



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGÍSTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

**Detección de HPV en muestras parafinadas de las regiones
anogenital y orofaríngea mediante PCR tiempo real**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTORA: Zúñiga Román, Ivanova del Cisne

DIRECTORA: Arévalo Jaramillo, Ana Paulina, Mg

CODIRECTORA: Dalgo Aguilar, Paola Ximena, Mg

LOJA-ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mg.

Ana Paulina Arévalo Jaramillo

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, denominado: **Detección de HPV en muestras parafinadas de las regiones anogenital y orofaríngea mediante PCR tiempo real**, realizado por Ivanova del Cisne Zúñiga Román, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Noviembre de 2017.

f)

APROBACIÓN DE LA CODIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mg.

Paola Ximena Dalgo Aguilar

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, denominado: **Detección de HPV en muestras parafinadas de las regiones anogenital y orofaríngea mediante PCR tiempo real**, realizado por Ivanova del Cisne Zúñiga Román, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Noviembre de 2017.

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Ivanova del Cisne Zúñiga Román declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Detección de HPV en muestras parafinadas de las regiones anogenital y orofaríngea mediante PCR tiempo real**, de la Maestría en Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio, siendo Mg. 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. 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).....

Autor: Ivanova del Cisne Zúñiga Román

Cédula: 1900482637

DEDICATORIA

El presente trabajo, va dedicado primeramente a Dios, el pilar fundamental en mi vida, por guiarme en este largo caminar y brindarme salud, fortaleza y sabiduría para culminar con éxitos mis estudios.

A mi esposo Diego, por su amor y comprensión, por estar conmigo en todo momento y apoyarme incondicionalmente en cada paso de mi vida.

A mis padres Iván y Augusta, parte primordial en mi vida, por el apoyo incondicional que siempre me brindan, quienes con su amor, esfuerzo y sacrificio supieron formarme para ser mejor cada día y llegar a ser la persona que soy ahora.

A mis queridos sobrinos, hermanas y a toda mi familia, por sus consejos, apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTO

Expreso mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Técnica Particular de Loja, por haberme dado la oportunidad de seguir formándome profesionalmente, a los docentes de la maestría, quienes supieron compartir sus conocimientos oportunamente, y de manera especial, al Departamento Ciencias de la Salud, por su colaboración en este estudio.

Un agradecimiento especial a la Mg. Ana Paulina Arévalo Jaramillo, por impartirme sus conocimientos, y quien desinteresadamente dirigió mi trabajo de fin de titulación, hasta la culminación del mismo.

A la Mg. Paola Dalgo, por sus conocimientos impartidos y guiarme en el proceso de este trabajo.

A los directores médicos y coordinadores de los laboratorios de patología del hospital regional “Isidro Ayora” y “Solca Núcleo de Loja”, por brindarme el apoyo necesario para el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
APROBACIÓN DE LA CODIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
CAPITULO I MARCO TEÓRICO	6
1.1 <i>Virus del Papiloma Humano (HPV)</i>	7
1.2 Epidemiología de la infección por HPV.	7
1.3 Generalidades del HPV:.....	8
1.3.1 Estructura	8
1.3.1.1 Región Temprana (E, early).....	9
1.3.1.2 Región Tardía (L, late).....	10
1.3.1.3 Región Larga de Control (LCR, long control region).....	10
1.4 Clasificación del <i>virus del papiloma humano</i>	11
1.4.1 <i>Virus del papiloma humano</i> de Bajo Riesgo (HPV-BR):	11
1.4.2 <i>Virus del papiloma humano</i> de Alto Riesgo (HPV-AR):.....	11
1.4.3 <i>Virus del papiloma humano</i> de probable/posible Alto Riesgo (HPV-PAR):.....	12
1.5 Formas clínicas de la infección por HPV.....	12
1.5.1 Forma latente (asintomática):.....	12
1.5.2 Forma subclínica:.....	13
1.5.3 Forma clínica:	13

