



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Determinación del virus del papiloma humano en muestras de cáncer de
las regiones anogenital y orofaríngea procedentes del hospital SOLCA
Núcleo de Loja**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Martínez Bravo, Johana Teddy

DIRECTOR: Arévalo Jaramillo, Ana Paulina Mg.

LOJA- ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACION

Mg.

Ana Paulina Arévalo Jaramillo

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración.-

El presente trabajo de titulación: **“Determinación del virus del papiloma humano en muestras de cáncer de las regiones anogenital y orofaríngea procedentes del hospital SOLCA Núcleo de Loja”** realizado por Martínez Bravo Johana Teddy, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre del 2015

f).....
Mg. Ana Paulina Arévalo Jaramillo

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Martínez Bravo Johana Teddy declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **“Determinación del virus del papiloma humano en muestras de cáncer de las regiones anogenital y orofaríngea procedentes del hospital SOLCA Núcleo de Loja”** de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Mg. Ana Paulina Arévalo Jaramillo directora del presente trabajo; 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. 88 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).....

Martínez Bravo Johana Teddy

C.I. 1104729916

DEDICATORIA

El presente trabajo lo Dedico principalmente a Dios por guiarme en este largo camino, por regalarme salud y fortaleza en momentos difíciles

Con mucho amor y cariño a mis queridos padres Luz Angélica y Rodrigo quienes han sido el pilar fundamental en mi vida, apoyándome siempre para culminar mi carrera, brindándome su amor, confianza, consejos y ayuda para levantarme y no decaer en situaciones arduas haciendo de mí una mejor persona

A mis hermanos Rodrigo, Mary y Cristinita pequeños ángeles, que llegaron a mi vida y le pusieron esa chispa, que solo los hermanos saben cómo hacerlo, llenando siempre con sonrisas mi corazón

AGRADECIMIENTOS

Gracias mi Dios querido por siempre estar junto a mi iluminándome y bendiciéndome en cada paso, dándome la fortaleza necesaria para levantarme luego de cada caída, permitiéndome así cumplir mi meta trazada

A mis amados padres, hermanos y familiares gracias por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas y estar siempre presente en mi vida, por su confianza puesta en mi

Un agradecimiento especial y de todo corazón a Paulina Arévalo y Paola Dalgo por impartirme sus conocimientos, llenos de paciencia y entrega en el desarrollo de mi tesis. A Santiago Sotomayor gracias por compartir conmigo sus sapiencias y ayudarme de forma desinteresada en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio Tatiana y Kevin que siempre estuvieron prestos en colaborar para la realización de mi tesis

A la doctora Martha Murillo y el departamento de Histopatología humana del hospital Solca núcleo de Loja infinitas gracias por su paciencia y hacer posible que mi proyecto se lleve de la mejor manera

A mis hermanas de corazón llamadas amigas: Nathy, Andrea y Diana gracias por estar presentes en los momentos difíciles y de felicidad, su apoyo incondicional permitió que mi formación se engrandezca no solo intelectual sino también espiritual.

INDICE DE CONTENIDOS

| CONTENIDOS | PÁGINA |
|---|--------|
| PORTADA | 11 |
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACION | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS | iii |
| DEDICATORIA | iv |
| AGRADECIMIENTOS | v |
| ABREVIATURAS | x |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRAC | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| CAPITULO I MARCO TEÓRICO | 6 |
| 1.1 Cáncer anogenital..... | 7 |
| 1.1.1 Factores de riesgo..... | 8 |
| 1.2 Cáncer orofaríngeo..... | 8 |
| 1.2.1 Factores de riesgo..... | 9 |
| 1.3 Generalidades VPH..... | 10 |
| 1.4. Estructura..... | 10 |
| 1.4.1. Región temprana E (Early). | 10 |
| 1.4.2 Región Tardía L (Late)..... | 11 |
| 1.4.3 Región larga de control LCR (Long Control Region). | 11 |
| 1.5 Clasificación del virus del papiloma humano | 12 |
| 1.5.1 Virus Papiloma Humano de Bajo Riesgo | 12 |
| 1.5.2 Virus Papiloma Humano de Alto Riesgo y boca | 12 |
| 1.6 Patogenia de la infección y del desarrollo de cáncer | 13 |
| 1.8.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)..... | 16 |

| | |
|--|-----------|
| 1.8.2 Captura de híbridos 2 (CH2)..... | 16 |
| 1.8.3 Hibridación in situ (HIS) | 16 |
| 1.9 Tipos de muestras para la detección de VPH | 16 |
| 1.9.1 Muestras de Tejidos Parafinados..... | 17 |
| 1.9.1.1 Proceso de Inclusión en parafina. | 17 |
| 1.9.1.2 Fijación. | 17 |
| 1.9.1.3 Inclusión. | 17 |
| 1.10 Prevención de la infección..... | 18 |
| 1.10.1 Vacunas. | 18 |
| CAPITULO II METODOLOGÍA..... | 20 |
| 2.1 Muestras | 21 |
| 2.2 Cortes de Bloques de Parafina | 21 |
| 2.3 Desparafinación..... | 21 |
| 2.4 Extracción de ADN | 22 |
| 2.5 Detección y genotipificación del VPH..... | 22 |
| 2.6 Análisis estadístico..... | 22 |
| CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION..... | 23 |
| 3.1 Muestras | 24 |
| 3.2 Extracción de ADN | 24 |
| 3.3 Genotipificación de VPH..... | 25 |
| CONCLUSIONES..... | 30 |
| RECOMENDACIONES..... | 31 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 32 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Virus del papiloma humano | 11 |
| Figura 2 Patogénesis de la infección por VPH | 14 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Tipos de VPH y su correlación clínica | 13 |
| Tabla 2 Características Generales de las muestras analizadas..... | 24 |
| Tabla 3 Detección de VPH en muestras de las regiones anogenital y orofaríngea..... | 26 |
| Tabla 4 Genotipificación de VPH | 27 |

ABREVIATURAS

CAB: Condiloma Acuminado Bucal

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés Centers for Disease Control and Prevention).

CVADS: Cáncer Escamoso de las Vías Aerodigestivas Superiores

HEF: Hiperplasia Epitelial Focal

HIS: hibridación in situ

HLA: Antígeno Leucocitario Humano (por sus siglas en inglés Human Leukocyte antigen)

NIA: Neoplasia Intraepitelial

OPSCC: Carcinoma de Células Escamosas de la Orofaringe

PB: Papiloma Bucal

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés polymerase chain reaction)

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

VLPs: Partículas no infecciosas similares al virus (por sus siglas en inglés Virus like particle)

VPH: Virus del Papiloma Humano

VVB: Verruga Vulgar Bucal

RESUMEN

Las infecciones de transmisión sexual continúan en incremento en todo el mundo, representando un serio problema en términos de salud, económicos y sociales. La infección por virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo. La infección por el VPH se ha asociado con lesiones epiteliales hiperplásicas, papilomatosas y carcinomas verrugosos en la piel y en diferentes tipos de mucosas, incluyendo el tracto anogenital, uretra, mucosas traqueobronquial y nasal, laringe y la cavidad bucal. El contagio se produce por contacto directo con la piel o las mucosas infectadas. En este trabajo se analizaron mediante PCR en tiempo real 40 muestras de tejidos parafinados de las regiones orofaríngea y anogenital, procedentes del banco de tumores del hospital SOLCA núcleo de Loja del año 2010 hasta 2013. Se encontró que el 38,9% de las muestras válidas presentaron VPH, siendo los genotipos más predominantes el VPH 16 y el VPH 58 con un 29% y 17 % respectivamente.

Palabras clave: virus del papiloma humano, genotipo

ABSTRAC

Sexually transmitted infections continue to increase worldwide, representing a serious problem, in health, economic, and social terms. Infection with human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted disease in the world. HPV infection is associated with hyperplastic epithelial lesions, papillary carcinoma, and warty skin and different types of mucous membranes, including the anogenital tract, urethra, tracheobronchial, and nasal mucous membranes, larynx and oral cavity. The disease is produced by direct contact with infected skin or mucous membranes. In the present study, 40 paraffin tissue samples from anogenital and oropharyngeal region were analyzed by real-time PCR. Samples were collected from tumor bank hospital SOLCA core of Loja, between 2010 to 2013. Results demonstrated that 38.9% of valid samples had HPV, the most prevalent genotypes HPV 16 and HPV 58 with 29% and 17% respectively.

