccio, R., Whittemore, A., Diep, A., Thakore, S., Vaziri, S., Xue, S., Haile, R. (2002). Comparison of techniques for the successful detection of brca1 mutations in fixed paraffin-embedded tissue. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 11:809–814.
- Bosch, F., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. & Shah, K. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol*, 55:244–265.
- Brown, C., Leon, M., Muñoz, K., Fagioni, A., Amador, L., Frain, B., Tu, W., Qadadri, B., Brown, D. (2009). Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a private cancer screening clinic. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42:629-636.

- Bustamante, J., Astudillo, M., Pazos, A., Bravo, L. (2011). Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta biol. Colomb*, 16(2):83–98.
- Butz, K., & Hoppe-Seyler, F. (1993). Transcriptional Control of Human Papillomavirus (HPV). *Oncogene Expression: Composition of the HPV Type 18 Upstream Regulatory Region. Journal of Virology*, 67:6476-6486.
- Chan, J. (2007). Impact of the human papilloma vaccine on cervical cancer. *J Clin Oncol*, 25(20):2975-2982.
- Chavez, E. (2007). El papel de la colposcopia, citología e histología en el diagnóstico de cáncer de cérvix. *Revista de Posgrado de la VIa Catedra de Medicina*. N° 175.
- Cisterna, R., & Gobernado, M. (2005). Infección por Virus del Papiloma Humano. *Asociación de Microbiología y Salud*. Bilbao–España.
- Clifford, G., Smith, J., Aguado, T., Franceschi S. (2003). Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 89:101-105.
- Clifford, G., Rana, R., Franceschi, S., Smith, J., Gough, G., Pimenta J. (2005). Human Papillomavirus Genotype Distribution in Low-Grade Cervical Lesions: Comparison by Geographic Region and with Cervical Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(5):1157-1164.
- Consuegra, C., Molina, D., Egea, E., & Garavito, G. (2004). El virus del papiloma humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)*, 19:3-13.
- Coombs, N., Gough, A., Primrose, J., (1999). Optimization of DNA and RNA extraction form archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*, 27(16):12-14.
- De Guglielmo, Z., & Rodríguez, A. (2010). Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano. *An. Sist. Sanit. Navar*, 33(1):71-77.

- De Villiers, E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H., zur Hausen, H. (2004). Classification of Papillomaviruses. *Virology*, 324:17-27.
- Dzul, K., Puerto, M., González, M. (2004) Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Rev Biomed*, 15:233-241.
- E. Ecoli. PCR Diagnostics. Eu. AmpliSens®HPV HCR genotype-FRT PCR kit. Datos publicados en el 2013. <http://www.pcrdiagnostics.eu/en/Products/HPV-Infections.alej>
- Evans, MF., & Cooper, K. (2004). Human papillomavirus integration: detection by in situ hybridization and potential clinical application. *J. Pathol*, 202(1):1- 4.
- Feng, Q., Cherne, S., Winer, R., Popov, V., Zambrano, H., Yerovi, C., Hawes, S., Koutsky, L., Kiviat, N. (2010). Evaluation of Transported Dry And Wet Cervical Exfoliated Samples for Detection of Human Papillomavirus Infection. *J Clin Microbiol*, 48(9):3068-3072.
- Fleider, L., & Tatti, S. (2008). Infección por HPV y su relación con el Cáncer de Cuello Uterino. Ministerio de Salud Pública Argentina.
- Garrido, H., & Yunga, E. (2010). Incidencia del Cáncer en Loja. Estudio de una Década. SOLCA núcleo de Loja. Imprenta UTPL.
- Giorgi Rossi, P., Chini, F., Bisanzi, S., Burroni, E., Carillo, G., Lattanzi, A., Angeloni, C., Scalisi, A., Macis, R., Pini, M., Capparucci, P., Guasticchi, G., Carozzi, F. (2011). Distribution of high and low risk HPV types by cytological status: a population based study from Italy. *Infectious Agents and Cancer*, 6:2-9.
- GLOBOCAN 2012–WHO. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Datos publicados en el 2014. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- GMC. Gyne Medi Corp. Corporación Médica Gineco–Obstétrica. H.P.V. (CONDILOMATOSIS o VERRUGAS GENITALES). Datos publicados en el 2013. http://www.gynemedicorp.com/gynemedicorp/index.php?option=com_content&view=article&id=89&Itemid=34

- Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M., Hutchinson, M., Morales, J., Balmaceda, L., Greenberg, M., Alfaro, M., Burk, R., Wacholder, S., Plummer, M., Schiffman, M. (2000). Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia in Rural Costa Rica. *Journal of the National Cancer Institute*, 92:464-474.
- Ho, G., Kadish, A., Burk, R., Basu, J., Palan, P., Mikhail, M., Romney, S. (1998). HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia. *Int. J. Cancer*, 78:281–285.
- INEC. Instituto nacional de estadísticas y censos. 2012. Ecuador. Estadísticas de Nacimientos y Defunciones-2012. Datos publicados en 2014. <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/nacimientos-y-defunciones-2012/>
- Jiménez, G., Villalobos, M., Jiménez, E., Palma, W. (2007). Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 10-19.
- Khan, M., Castle, P., Lorincz, A., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D., Rush, B., Glass, A., Schiffman, M. (2005). The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(14):1072–1079.
- Kjaer, S., Tran, T., Sparen, P., Tryggvadottir, L., Munk, C., Dasbach, E., Liaw, K., Nygard, J., Nygard, M. (2007). The burden of genital warts: A study of nearly 70,000 women from the general female population in the 4 nordic countries. *J Infect Dis*, 196:1447-1454.
- Krämer, A., Kretzschma, M., & Krickberg, K. (2010). *Modern Infectious Disease Epidemiology*. Londres: Springer.
- López, A., & Lizano, M. (2006). Cáncer cérvicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La historia que nunca termina. *Cancerología, UNAM - INCan México D.F.*, 31-55.