1.6 Transmisión del HPV.	13
1.7 Relación entre el <i>Virus del Papiloma Humano</i> y el Cáncer.	14
1.7.1 Patogenia general en el cáncer.	14
1.7.2 Carcinogénesis y HPV.	15
1.7.3 Relación con el cáncer oral.....	17
1.7.4 Relación con el cáncer anal.....	19
1.8 Prevención de la infección por HPV.	21
1.8.1 Vacunación frente al HPV.....	21
1.9 Tratamiento.....	22
1.10 Diagnóstico del <i>virus del papiloma humano</i>	23
1.10.1 PCR tiempo real.....	24
1.10.1.1 Ventajas de la PCR tiempo real.	26
CAPITULO II METODOLOGÍA.....	27
Fin del Proyecto.....	28
Propósito del Proyecto.....	28
Componentes del Proyecto.....	28
2.1 Tipo de Estudio.....	29
2.2 Extracción de ADN.....	29
2.3 Genotipificación del HPV.....	30
2.4 Análisis Estadístico	31
CAPITULO III RESULTADOS	32
CAPITULO IV DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45
ANEXOS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los Papilomavirus.....	9
Figura 2. Genoma del HPV.....	11
Figura 3. Ciclo viral del HPV.....	15
Figura 4. Mecanismo de acción carcinógena del HPV-AR.....	17
Figura 5. Carcinoma Gingival y de Lengua por HPV de alto riesgo.....	19
Figura 6. Citología Anal.....	20
Figura 7. PCR Tiempo Real. Fundamento.....	25
Figura 8. Curva de Amplificación.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas tempranas del HPV y funciones asociadas.....	9
Tabla 2. Proteínas tardías del HPV y funciones asociadas.....	10
Tabla 3. Tipos de HPV asociados a enfermedades.....	12
Tabla 4. Principales características de las tres vacunas frente al HPV.....	22
Tabla 5. Características generales de las muestras analizadas.....	33
Tabla 6. Amplificación del control interno β -globina en muestras analizadas.....	34
Tabla 7. Frecuencia de HPV en muestras validadas	35
Tabla 8. Frecuencia de HPV según el género y región anatómica.....	35
Tabla 9. Frecuencia de los genotipos de HPV encontrados en las muestras analizadas de las regiones orofaríngea y anogenital.....	35
Tabla 10. Relación del HPV con los diagnósticos histopatológicos.....	36

ABREVIATURAS

CA: Cáncer anal

CCE: Carcinoma de células escamosas

CCO: Cáncer de cavidad oral

CCU: Cáncer de cuello uterino

Ct: del inglés *cycle threshold* o ciclo umbral

E: Early, región temprana

FRET: Transferencia de energía de resonancia fluorescente

HNSCC: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, por sus siglas en inglés head and neck squamous cell carcinoma

HPV: *Virus del Papiloma Humano*

HPV-BR: *Virus del papiloma humano* de bajo riesgo

HPV-AR: *Virus del papiloma humano* de alto riesgo

HPV-PAR: *Virus del papiloma humano* de probable/posible alto riesgo

IARC: Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, del inglés International agency for research on cáncer

L: Late, región tardía

LCR: Long control región, región larga de control

OE: Eritroplasia oral

OL: Leucoplasia oral

OLP: Liquen plano oral

ORF: Open reading frame

OSCC: Carcinoma de células escamosas orofaríngeo, por sus siglas en inglés oropharyngeal squamous cell carcinomas

PIN: Cáncer de pene

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

NIA: Neoplasia intraepitelial anal

NIC: Neoplasia intraepitelial de cérvix

NIV: Neoplasia intraepitelial vulvar

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VLPs: Partículas no infecciosas similares al virus, por sus siglas en inglés virus like particle

RESUMEN

El *virus del papiloma humano* es altamente transmisible, produciendo la infección de transmisión sexual más común en el mundo e induciendo carcinogénesis en humanos; es en cuello uterino donde ha tomado mayor relevancia siendo el principal agente causal de cáncer a este nivel, sin embargo, estudios manifiestan que este virus también causa carcinoma en cavidad oral, orofaríngea y anogenital, ocasionando importantes problemas de salud. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia y genotipos de HPV en muestras de tejidos parafinados con alteraciones citológicas de regiones orofaríngea y anogenital; se procesaron un total de 73 muestras procedentes del laboratorio patológico del hospital "Isidro Ayora" y "Solca Loja" de los años 2010, 2011, 2016 y 2017, para detectar el virus mediante PCR tiempo real. Se encontró que el 36,7% de las muestras válidas presentaron HPV, siendo el sexo femenino el afectado en mayor porcentaje (66,7%). De los casos positivos, el 94,4% correspondió a la región orofaríngea y el 5,6% al tracto anogenital; el genotipo más frecuente fue el HPV 16 con el 25,0%, seguido del HPV 18 con el 20,8%.