Keywords: human papilloma virus, genotype

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de transmisión sexual continúan en incremento en todo el mundo, representando un serio problema, tanto en términos de salud como económicos y sociales. Su control es decisivo para mejorar la salud reproductiva de toda la población y constituye uno de los grandes desafíos actuales. Entre estas infecciones, las verrugas genitales o condilomas son probablemente las de mayor incidencia. Un aumento notable durante la última década las ubica entre las enfermedades virales más frecuentes transmitidas sexualmente (Blanco, *et al.* 2011).

La infección por virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo (Guzmán, *et al.* 2008). La infección por el VPH se ha asociado con lesiones epiteliales hiperplásicas, papilomatosas y carcinomas verrugosos en la piel y en diferentes tipos de mucosas, incluyendo el tracto anogenital, uretra, mucosas traqueobronquial y nasal, laringe y la cavidad bucal (Venegas, *et al.* 2011).

El VPH afecta a hombres y mujeres por igual, sin embargo en hombres principalmente se ha asociado a lesiones como verrugas anogenitales y a neoplasias intraepiteliales de pene y ano (Silva, *et al.* 2013).

La transmisión de los VPH es diversa: puede ocurrir en el periodo perinatal y más adelante en la vida, por contacto sexual. La infección puede adquirirse en diferentes etapas de la vida, ya que se ha demostrado la presencia de este virus en 6% de la población infantil, 13% de los adolescentes y en el 23% de la población adulta (García, González & Granados, 2009).

Este agente viral es el causante de la mayor cantidad de cánceres de piel y mucosas, pues se reporta en más del 90% de los casos de cáncer cervicouterino y en más del 50% de los cánceres anogenital y orofaríngeo. La infección oral por VPH se asocia con el comportamiento sexual y la prevalencia aumenta con el número de parejas sexuales orales (D'Souza, *et al.* 2014)

La incidencia de carcinoma de células escamosas orofaríngeo (OPSCC) está aumentando a un ritmo alarmante. Se estima que en Estados Unidos se diagnostican aproximadamente 14.410 casos nuevos y 2.540 pacientes fallecieron por la enfermedad en el 2014 (Sansoni & Gross, 2015). Hasta 60% de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas y el pronóstico de

supervivencia oscila entre 10 y 40% a 5 años, dependiendo del sitio específico y su resecabilidad (García, *et al.* 2009).

El coito no es la única vía de transmisión; incluso besar podría ser una posible vía para la transmisión del VPH. Algunos investigadores consideran que el sexo oral puede ser la principal vía de infección oral por VPH (Seifi, *et al.* 2013).

El cáncer anal es relativamente raro, sin embargo su incidencia ha aumentado en los últimos años. Se estima que cada año se diagnostican en Estados Unidos alrededor de 3.000 casos nuevos de cáncer anal asociado al VPH en mujeres y unos 1.700 en hombres (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2015). Varios factores de riesgo están asociados con el desarrollo de cáncer anal, incluyendo la edad mayor de 50 años, la dieta baja en fibra, fístulas anales crónicas, múltiples parejas sexuales, practicar el coito anal, la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la inmunosupresión. Sin embargo, la presencia del virus del papiloma humano representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer anal. La infección por VPH está asociada con la mayoría de los tumores anales, sobre todo con los carcinomas de células escamosas (Aguilar, *et al.* 2014).

Con base en los datos del 2006 al 2010 según la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) en los Estados Unidos se han presentado cerca de 33.200 cánceres asociados al VPH por año. De estos cerca de 20.600 casos en mujeres y 12.600 en hombres. En promedio anual se registran 1.549 casos de cáncer de ano en hombres y 2.821 casos en mujeres; 1.048 casos de cáncer de pene; 12.417 casos de cáncer de la región orofaríngea con 9.974 casos en hombres y 2.443 en mujeres; y 735 casos de cáncer de vagina y 3.168 de vulva. De estos casos de cáncer el VPH es responsable del 91% de casos de cáncer anal, del 72% de casos cáncer orofaríngeo, y del 63%, 75% y 69% de casos de los cánceres de pene, vagina y vulva, respectivamente (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2015).

En Ecuador, según la Sociedad de Patología del Tracto Genital Inferior y Colposcopia del Guayas durante el 2012, en la población masculina se registraron 72 casos de cáncer de pene, la incidencia de verrugas anogenitales se estima entre 100 y 500 casos por cada 100.000 habitantes a nivel nacional (Sociedad De Patología Del Tracto Genital Inferior Y Colposcopia Del Guayas. 2013). Según la Sociedad Ecuatoriana de Infectología, de los 948 casos de tumores orofaríngeos registrados durante el año 2012, entre el 75 y 80% son a causa de VPH.

Según datos estadísticos del hospital SOLCA Núcleo de Loja durante el periodo 2010 al 2014 se reportaron 40 casos de cáncer en la región anogenital y 24 en la región orofaríngea.

Conociendo la importancia que el virus del papiloma humano presenta como factor asociado al cáncer de las regiones anogenital y orofaríngea, se plantea el presente trabajo con el objetivo de determinar y genotipificar los tipos de VPH en muestras de tejido parafinado previamente diagnosticadas como cancerosas durante el periodo 2010 – 2013 del banco de tumores del Hospital de SOLCA núcleo de Loja. La información proporcionada por esta investigación será de gran valor para el desarrollo de métodos o estrategias de prevención, o incluso tratamiento de estas alteraciones, así como para la toma de conciencia del valor de nuestra salud, reduciendo así las tasas de mortalidad.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

La infección por el virus de papiloma humano VPH, es una enfermedad de transmisión sexual que en función del tipo viral contraído y situación inmunológica del paciente, ocasiona lesiones que pueden variar desde verrugas benignas a nivel de vagina, piel de la región ano-perineal, pene, mucosa oral u oro-faringe (Vaca, 2012).

La infección por VPH en el hombre es muy común y puede afectar tanto la piel como las mucosas (oral y genital). En la piel son causantes de las afecciones comúnmente conocidas como verrugas y en el tracto anogenital causa lesiones benignas como el condiloma acuminado, pero también otras como el cáncer. El contagio se produce por contacto directo con la piel o las mucosas infectadas (Marín, *et al.* 2005).

1.1 Cáncer anogenital.

El cáncer anal es relativamente raro, representa alrededor de 30.000 nuevos casos al año en todo el mundo. Representa aproximadamente 2-3% de los tumores colorrectales, sin embargo, su incidencia ha aumentado en los últimos años. En los EE.UU. se ha reportado 1,6 casos / 100.000 habitantes en el período de 2002 hasta 2006 (Tayla, *et al.* 2014).

El carcinoma epidermoide de ano por lo general se presenta como un tumor vegetante de esta región, que se acompaña de hemorragia y dolor; incluso lesiones pequeñas pueden producir síntomas locales intensos, por lo que su identificación temprana debería ser relativamente sencilla (Rodríguez, *et al.* 2006).

Clínicamente puede expresarse como un síndrome anal presentando prurito, mucorrea, ano húmedo, secreción, tumoración anal, deformación del bolo fecal y dificultad para evacuar (Pollastri, *et al.* 2009 y Guindic, 2010).

El cáncer anal puede presentarse en dos localizaciones anatómicas: el conducto anal en 85% de los pacientes y el margen anal en 15% de los casos (Rodríguez, *et al.* 2006). Los tumores localizados en el conducto anal pueden ser queratinizados o no queratinizados; ambos tipos de tumores tienen una evolución biológica y pronóstico similares (Guindic, 2010).

Se ha observado que el riesgo de padecer cáncer anal es mayor en la población infectada con VIH, de tal manera que este tipo de neoplasia constituye un buen modelo de estudio de la contribución de la inmunodeficiencia en el desarrollo de neoplasia (Rodríguez, *et al.* 2006).

1.1.1 Factores de riesgo.

Se observa una incidencia aumentada del cáncer de ano en pacientes con afecciones inflamatorias de esa zona, tales como el condiloma acuminado, fisura anal crónica, enfermedad de Crohn, sífilis anal, etc. La falta de higiene, la irritación crónica y la promiscuidad sexual tienen una relación directa con las neoplasias del ano, vulva y cuello del útero (Pollastri, *et al.* 2009), aunque también destaca la infección del VPH, y las relaciones sexuales anorreceptivas (Guindic, 2010).