- Mahy, B., & Marc, R. (2010). Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. Elsevier. España.
- Maldonado, E. (2002). Biología Molecular en Medicina. Editorial Limusa. México.
- Malloy, C., Sherris, J., & Herdman, C. (2000). HPV DNA Testing: Technical and Programmatic Issues for Cervical Cancer Prevention in Low - Resource Settings. Path, 2-29.
- McCance, D. (2009). Papillomaviruses. En A. Zuckerman, J. Banatvala, & P. Griffiths, Principles and practice of clinical virology (págs. 807-822). Singapore: Wiley- Blackwell.
- ME. Médicos Ecuador. artículos para médicos y pacientes. La Nueva Medicina: ¿La Ginecología Molecular?. Datos publicados en el 2013. http://www.medicosecuador.com/espanol/articulos_medicos/nueva_medicina_ginecologia_molecular.htm
- Méndez, F., Muñoz, N., Posso, H., Molano, M., Moreno, V., van den Brule, A., Ronderos, M., Meijer, C., Muñoz, A. (2005). Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types and Possible Implications for the Prevention of Cervical Cancer by HPV Vaccines. The Journal of Infectious Diseases, 192:1158–1165.
- Mies, C. (1996). Molecular Biological Analysis of Paraffin-Embedded Tissues. Human Pathology, 25(6):555-560.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., Berrington, A., & Guissmann, L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. ELSEVIER Vaccine, 24S3:1–10.
- Murase, T., Inagaki, H., Eimoto, T. (2000). Influence of Histochemical and Immunohistochemical Stains on Polymerase Chain Reaction. Modern Pathology, 13(2):147-151.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). Microbiología Médica. Elsevier. Madrid.
- Ojeda, J. (2010). Virus papiloma humano: de la biología a la clínica. Medwave, 7:1-9.

- Picón, G., Neira, H., Sánchez, I., Campoverde A., Cordero L., Ugalde, J. (2006). Detección del ADN del Virus del Papiloma Humano mediante PCR en pacientes con citología de ASC-US. Instituto del Cáncer SOLCA-Cuenca durante los años 2005-2006. *Revista Oncología*, 16:155-158.
- QIAGEN. (2013). The digene HPV test. Tipos de HPV de alto y bajo riesgo. Datos publicados en el 2013. <http://es.thehpvtest.com/about-hpv/high-and-low-risk-hpv-types/>
- Rodríguez, M., García, F., Ruiz, J. (2008). Virus del papiloma humano: situación actual, vacunas y perspectivas de su utilización. Consejería de Salud. Andalucía, 50.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. Editorial Médica Panamericana. México.
- Rousseau, M., Pereira, J., Prado, J., Villa, L., Rohan, T., Franco, E. (2001). Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 184:1508–1517.
- Rousseau, M., Abrahamowicz, M., Villa, L., Costa, M., Rohan, T., Franco, E. (2003). Predictors of Cervical Coinfection with Multiple Human Papillomavirus Types. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12:1029-1037.
- Saslow, D., et al. (2007). American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. *CA Cancer J Clin*, 57(1):7-28.
- Sellors, J., & Sankaranarayanan, R. (2003). *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual*. Lyon: IARC Press.
- Silva, R., León, D., Brebi, P., Ili, C., Roa, J., Sánchez, R. (2013). Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Infectología al Día. Rev Chilena Infectol*, 30(2):186-192.
- SL. StatLab. Medical Products. Fixation. Datos publicados en el 2013. <http://www.statlab.com/technical-prodecures/histology/fixation>

- Smith, J., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer R., Clifford G. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int. J. Cancer*, 121:621–632.
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S. (2002). Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *American Journal of Pathology*, 161(6):1961-1971.
- Steben, M., & Duarte-Franco, E. (2007). Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology*, 107:S2-S5.
- Thomas, K., Hughes, J., Kuypers, J., Kiviat, N., Lee, S., Adam, D., Koutsky, L. (2000). Concurrent and Sequential Acquisition of Different Genital Human Papillomavirus Types. *The Journal of Infectious Diseases*, 182:1097–1102.
- Tiscornia, M., Cubilla, M., Lorenzati, M., Cariaga, A., Zapata, P. (2012). Estandarización de un método para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas parafinadas. *Rev. Cienc. Technol*, 53-57.
- Tornesello, M., Buonaguro, L., Izzo, S., Lopez, G., Vega, X., Maldonado, C., Buonaguro, F. (2008). A Pilot Study on the Distribution of Human Papillomavirus Genotypes and HPV-16 Variants in Cervical Neoplastic Lesions From Ecuadorian Women. *Journal of Medical Virology*, 80:1959-1965.
- Vaca, D. (2012). Tesis: “Identificación del virus de papiloma humano mediante PCR-RFLP y posterior genotipificación en muestras de tejido cervical parafinado, con diagnóstico histopatológico de displasia severa o cáncer in situ, procedentes del hospital de SOLCA núcleo Quito”. Quito, Ecuador: Escuela politécnica del ejército.
- Varela, S., (2005). Citología cervical. *Rev Med Hondur*, 73:131-136.
- Vilata, J. (2001). Infección por el virus de papiloma humano (VPH). *Elsevier*, 44:289-32.
- Villalobos, M. (2006). Implementación de un protocolo de extracción de ADN a partir de Biopsias Humanas y determinación de su calidad para PCR. Cartago. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

- Von Knebel M. (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*, 38:2229-2242.
- Zafra, G., Flórez, O., Gonzáles, C. (2004). Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo. *Salud UIS*, 36:73-79.