Palabras Clave: *Virus del papiloma humano* (HPV), genotipo, PCR en tiempo real

ABSTRACT

The human papilloma virus is highly transmissible, producing the most common sexually transmitted infection in the world and inducing carcinogenesis in humans; it's in the cervix where it has become more relevant being the main causative agent of cancer at this level, however, studies show that this virus also causes carcinoma in the oral, oropharyngeal and anogenital cavities, causing important health problems. The objective of this work was to determine the frequency and genotypes of HPV in samples of paraffined tissues with cytological alterations of oropharyngeal and anogenital regions; a total of 73 samples were processed from the pathological laboratory of the "Isidro Ayora" and "Solca Loja" hospitals for the years 2010, 2011, 2016 and 2017, to detect the virus by real-time PCR. It was found that 36.7% of valid samples presented HPV, with the female sex being the most affected (66.7%). Of the positive cases, 94.4% corresponded to the oropharyngeal region and 5.6% to the anogenital tract; the most frequent genotype was HPV 16 with 25.0%, followed by HPV 18 with 20.8%.

Key words: Human papillomavirus (HPV), genotype, real-time PCR

INTRODUCCION

El *virus del papiloma humano* (HPV) es altamente transmisible con capacidad para infectar al ser humano gracias a su tropismo por las superficies cutáneas y las mucosas, produciendo una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en el mundo (Bernáldez, 2014), infectando a hombres y mujeres por igual.

El virus puede infectar el epitelio estratificado de la piel o las membranas mucosas del tracto gastrointestinal superior, respiratorio o anogenital, lo que puede dar lugar a resultados tales como verrugas genitales y papilomas laríngeos, como ciertos tipos de cáncer (De Socio, Bidovanets, Tomassini, Fanelli, & Simonetti, 2017), incluyendo el cáncer cervical, vaginal, vulvar, de pene y anal, así como una proporción significativa de cáncer orofaríngeo y probablemente cáncer de esófago (Snietura et al., 2017).

Hoy en día está bien establecido que una importante y heterogénea familia de HPV inducen carcinogénesis en humanos, siendo responsable de casi 1 de cada 20 casos de cáncer en todo el mundo (Koncar, Feldman, Bahassi, & Hashemi Sadraei, 2017), y es en cuello uterino en donde ha tomado mayor relevancia siendo el principal agente causal con un 99,7% (Brebí M., Hartley B., Ili, Roa S., & Sánchez G., 2013), sin embargo, estudios recientes manifiestan que este virus también causa el desarrollo de carcinoma de células escamosas en cavidad oral, orofaríngea y anogenital (Aguar, Jaumandreu, Álvarez Santín, Rodríguez Álvarez, & Ortega, 2015) asociados con el comportamiento sexual y cuya incidencia va aumentando en los últimos años ocasionando importantes problemas de salud pública (Contreras & Venegas, 2015).

El grupo más importante de HPV son los papilomavirus alfa de la mucosa, que son responsables de las infecciones de los tractos anogenital y aero-digestivo, se transmiten por contacto con las mucosas y potencialmente a través de las secreciones de la mucosa más comúnmente atribuidas a comportamientos sexuales (Mirghani, Sturgis, Aupérin, Monsonogo, & Blanchard, 2017). Tomando en cuenta su potencial oncogénico, se definieron tres grupos: carcinógenos (HPV de alto riesgo), probablemente carcinógenos (un total de 25 tipos clasificados) y no carcinógenos o de bajo riesgo (más de 30 tipos conocidos) (Snietura et al., 2017).

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés) ocupa el sexto lugar a nivel mundial entre las neoplasias de todas las localizaciones

(Gallegos-Hernández et al., 2007), con más de 686.000 nuevos casos diagnosticados cada año, el sitio afectado con más frecuencia es la cavidad oral, y se calcula que el 60% se asocia con una infección por HPV oncogénica, aunque estudios más recientes en EE.UU. señalan tasas aún más altas del 70% al 80% (Toman et al., 2016). En un estudio global que incluyó 26 países se encontró una prevalencia de HPV del 35.6% en cáncer orofaríngeo, 23.5% en cavidad oral y 24% el laringe (Maestre Rodríguez, Cabrera Rodríguez, Mateo Arias, Monge Gil, & González García, 2012). En América del Sur y Central se halló una prevalencia de HPV del 37% en cáncer orofaríngeo (Wen et al., 2017), y es particularmente el HPV 16 el que se asocia con el cáncer orofaríngeo en más del 90% de los casos (Woelber et al., 2017).

Los carcinomas orofaríngeos HPV positivos se desarrollan con más frecuencia en menores de 50 años, no presentan asociación con alcohol y tabaco, se relacionan con hábitos sexuales orales y múltiples contactos sexuales, tienen predilección por las amígdalas palatinas y la base de la lengua (Soria-Céspedes et al., 2013).