La práctica constante de sexo anal al parecer contribuye a una mayor frecuencia de lesiones anales y también representa uno de los factores principales para la adquisición del VIH y la coinfección por el VPH, los factores de riesgo importantes para la neoplasia intraepitelial anal (NIA), considerada la lesión precursora de carcinoma escamoso anal. Se cree que el VIH es un cofactor que el VPH necesita para inducir neoplasias que puede progresar a carcinoma anal (Tayla, *et al.* 2014).

Las infecciones por VPH pueden ser asintomáticas y producir proliferaciones benignas o estar asociadas con neoplasias malignas o premalignas (Beltrán, *et al.* 2009). Los estudios epidemiológicos han demostrado que aproximadamente el 85% de los cánceres anales están asociados con la infección por el VPH, los tipos de VPH predominantes son el VPH-16 y VPH-18 (Gami B., Kubba F., & Ziprin P. 2014).

1.2 Cáncer orofaríngeo.

El cáncer escamoso de las vías aerodigestivas superiores (CVADS), aunque es relativamente raro, se trata de una entidad importante debido a que su pronóstico es malo y las secuelas del tratamiento suelen ser devastadoras. Hasta un 60% de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas y el pronóstico de supervivencia oscila entre 10 y 40% a 5 años (García, *et al.* 2009). La presencia del VPH en la cavidad oral, ha sido asociada a dos grandes grupos de lesiones: benignas y lesiones premalignas y malignas. Entre las lesiones bucales benignas más

frecuentemente reportadas se incluyen: el papiloma bucal (PB), la verruga vulgar bucal (VVB), el condiloma acuminado bucal (CAB) y la hiperplasia epitelial focal (HEF) o también llamada enfermedad de Heck. Las lesiones premalignas y malignas incluyen la leucoplasia y el carcinoma espinocelular (Vanegas, *et al.* 2011).

La importancia de la infección por VPH en la carcinogénesis oral está basada en la capacidad del virus de inmortalizar los queratinocitos orales, lo cual incluye la inactivación de las proteínas supresoras de tumores preformados por las oncoproteínas virales o el bloqueo de la transcripción de genes supresores de tumor como resultado de la inserción del oncogén de VPH o también por la estimulación de la transcripción de oncogenes celulares por la inserción de secuencias activadoras de transcripción derivadas de VPH (Venegas, *et al.* 2011).

1.2.1 Factores de riesgo.

El consumo de alcohol, principalmente cerveza, destilados y el tabaquismo, son factores significativos en la génesis del cáncer de la cavidad oral (Gallegos, *et al.* 2007). Se incluyen también una temprana edad de iniciación sexual, un alto número de parejas sexuales y el sexo oral (Wierzbika, *et al.* 2013). El 85% de los casos de cáncer de cabeza y cuello está ligado al consumo de tabaco (Cancer.Net, 2012).

El estudio publicado en *la revista JAMA*, dio seguimiento a la observación de que había una asociación entre la prevalencia del virus y el número de cigarrillos fumados por día por un individuo. Los investigadores encontraron que el VPH 16 fue más prevalente entre los participantes. El número de casos de cáncer de boca y garganta ha aumentado en un 225% en los Estados Unidos en los últimos 2 años. Para el estudio, los investigadores examinaron 6.887 participantes del National Health and Nutrition Examination, una muestra nacional representativa de la población estadounidense. De los 6.887 sujetos, 2.012 (28,6%) eran consumidores de tabaco y 63 (1,0%) eran conocidos por estar infectado con VPH 16.

El virus fue más frecuente en los participantes que eran consumidores de tabaco (2,0%), en comparación con los antiguos usuarios o aquellos que nunca habían consumido tabaco (0,6%). Por cada incremento en el nivel de cotinina en la sangre que era equivalente a fumar tres cigarrillos al día, la probabilidad de la infección por VPH 16 también aumentó en un 31%. Del mismo modo, con cada aumento en el nivel de NNAL (4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-

butanol), en la orina que era equivalente a fumar cuatro cigarrillos al día, las posibilidades de que la prevalencia del VPH 16 aumentaron en un 68%.

Una limitación del estudio es que es incapaz de dar una explicación causal de la asociación entre el tabaco y el VPH 16 oral. La exposición al tabaco aumenta la probabilidad de tener infección por VPH 16 oral, y aunque todavía no se sabe por qué, se sospecha que el VPH en fumadores no se puede eliminar del cuerpo con la misma facilidad que en las personas no fumadoras (McIntosh, 2014).

1.3 Generalidades VPH:

1.4. Estructura.

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Son virus de tamaño pequeño, no encapsulados, con estructura icosaédrica, con genoma de doble cadena de ADN circular (Jaled, *et al.* 2010), formada por 7200-8000 pares de bases aproximadamente, que mide unos 50 nm de diámetro (García, *et al.* 2009).

Los papilomavirus tipo 16 y 18 son los más prevalentes de los VPH oncogénicos, siendo el primero responsable de más de la mitad de los tumores, y el segundo involucrado en el 20% de los mismos (Lizano, *et al.* 2009).

El genoma de los VPH está dividido en dos largos dominios y cada uno de ellos contiene una serie de marcos de lectura abierta (MLA) (Limongi, 2003).

El genoma viral se divide en tres regiones: temprana, tardía y región larga de control

1.4.1. Región temprana E (Early).

Codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular (García, *et al.* 2009). Las oncoproteínas E6 y E7 se destacan por su participación en el desarrollo de los procesos malignos. La proteína E6 posee la capacidad de formar un complejo con el gen p53, evitando el reparo del defecto genético y la muerte celular programada (apoptosis). La proteína E7 se une a las proteínas ribosomales, regulando igualmente la síntesis del ADN (Venegas, *et al.* 2011).

1.4.2 Región Tardía L (Late).

La región tardía comprende alrededor del 40% del genoma viral y contiene dos marcos de lectura abiertos, esenciales para la replicación viral productiva. L1 codifica para la proteína principal de la cápside; es un gen altamente conservado en los virus Papiloma de distintas especies y entre los distintos tipos de VPH, razón por la cual es uno de los blancos preferidos para el diagnóstico molecular. L2 codifica para la proteína menor de la cápside y muestra marcadas diferencias aun entre los tipos que infectan a una misma especie (Piconi, 2013).

1.4.3 Región larga de control LCR (Long Control Region).

Representa el 15% del genoma viral y contiene el origen de la replicación, algunas secuencias promotoras, estimuladoras y represoras de la expresión de genes y de la replicación del ADN (Piconi, 2013).

Es importante señalar que la información genética se encuentra codificada en una sola de las cadenas de ADN, debido a que los genes tienen una sola orientación transcripcional (García, *et al.* 2009).

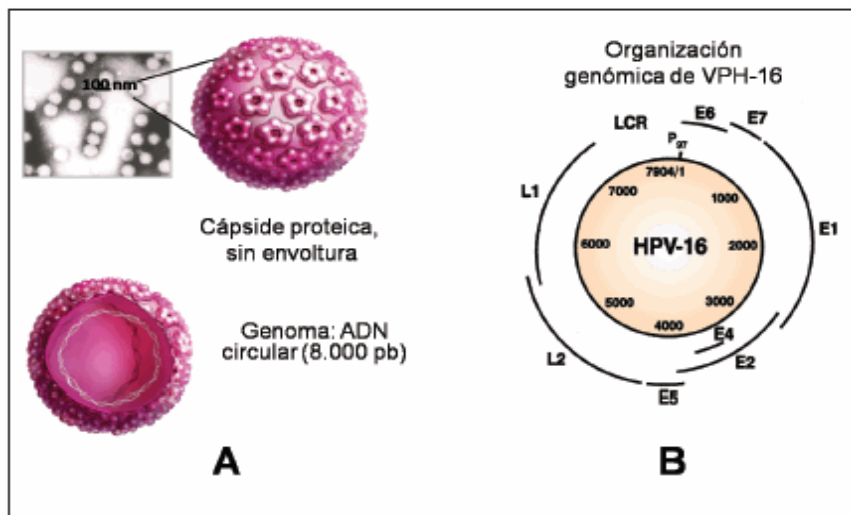


Figura 1. Virus del papiloma humano. (A: partículas de VPH
B:representación esquemática de VPH 16)

Fuente: Piconi, 2013

1.5 Clasificación del virus del papiloma humano.

Se divide en dos grandes grupos, dependiendo del riesgo que tiene de provocar lesiones cancerígenas.

1.5.1 Virus Papiloma Humano de Bajo Riesgo: Son aquellos virus cuyo riesgo de producir cáncer es bajo; está conformado por el VPH 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57. Incluye a los virus que producen lesiones verrugosas genitales (condilomas acuminados) (Palma, 2006).

1.5.2 Virus Papiloma Humano de Alto Riesgo: En este grupo están los virus que tienen alto riesgo de producir cáncer, se incluyen en este grupo al VPH 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58. Es importante mencionar que el VPH 16 y 18 son los que con mayor frecuencia se vinculan al cáncer de cuello uterino; pene, ano y boca (Palma, 2006 y Lizano, *et al.* 2009).

A continuación en el cuadro 1 se presentan más detallados los diferentes tipos de VPH y su correlación clínica, con lesiones no cancerosas y asociados a malignidad

Tabla 1. Tipos de VPH y su correlación clínica

| Tipos de VPH | Lesiones clínicas asociadas |
|---|---|
| 1 | Verrugas plantares y palmares |
| 2,4,7,26,27,29,41,46,60,63 | Verrugas vulgares |
| 3,10,28 | Verrugas planas |
| 9,12,15,19,21,22,23,24,25,37,4 6,49,50 | Lesiones de la epidermodisplasia verruciforme |
| 5,8,14,17,20,36,38,41,47,48 | Lesiones de la epidermodisplasia verruciforme |

| | |
|--|--|
| 13,32 | Lesiones de la mucosa oral |
| 6,11,13,32,34,40,42,43,44,53,54, ,55,57,59,61,62,64,67,68,69,70, 71,72,73,74 | Verrugas de la mucosa anogenital Condiloma acuminado |
| 16,18,30,31,33,35,39,45,51,52, 56,58,66,69 (asociados a malignidad) | Verrugas de la mucosa anogenital Carcinoma cervical Cáncer anogenital Papulosis bowenoide |

Fuente: Palma, 2006

1.6 Patogenia de la infección y del desarrollo de cáncer.

El periodo de incubación es variable, puede extenderse desde los 2 a 3 meses, hasta incluso los 15-20 años (Palma, 2006); aunque otros autores establecen que dicho período oscila entre 6 semanas y 8 meses (Ball, 1998).

El VPH infecta al huésped mediante su implantación directa a través del epitelio. El virus inicialmente infecta las células basales con 1 a 2 copias de ADN viral por célula epitelial. Las células basales infectadas experimentan un retardo en su diferenciación y se dividen lateralmente produciendo un clon de células basales infectadas. Durante la fase proliferativa de la célula basal, la replicación del ADN viral está restringida y coordinada con la división celular normal (periodo de latencia). Este modo de infección garantiza que una célula originalmente infectada produzca toda una población clonal de células infectadas en la superficie de la lesión en desarrollo (Ball, 1998).

La expresión de genes tardíos, proteínas estructurales y síntesis de ADN vegetativo está restringida a las células en diferenciación terminal, lo cual implica una relación entre la diferenciación celular y la expresión de genes virales. La expresión del genoma de los VPH es

compleja debido a que existen múltiples promotores (al menos 7) o patrones de corte alternativo (Lizano, *et al.* 2009).

Algunos datos sugieren que el VPH 16 persiste en promedio mucho más tiempo infectando el epitelio en comparación con otros tipos de VPH, de tal manera que aquellas lesiones que presentan VPH 16 podrían progresar a un cáncer más rápidamente que aquellas que no presentan VPH o tienen otro tipo viral (Lizano, *et al.* 2009).

Si bien la presencia de VPH de alto riesgo es un determinante para el desarrollo de las lesiones escamosas intraepiteliales y cáncer, su sola presencia podría ser insuficiente, numerosos estudios han enfocado su atención sobre los cofactores y los factores del huésped que incrementan el riesgo de las infecciones por VPH y las lesiones asociadas (Marín, *et al.* 2005).

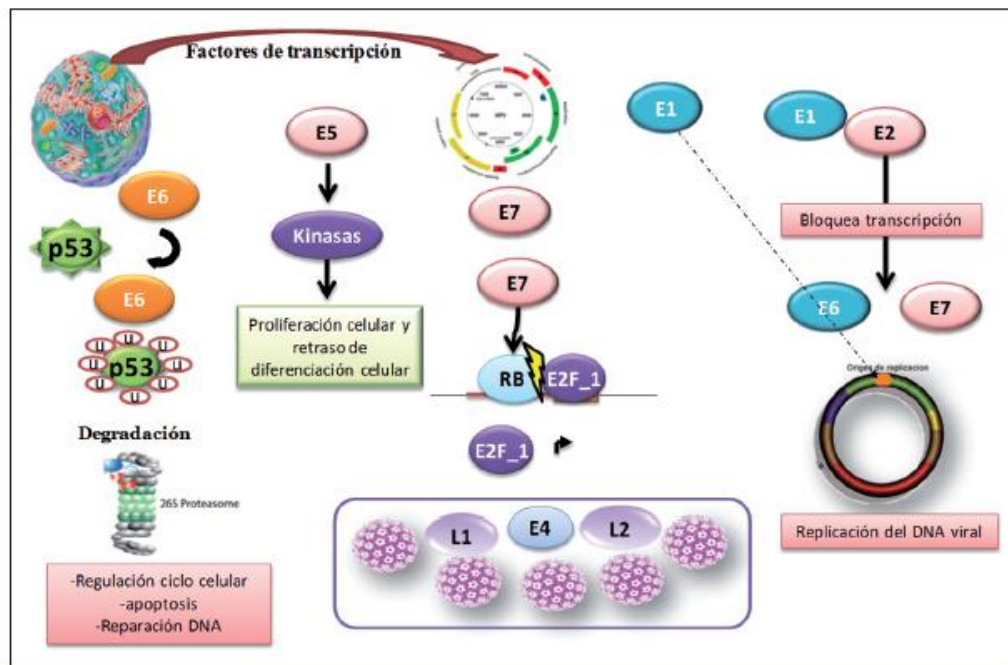


Figura 2. Patogénesis de la infección por VPH

Patogénesis de la infección por VPH. Acciones de las distintas proteínas codificadas por VPH. Oncoproteínas de la región temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7); Oncoproteínas de la región tardía (L1 y L2); proteína retinoblastoma (RB); p53

Fuente: Silva, *et al.* 2013

1.7 Modo de transmisión

Entre las vías de transmisión se mencionan:

- Por contacto sexual, que es la vía más frecuente y la de mayor riesgo.
- Instrumentos médicos inadecuadamente esterilizados (guantes 50%, instrumental de biopsia 37%) y artefactos sexuales contaminados.
- Materno – fetal, las gestantes pueden transmitir el virus al feto en el transcurso del embarazo o durante el parto. Cuando existen lesiones verrugosas en vagina es muy frecuente que se presente papilomatosis laríngea en el niño.
- Autoinoculación de las verrugas vulgares, por contacto directo de la piel con las verrugas (Palma, 2006).

1.8 Detección.

La determinación de la carga viral es algo muy importante ya que existen estudios de correlación entre el porcentaje de la carga viral y el incremento de riesgo para el desarrollo de lesiones. Actualmente no hay consenso sobre el mejor método para cuantificar VPH en muestras biológicas. Uno de los métodos más exactos disponibles es la PCR tiempo real, pero está sujeto a variaciones. Es importante conocer el tipo viral involucrado en una patología dada para arribar a un diagnóstico más preciso, tratamiento y seguimientos adecuados (Medina, *et al.* 2012).

Las investigaciones y los diagnósticos ordinarios han confiado en una o más de tres pruebas basadas en ácido nucleico la detección y tipificación de VPH.

Entre los estudios más difundidos se encuentran:

1.8.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*): es una prueba en donde el ADN blanco se amplifica selectivamente por medios enzimáticos a través de ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación de fragmento precursor y extensión de este. Durante este proceso, la concentración de ADN blanco aumenta de manera exponencial y después de 30 ciclos se producen más de un millón de copias. Su principal ventaja es que permite identificar el tipo específico de VPH (Venegas, *et al.* 2011).

1.8.2 Captura de híbridos 2 (CH2): se basa en la amplificación de señal, de hibridación en solución, *in vitro*, para detectar blancos de ADN o ARN y producir híbridos de ARN-ADN que son más estables que los de ADN-ADN. Puede detectar 13 diferentes tipos de VPH carcinógenos, que representan virtualmente todos los tipos importantes de VPH causantes de cáncer que se conocen en el mundo (Venegas, *et al.* 2011).

1.8.3 Hibridación in situ (HIS): El objetivo de esta técnica es demostrar la presencia de ADN del VPH en los núcleos de las células infectadas representadas en un corte incluido en parafina como es habitual en los estudios histológicos. Es la prueba de elección, pues permite correlacionar la distribución del virus con el tipo de célula, lo que permite controlar si el virus está presente en las células tumorales o en el tejido adyacente normal (Cordero, Maestri, & Gil. 2015). Esta técnica consiste en desnaturalizar el ADN cromosómico por calor (95°C) y posteriormente añadir una solución que contiene la sonda con el ADN o ARN marcado, que hibridará con sus secuencias complementarias (Lleonart, Sánchez, Duque, & Ramón.1997).

1.9 Tipos de muestras para la detección de VPH.

Las muestras obtenidas de uretra y semen son las que presentan menor positividad para la detección de VPH. Las muestras más recurrentes se obtienen mediante la frotación y rotación de tómulas humedecidas en el glande, corona y surco coronal, prepucio (zona interna y externa), eje del pene, uretra, escroto y ano (Silva, *et al.* 2013).

En la cavidad bucal se toma biopsia después de la aplicación de ácido acético al 5 % durante 3 min. y evaluación con magnificación aportada por equipos de colposcopia (De Guglielmo, *et al.* 2012).

Algunos profesionales de la salud recomiendan el exámen Papanicolau (PAP) anal rutinario, la

colección de células de la pared anal para el análisis en el laboratorio, seguido por la visualización directa, o anoscopio, si los resultados son anormales. Otros profesionales de la salud dudan la efectividad del PAP anal y prefieren referir a sus pacientes a un especialista quien hace un examen de visualización directa más sensitivo. De cualquier manera, los expertos del VPH recomiendan exámenes rutinarios para la displasia anal para todos los hombres VIH positivos quienes tienen sexo con hombres y para las mujeres con un historial médico de displasia cervical (Aidsmeds.com, 2015).

1.9.1 Muestras de Tejidos Parafinados.

Los tejidos fijados y embebidos en parafina constituyen un importante material de archivo para la realización de estudios clínicos retrospectivos y, además, representan un recurso invaluable para estudiar la patogenia molecular de las enfermedades y la expresión génica diferencial. (García, *et al.* 2006)

1.9.1.1 Proceso de Inclusión en parafina.

1.9.1.2 Fijación.

Consiste en detener los procesos de destrucción celular o hística, que se producen por las enzimas contenidas en ellos, una vez muerto el organismo o al separarla de él. Este proceso de destrucción celular recibe el nombre de autólisis. El volumen del fijador (formalina o etanol) elegido debe ser de 10 veces el del material (González, 2006 & García, *et al.* 2006).

1.9.1.3 Inclusión.

Se utiliza principalmente para que el material tenga la suficiente firmeza al cortarse. El agua que contiene el tejido se sustituye por una sustancia que le da rigidez y evita que se deforme. Esto se logra introduciendo el material a procesar en alcoholes de gradación creciente, lo que irá sustituyendo el agua por el alcohol. Después el alcohol es sustituido por un solvente orgánico como es el xilol, la acetona, etc., para de esta forma terminar incluyendo el tejido en una sustancia que es miscible en este solvente orgánico (Iglesias, & Rodríguez, s.f). El proceso de inclusión en parafina involucra tres etapas:

Deshidratación: El proceso consiste en el pasaje del material por una serie gradual y ascendente del agente deshidratante. Infiltración: el material se pasa a parafina fundida, cambiándose la misma dos veces a fin de eliminar toda traza de los deshidratantes. Esta etapa del proceso se realiza en estufa a 60°C a fin de mantener la parafina fundida. El tiempo de inclusión en general son dos pasos de 8-10 h cada uno. Inclusión y formación del bloque de parafina: el material es ubicado en cajas confeccionadas de papel encerado, de metal o plásticas especiales para este fin. Se realiza sobre placa caliente a fin de trabajar en parafina fundida. La ubicación correcta del material es el punto clave para el tipo de corte a realizar (González, 2006).

1.10 Prevención de la infección.

1.10.1 Vacunas.

En años recientes se ha logrado progreso hacia el desarrollo de una vacuna profiláctica para el VPH, con el fin de prevenir la infección por este virus y sus asociaciones benignas y displásicas. Se ha llegado a la conclusión de que la neutralización de los epítopes de la cápside es un determinante importante para la protección inmune mediada por anticuerpos contra la infección por papiloma virus. Se basan en la producción de partículas similares al virus, no contienen genes virales, por lo que no pueden causar infección (Limongi, 2003).

Existen 2 tipos de vacunas: Bivalente (Cervarix), para los VPH 16 y 18; el protocolo de administración es 0, 1 y 6 meses. Tetravalente (Gardasil), para los VPH 6, 11, 16 y 18; el protocolo de administración es 0, 2 y 6 meses, la dosis es 0,5 ml por vía intramuscular, indicada para niñas y mujeres entre 9 y 26 años (Limongi, 2003).

Ambas vacunas están compuestas por proteínas L1 de VPH, en forma de partículas no infecciosas similares al virus (VLPs) producidas por tecnología de ADN recombinante. El mecanismo de acción se basa en la capacidad de las VLPs de inducir altos niveles de anticuerpos neutralizantes IgG en medio vaginal. Puesto que las VLPs, no contienen ADN viral, no pueden infectar células, reproducirse o causar enfermedad. (Chan, Aguilar, Soley, & Arguedas. 2008)

En Ecuador como parte de la Estrategia nacional de salud para la prevención del cáncer uterino, el Ministerio de Salud Pública, a través del Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI), vacuna a la población femenina de 9, 10 y 11 años. La vacuna contra el virus del papiloma humano se administra en escuelas públicas y privadas. El tipo de vacuna usada en el país es la Bivalente y actúa sobre los virus 16 y 18 (Elcomercio.com, 2014).

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

Este trabajo es un estudio de tipo observacional

2.1 Muestras

En el presente estudio se analizaron 40 muestras (procedentes de 30 pacientes) de tejido de las regiones anogenital y orofaríngea embebidas en parafina procedentes del banco de tumores de SOLCA núcleo de Loja. Los criterios para la selección de las muestras fueron los siguientes:

- Bloques de parafina en buen estado
- Cantidad de tejido representativo
- Diagnóstico de citología alterado (muestras cancerosas y/o verrugosas)

2.2 Cortes de Bloques de Parafina

Se procedió a colocar los bloques parafinados sobre hielo durante 20 min para facilitar el corte. El espesor de cada corte fue de 10-15 μ m. Los cortes se realizaron en un micrótopo de rotación (AO' ROTARY MICROTOME 820). Se descartó los primeros cortes para evitar posibles contaminaciones. Además, entre cada corte se realizó la limpieza de las cuchillas con detergente y DNA AWAY Decontaminant, evitando así contaminación cruzada.

Se colocó en tubos de 1.5mL estériles 8-10 cortes (según la cantidad de tejido) para realizar la extracción de ADN.

2.3 Desparafinación

A cada tubo que contiene los cortes de tejido se agregó 750 μ L de Xilol y se agita en vórtex por 10 minutos. Se procedió a centrifugar los tubos a 13300rpm durante 9min, para luego eliminar el sobrenadante de cada tubo. Se repitió el paso anterior y posteriormente se adicionó 1mL de etanol al 100%, se agitó por vortex durante 10min y se procedió a centrifugar a 13300rpm durante 9min. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó nuevamente 1mL de etanol al 100%. Se agitó por vortex durante 10min y se procedió a centrifugar a 13300rpm durante 9min, se dejó evaporar los residuos de etanol colocando los microtubos con la tapa abierta en el termobloque a 55°C por 10min.

2.4 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el protocolo de extracción a partir de tejidos paraformados del kit comercial invitrogen FFPE TISSUE LYSATE. El paso de digestión se realizó durante toda la noche a 50°C.

Finalmente se cuantificó el ADN obtenido empleando un espectrófotómetro (Nanodrop 200c Thermo scientific). El análisis de los ratios 260/280-260/230 permite evaluar la calidad de la muestra. La concentración del material genético se expresa en ng/μL.

2.5 Detección y genotipificación del VPH

La determinación de los genotipos de VPH se lo realizo mediante PCR en tiempo real utilizando el kit AmpliSens HPV HCR genotype-FRT (Ecoli). Esta es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la detección cualitativa y diferenciación de los genotipos de alto riesgo cancerígeno del virus del papiloma humano:16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59.

La prueba se basa en una PCR simultánea o PCR multiplex y la detección en tiempo real de tres tipos de HPV y el ADN del gen de la globina como control interno de la presencia o ausencia de ADN. El análisis de 12 tipos de VPH se lleva a cabo en cuatro tubos.

El análisis de los datos obtenidos se basó en la detección del ciclo umbral o threshold cycle (Ct), el mismo es el primer incremento de fluorescencia que sobrepasa la línea base, umbral o threshold. Siendo este inversamente proporcional a la cantidad del producto de amplificación, es decir mientras mayor es el producto amplificado menor es el Ct y mientras menor es el producto amplificado mayor será el Ct. Una muestra se considera positiva para algún genotipo con un Ct menor o igual a 35 ciclos, según las especificaciones de kit.

2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se valoraron mediante estadística descriptiva, los resultados se muestran en tablas que indican frecuencias y porcentajes.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Muestras

Se analizó un total de 40 muestras procedentes de 30 pacientes, las cuales corresponden al periodo 2010-2013 del banco de tumores del hospital SOLCA núcleo de Loja. Las características que presentaron las muestras se mencionan en la tabla 2. El promedio de la edad de los pacientes analizados es de 58 años.

Tabla 2. Características Generales de las muestras analizadas

| Región | Hombres | Mujeres | Diagnóstico de las muestras |
|-------------|---------|---------|--|
| Anogenital | 8 | 0 | Papiloma escamoso Carcinoma verrugoso Carcinoma escamocelular Adenocarcinoma Carcinoma Lesión de ano Papiloma |
| Orofaringea | 10 | 12 | Carcinoma basocelular Papula fibrosa oral Quetitis Papiloma escamoso Lipoma Papilomatosis Hemangioma Neoplasia gingival Leucoplaquia Lesión de lengua |

3.2 Extracción de ADN

En promedio los valores de concentración que se obtuvieron fue 54.3 ng/μL, sin embargo algunas muestras presentaron valores bajos desde 1 ng/μL.

Tomando en cuenta los valores de concentración de ADN y los valores de los cocientes 260/280 y 260/230 se considera que no se obtuvo un ADN de calidad óptima. Este problema se ha reportado frecuentemente en estudios de muestras parafinadas y constituye el principal limitante para análisis moleculares a partir de estas muestras.

Si bien los tejidos fijados y embebidos en parafina constituyen un importante material de archivo para la realización de estudios clínicos retrospectivos, y además representan un recurso invaluable para estudiar la patogenia molecular de las enfermedades, la mayoría de los especímenes procesados en los laboratorios de Patología son rutinariamente fijados en formaldehído y, aunque esto permite conservar la arquitectura del tejido, la extracción de ADN y ARN de calidad adecuada para estudios de biología molecular es un problema significativo en la práctica de la Patología molecular; ya que se ha demostrado que el formaldehído produce entrecruzamiento entre ácidos nucleicos y proteínas, generando problemas en la obtención de material genético de buena calidad, necesario para la aplicación de variadas técnicas moleculares (García, *et al.* 2006).

Los problemas de las amplificaciones cuando se trabaja con ADN extraído a partir de tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina se han reportado en varios estudios, en los cuales se ha asociado este procedimiento con una disminución de los rendimientos y con la incapacidad para amplificar mediante PCR fragmentos de ADN (Tiscornia, Cubilla, Lorenzati, Cariaga, Zapata, P.s.f).

Son múltiples los factores que influyen en la calidad del ADN, entre ellos: tipo de tejido, hipoxia antes de la escisión, agente fijador (naturaleza, concentración, temperatura, pH), tiempo de almacenamiento, y método de desparafinación y extracción de biomoléculas (Bustamante, J., Astudillo, M., Pazos, A., Bravo, L. 2011).

3.3 Detección y Genotipificación de VPH

Como se muestra en la tabla 3 los resultados de la amplificación indican que de las 40 muestras analizadas el 45% amplificaron el control interno β -globina, y el 55% de muestras restantes no, por lo que se excluyeron del análisis ya que no cumplen con este requisito de calidad.

De las 7 muestras positivas para el VPH, 5 muestras (71,4%) corresponden a tejidos de la región orofaríngea, y 2 (28,6%) a la región anogenital.

Tabla 3. Detección de VPH en muestras de las regiones anogenital y orofaríngea

| CONTROL INTERNO | FRECUENCIA (%) | DETECCIÓN VPH | FRECUENCIA (%) |
|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| β-globina positiva | 18 (45%) | Muestras positivas | 7 (38,9%) |
| | | Muestras negativas | 11 (61,1%) |
| β-globina negativa | 22 (55%) | ----- | |
| TOTAL MUESTRAS | 40 (100%) | ----- | |

La β-globina se emplea como control interno de calidad, ya que es un fragmento de genoma humano que siempre está presente en muestras en cantidad suficiente, validando la presencia o ausencia de material genético viral.

Se considera que los tejidos embebidos en parafina resultan ser complicados en el momento de realizar la PCR; más aún cuando han sido almacenados en formaldehído por periodos largos, ya que sufren extenso entrecruzamiento de proteínas tisulares y alteraciones en las bases nitrogenadas, resultando en fragmentación del ADN; la longitud de estos fragmentos disminuye a menos de 300pb cuando las condiciones de tratamiento a las que se han sometido los tejidos no son las mejores. La baja calidad y cantidad de ADN extraído destacan como factores limitantes para la realización de pruebas moleculares a partir de estas muestras (Bustamante, Astudillo, Pazos, & Bravo, 2011).

En la tabla 4 se muestran los genotipos encontrados, destacando los VPH 16 y 58 con las mayores frecuencias. Es necesario mencionar además, que el 71% de los casos positivos

encontrados en este trabajo presentaron coinfección, encontrándose muestras con tres y hasta cinco genotipos diferentes.

Tabla 4. Genotipos de VPH encontrados en muestras de las regiones anogenital y orofaríngea

| GENOTIPOS DE ALTO RIESGO | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| 16 | 6 | 26% |
| 18 | 2 | 8,7% |
| 31 | 2 | 8,7% |
| 33 | 1 | 4,3% |
| 35 | 2 | 8,7% |
| 39 | 0 | 0% |
| 45 | 1 | 4,3% |
| 51 | 2 | 8,7% |
| 52 | 2 | 8,7% |
| 56 | 0 | 0% |
| 58 | 4 | 17,3% |
| 59 | 1 | 4,3% |
| TOTAL | 23 | 100% |

Los resultados obtenidos concuerdan con lo registrado en bibliografía. Tayla, *et al.* (2014) indica que el VPH 16 es el genotipo más frecuentemente asociado con tumores anales, y constituye el principal factor que contribuye a la aparición del carcinoma oral. (Teixeira, Marcucci, Dumas, Xavier dos Santos Ribeiro da Silva, & Cerri, 2011). Medina, (2010), informa que el VPH 16 se

relaciona con el carcinoma de pene en más del 50% de los casos, y contribuye en gran medida a la irritación crónica y el carcinoma *in situ*.

Entre todos los tipos de VPH, el VPH 16 y el VPH 18, son dos de los tipos más frecuentes asociados a cáncer en todo el mundo. Sin embargo, la distribución de estos y otros tipos de VPH varía en diferentes regiones. Zhang, *et al.* (2010) menciona que en Asia, el VPH 58 es el tercer tipo más frecuente relacionado con el desarrollo de cáncer cervical, especialmente en China, donde la prevalencia de VPH 58 es del 7,2%. Según el mismo autor en América del Sur y Oceanía, la prevalencia de VPH 58 en pacientes con lesiones de alto grado es de 8,4% y 10,4%, respectivamente, lo que hace de VPH 58 sea el segundo tipo más frecuente en los pacientes con lesiones de cáncer cervical.

En otro estudio realizado por Torrente, Yeomans, Abud, & Ojeda, (2009) al analizar 24 muestras de tejido embebido en parafina, correspondientes a biopsias de carcinoma escamoso de laringe de pacientes operados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital San Juan de Dios de Chile, encontraron que los genotipos más frecuentes fueron VPH18 (7/24), VPH16 (5/24), VPH54 (2/ 24).

En un estudio realizado en Ecuador, en la provincia del Azuay, usando muestras frescas de cáncer cervical, Calle, Gualpa, & Reinoso, (2015) encontraron los siguientes genotipos con mayor prevalencia, el 66 con un 12,70%, seguido por el 68 con un 11,11%, el 31 y 51 cada uno con el 9,52% y los genotipos 16 y 33 cada uno con el 7,94%.

Se puede establecer que las diferencias geográficas en la prevalencia relativa de los genotipos de VPH pueden estar relacionados con la compleja interacción entre los diferentes genotipos del VPH y / o variantes con factores inmunogenéticos (por ejemplo, los polimorfismos en el sistema HLA). Por otra parte, un estudio reciente mostró que el VPH 16 aparece menos influenciado por el estado inmune que otros genotipos de VPH. Este hecho, junto con el deterioro de la inmunidad celular (por ejemplo, a través de la inflamación cervical crónica, infección parasitaria, la desnutrición, y / o, más recientemente, VIH), puede de alguna manera contribuir a la penetrancia de los demás genotipos de VPH aparte de VPH 16 en algunas poblaciones (Clifford, *et al.* 2005).

Se considera a la edad como un factor de riesgo de importancia en la adquisición del cáncer,

así lo menciona en un estudio Peña, Arredondo, & Vila, (2006); el cual indica que la frecuencia del carcinoma de cavidad bucal es mayor a partir de la sexta década de la vida. Según estadísticas cubanas para las mujeres la aparición es más tardía que para los hombres, es decir de 50-70 años para el hombre y de 60-90 años para la mujer. Menos del 6% de los casos de cáncer aparecen por debajo de los 40 años, y ya en la última década se han comenzado a diagnosticar con mayor frecuencia casos en la tercera y cuarta décadas de la vida. En lo que respecta al cáncer de la región anogenital, la edad media al diagnóstico para el cáncer anal / anorrectal en Estados Unidos desde 2004-2008 fue de 60 años y 65 años de edad, respectivamente (Ahmad Salati & Al Kadi, 2012). En el presente estudio se observó que la mayor prevalencia de cáncer anogenital y orofaríngeo se detectó en pacientes con una media 52 años y 58 años respectivamente, valores similares a los reportados por los autores antes mencionados.

El cáncer de las regiones anogenital y orofaríngea puede aparecer tanto en varones como en mujeres; siendo el cáncer anal más frecuente en las mujeres que en los hombres. Según los datos de la American Cancer Society se estima que en el 2008 aparecieron 5.070 nuevos casos de cáncer anal afectando a 3.050 mujeres y a 2.020 varones (Palefsky, & Rubin, 2009). El cáncer de la región orofaríngea se presenta dos veces más en hombres que en mujeres, según la Sociedad Americana contra el cáncer para los tipos de cáncer orofaríngeo y de cavidad oral en Estados Unidos en el año 2011 se encontraron 34.300 nuevos casos, de los cuales 24.100 corresponden a varones y 10.200 a mujeres (American Cancer Society, 2011).

De las muestras analizadas en este trabajo, el 70% presentaron diagnóstico de cáncer, de este total el 62% corresponde a varones y el 38% a mujeres; del mismo total el 29% corresponden a la región anogenital y el 71% a la región orofaríngea.

Considerando que el virus del papiloma humano es el responsable de la mayor cantidad de cánceres de piel y mucosas, su oportuna detección y diagnóstico permitiría que los pacientes mejoren su calidad de vida. Además la implementación de programas de prevención dirigidos a la comunidad evitaría que más personas lleguen a adquirir el virus y desarrollar dicha enfermedad.

CONCLUSIONES

- El 45% (18) de las muestras analizadas cumplieron con requisitos de calidad para la detección molecular de VPH.
- De las muestras de tejido de las regiones anogenital y orofaríngea analizadas y validadas el 38,9% (7) presentaron el Virus del Papiloma Humano.
- De las muestras positivas para VPH, el 28,6% (2) y 71,4% (5) corresponden a muestras de las regiones anogenital y orofaríngea respectivamente.
- Los genotipos más frecuentes en las muestras analizadas son el VPH 16 y VPH 58.
- Del total de muestras analizadas, la prevalencia de cáncer fue mayor en varones, los cuales representa el 62% del total de casos con cáncer, frente al 38% que representan las mujeres.

RECOMENDACIONES

Las muestras embebidas en parafina, a pesar de ser un material de almacenamiento efectivo, no permiten una adecuada extracción del material genético, por lo que se recomienda analizar muestras en fresco, obteniendo así mejor calidad de material genético y proporcionando mayor información sobre la presencia del virus en la población.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar, M., Bosso, N., Leal, C., De Lira, C., Cabral, L., Silva, A., & Saddi, V. (2014). Clinicopathological aspects and prevalence of human papillomavirus in anal cancer. *Journal Of Coloproctology*. 34(2), 76-82
- Ahmad Salati , S., & Al Kadi, A. (2012). Anal cancer. *International Journal of Health Sciences*. 169-183
- Aidsmeds.com. (2015). Virus Papiloma Humano (Verrugas genitales, displasia y cáncer genital; displasia y cáncer anal). Retrieved 7 June 2015, from http://www.aidsmeds.com/articles/VPH_6803.shtml
- American Cancer Society. (2011). *Cáncer de orofaringe y de cavidad oral*. Retrieved 10 August 2015, from <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/acspc-029106-pdf.pdf>
- Ball, E. (1998). Virus Papiloma Humano. Biología Molecular, Genética y Mecanismo Oncogénico. *Revista Dermatológica Venezolana*.136-141
- Beltrán, B., Huamán, M., Osoreo, F., Palomino, A., Alejandro Yabar, A., Cotrina, E., Gallo, A., López, M. (2009). Papiloma del virus humano de alto riesgo en cáncer de esófago escamoso: estudio clínico patológico retrospectivo durante el período 2003-2006 en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins, EsSalud, Lima, Perú. *Acta Médica de Perú*. 26(2)
- Blanco, O., Soto, Y., Blanco, B., Acosta, S., Capó de Paz, V., Toledo, M. (2011). Detección y tipificación de papilomavirus humano en lesiones condilomatosas anogenitales de hombres cubanos seropositivos al VIH-1. *Revista Biomédica*. 22:21-30
- Bustamante, A., Astudillo, M., Pazos, J., & Bravo, E. (2011). Evaluación de dos métodos de extracción de ADN. *Acta biol. Colomb*, Vol. 16, 83 - 98.
- Calle, F., Guallpa, V. & Reinoso, S. 2015. Prevalencia de los genotipos del papiloma virus humano en muestras cérvico uterinas y su relación con los factores de riesgo en mujeres con vida sexual activa de los cantones gualaceo, paute y chordeleg de la provincia del azuay 2013- 2014. (Título de Licenciatura, Escuela de Tecnología Médica). Recuperado de : <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/21522/1/TESIS.pdf>

- Cancer.Net. (2012). Cáncer oral y orofaríngeo - Factores de riesgo y prevención. Retrieved 5 July 2015, from <http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-oral-y-orofar%C3%ADngeo/factores-de-riesgo-y-prevenci%C3%B3n>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2015). *CDC - Estadísticas sobre el cáncer asociado al VPH*. Cdc.gov. Retrieved 12 July 2015, from <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/hpv/statistics/>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2015). *CDC - Tasas incidencia del cáncer anal asociado al VPH por raza y grupo étnico*. Cdc.gov. Retrieved 4 July 2015, from <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/hpv/statistics/anal.htm>
- Chan, W., Aguilar, L., Soley, C., & Arguedas, A. 2008. Estado actual de la vacuna recombinante contra el virus de papiloma humano. *Acta Médica Costarricense*. Vol. 50
- Cordero, J., Maestri, I., & Gil, R. (2015). Métodos actuales de diagnóstico del cáncer de cuello uterino. *Revista de Ciencias Médicas. La Habana*. 21(1)
- 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):1157–64.
- De Guglielmo, Z., Ávila, M., Veitía, D., Fernandes, A., Venegas, C., Correnti de Plata, M. (2012). Detección de VPH en boca y cérvix de pacientes con diagnóstico citológico sugestivo de infección genital. *An. Sist. Sanit. Navar*. 35 (3): 445-454
- D'Souza, G., Kluz, N., Wentz, A., Youngfellow, R., Griffioen, A., & Stammer, E. et al. (2014). Oral Human Papillomavirus (HPV) Infection among Unvaccinated High-Risk Young Adults. *Cancers*, 1691-1704
- *ElComercio.com*. (2015). Ministerio de Salud cubrirá dos vacunas contra el papiloma Retrieved 10 July 2015, from <http://www.elcomercio.com/tendencias/salud/ministerio-de-salud-cubrira-vacunas.html>
- Gallegos, J., Minauro, G., Apresa, T., Arias, H., Hernández, M., Flores, R., Reséndiz, J., Hernández, D. (2007). Cáncer de lengua y virus papiloma humano (VPH). *Acta Médica*

grupo ángeles. Vol. 5

- Gami, B., Kubba, F., & Ziprin, P. (2014). Human Papilloma Virus and Squamous Cell Carcinoma of the Anus. *Clinical Medicine Insights: Oncology*
- García, C., González, I., & Granados, M. (2009). VPH y los Carcinomas de Cavidad Bucal y Bucofaringe. *Cancerología*, 181-191
- García, P., Benavente, F., Melo, A., Roa, I., & Roa, J. (2006). Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Revista Española de Patología*, 39(3), 175-179. doi:10.1016/s1699-8855(06)70034-4
- González, A. (2006). El uso de la Histología en los sistemas de Cultivo in Vitro de tejidos. Curso de Postgrado. *Fac. Cs. Agrarias*
- Guindic, L., 2010. Cáncer de recto y ano. *Revista de Gastroenterología de México*.133-138
- Guzmán, P., Ili, C., Rifo, R., Briceño, G., Araya, J., Villaseca, M., Roa, J. (2008). Prevalencia de la infección genital por virus papiloma humano en hombres universitarios voluntarios de la IX Región, Chile. *Revista Médica de Chile*. 1381-1389
- Iglesias, B., Rodríguez T. (Sin. fecha). Métodos de estudio en histología
- Jaled, M., & Moreno H. (2010). Virus Papiloma Humano. *Dermatología Argentina*. 102-109
- Limongi, L. (2003). Prevalencia de infección por virus papiloma humano en la cavidad bucal en pacientes pediátricos. Universidad Central de Venezuela Facultad de Odontología
- Lizano, M., Carrillo, A., Contreras, A. (2009) Infección por Virus del papiloma Humano: Epidemiología, historia Natural y Carcinogénesis. *Revista de cancerología Vol. 4*: 205-216
- Leonart, M., Sánchez, R., Duque, P., & Ramón, S. (1997). Técnicas de hibridación, clonación y secuenciación de ácidos nucleicos en el diagnostico anatomopatológico. Departamento de Anatomía Patológica, Clinica Puerta de Hierro Madrid. Vol. 30

- Marín, H., Lucero, R., Schelover, E., Deluca, G., Gorodner, J. (2005). Prevalencia de genotipos de Virus Papiloma Humano (HPV) en población hospitalaria de la ciudad de corrientes. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen M-131
- McIntosh, J. (2014). *Link found between tobacco use and sexually transmitted oral virus. Medical News Today*. Retrieved 12 July 2015, from <http://www.medicalnewstoday.com/articles/283568.php>
- Medina, E., Ibáñez, A., Martínez, R., Barra, R., Quezada, I., Pérez, J., Pérez, R. (2010). Cáncer de pene. Revisión de las características clínico-patológicas. *GAMO*. Vol. 9
- Medina, L., Medina, M., Merino, L. (2012). Valoración diagnóstica de técnicas moleculares para detección de infección bucal por Virus del Papiloma Humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. Vol. 32, 25-30
- Palefsky, J., & Rubin, M. (2009). La epidemiología del virus del papiloma humano anal y de la neoplasia relacionada. *Clínicas Obstétricas y Ginecológicas de Norteamérica*
- Palma, I. (2006). Epidemiología del Virus de Papiloma Humano. *Revista Papeña de Medicina Familiar*, 67-70
- Peña, A., Arredondo, M., & Vila, L. (2006). Comportamiento clínico y epidemiológico del cáncer de cavidad oral. Instituto Superior de Ciencias Médicas "Dr. Carlos Juan Finlay". Hospital Oncológico Provincial Docente "María Curie" Camagüey
- Piconi, M. (2013). Detección De Virus Papiloma Humano en la Prevención del Cáncer Cérvico-Uterino. *Medicina*. 585-596
- Pollastri, E., Morante, S., Naves, A., Pizo, C., Pollastri, M. (2009) Tumores malignos del ano. *Cirugía Digestiva*. 1-10
- Rodríguez, U., Medina R., (2006). Virus del papiloma humano y carcinoma epidermoide anal. *Revista de oncología*. Vol. 73, 51-55
- Sansoni, E., & Gross, N. (2015). The Role of Transoral Robotic Surgery in the Management of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: a Current Review. *Current Oncology Reports*, 17(3). doi:10.1007/s11912-014-0432-y

- Seifi, Sh., Asvadi, I., Dolatkah, R., Asvadi A., Sakhinia, E., Asgarzadeh, M., Dastgiri, S., Ebrahimi, A., Asghari, A., Nadri, M., Touraj Asvadi, T. (2013). Prevalence of Oral Human Papilloma Virus in Healthy Individuals in East Azerbaijan Province of Iran. *Iranian J Publ Health*. 79-85
- Silva, R., León, Brebi, P., Ili, C., Roa, J., & Sánchez, R. (2013). Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Revista Chilena de Infectología*, 186-192
- Sociedad De Patología Del Tracto Genital Inferior Y Colposcopia Del Guayas. (2013). *Revista Científica Colposcopia*. Vol. 4
- Tayla, M., Carelli, N., Bruno, C., Ferreira, C., Alyne, L., Márcio, A., Cordeiro, T., Aparecid, V. (2014). Clinicopathological aspects and prevalence of human papillomavirus in anal cancer. *Journal of Coloproctology*. 76–82
- Teixeira, F., Marcucci, G., Daumas, F., Dos Santos Ribeiro da Silva, C. & Cerri, A. (2011). Aspectos clínicos e histológicos en la queilitis actínica crónica, su relación con el Virus del Papiloma Humano. *Odontoestomatología*. Vol.13
- Tiscornia, M., Cubilla, M., Lorenzati, M., Cariaga, A., Zapata, P. (S.F). Estandarización de un Método para la Extracción de DNA a partir de Muestras Clínicas Parafinadas. Laboratorio de Biotecnología Molecular (BIOTECMOL)
- Torrente, M., Yeomans, L., Abud, M., & Ojeda. J. 2009. Distribución relativa de genotipos de virus papiloma humano en muestras de carcinoma escamoso de laringe. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. Vol. 69. 87-97
- Vaca, D. (2012). Identificación del Virus Papiloma Humano mediante PCR-RFLP y posterior Genotipificación en Muestras de tejido Cervical parafinado, con diagnostico histopatológico. (Tesis de Ingeniería, Escuela Politécnica del Ejército). Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5181/1/T-ESPE-033164.pdf>
- Venegas, C., Hernández, R., Dayan, J., González, M., & Lorenzo, J. (2011). Infección por virus del papiloma humano: asociación entre infección genital y bucal. *Rev Obstet Ginecol Venez*. Vol.71, 164-173.
- Wierzbicka, M., Józefiak, A., Szydłowski, J., Marszałek, A., Stankiewicz, C., Hassman,

E., Osuch, E., Składzień, J., Klatka, J., Pietruszewska, W., Puacz, E., Szyfter, K., Szyfter, W. (2013). Recommendations for the diagnosis of human papilloma virus (HPV) high and low risk in the prevention and treatment of diseases of the oral cavity, pharynx and larynx. Guide of experts PTORL and KIDL. *Otolaryngologia Polska*. 1 1 3 – 1 3 4

- Zhang, T., Xu, Y., Qiao, L., Wang, Y., Wu, X., Fan, D., Xu, X. (2010). Trivalent Human Papillomavirus (HPV) VLP vaccine covering HPV type 58 can elicit high level of humoral immunity but also induce immune interference among component types. *Vaccine*. Vol.28. 3479–3487