De igual manera, en las últimas décadas, la incidencia de cáncer anal ha aumentado considerablemente y más del 95% de los casos están asociados con la infección por el *virus del papiloma humano* (Rademacher et al., 2017), encontrándose 30.400 nuevos casos por año en todo el mundo, con mayor aumento en mujeres (Valmary-Degano et al., 2013). En un estudio realizado en Puerto Rico describieron una prevalencia de HPV en esta región del 39% (Ortiz et al., 2016). El genotipo más prevalente en cáncer anogenital es el HPV 16, encontrándose en hasta el 90% de los casos (Hickman et al., 2016).

En la ciudad de Loja son pocos los casos de cáncer y lesiones precancerígenas reportadas en las regiones orofaríngea y anogenital, según datos estadísticos del programa de registro de tumores de SOLCA, durante los años 2010, 2011, 2016 y 2017 se han reportado 20 casos. En un estudio realizado en esta ciudad, así mismo en muestras de las regiones orofaríngea y anogenital, de los años 2012 a 2015, se encontró una incidencia de HPV del 46.4%, siendo el HPV16 el genotipo más frecuente con un 64.3%. El porcentaje de HPV en la región orofaríngea fue de 26.7%, y en la región anogenital se encontró un 25.0% (Dalgo, 2016).

El HPV es un virus de interés mundial, siendo objeto de gran cantidad de estudios, debido al impactante incremento de la incidencia en los últimos años y a la importancia que presenta

por su asociación con el cáncer en las regiones orofaríngea y anogenital. Es por ello, que se ha planteado el presente trabajo de investigación con el objetivo de determinar y genotipificar el HPV en muestras de tejidos parafinados de regiones orofaríngea y anogenital con alteraciones citológicas procedentes del Hospital Regional “Isidro Ayora” y “Solca Núcleo de Loja” de los años 2010, 2011, 2016 y 2017. La información proporcionada por esta investigación contribuirá con datos de interés científico y social los cuales son importantes para el desarrollo de estrategias de prevención que permitan reducir la incidencia del *virus del papiloma humano*, así como el cáncer asociado a su infección en diferentes regiones anatómicas.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Virus del Papiloma Humano (HPV).

El HPV, por sus siglas en inglés, es un virus pequeño de ADN de doble cadena circular que pertenece a la familia *Papovaviridae* y al género *Papillomavirus*; no posee envoltura, tiene un diámetro aproximado de 52-55nm. Un grupo selecto de Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus y Gamma-papillomavirus infectan a humanos causando lesiones benignas y malignas, tanto en hombres como en mujeres. En la actualidad, más de 200 tipos de HPV han sido identificados, los cuales tienen tropismo por epitelios escamosos estratificados, infectando piel, mucosa oral y/o del tracto anogenital (Astudillo González, Flores Montesinos, & Espinoza Salamea, 2014).

El HPV es altamente transmisible, originando la infección de transmisión sexual más frecuente en todo el mundo. En la mayoría de los casos la infección por HPV es asintomática, transitoria y puede pasar desapercibida, pero en otros, las manifestaciones clínicas son muy diversas y comprenden desde simples verrugas y otros procesos benignos, hasta el desarrollo de neoplasias severas como el cáncer de cuello uterino (CCU), el cáncer anal (CA), cáncer de pene (PIN), de vagina, vulva, cáncer orofaríngeo y cavidad oral (CCO). Hoy en día hay suficiente evidencia científica para asegurar que la persistencia del ADN del HPV en la célula infectada es una condición indispensable para el desarrollo del cáncer (Mateos-Lindemann, Pérez-Castro, Rodríguez-Iglesias, & Pérez-Gracia, 2016).

1.2 Epidemiología de la infección por HPV.

La infección por el HPV se reconoce ahora como el factor etiológico de carcinogénesis para un conjunto de cánceres, sobre todo de cuello uterino, ya que se ha investigado que en el 99% de los casos está implicado algún genotipo del HPV (Arteaga-Núñez, Rodríguez-Delfín, Pesantes-Vera, & Villanueva-Baltuano, 2014), sin embargo, estudios recientes demuestran una realidad prácticamente ineludible que manifiesta que este virus también causa el desarrollo de carcinoma de células escamosas (CCE) en cavidad oral, orofarínge y anogenital, constituyendo el 90% de todos los carcinomas existentes (Aguiar et al., 2015).

En el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) se ha identificado al HPV como el principal agente causal de esta patología, siendo el sitio afectado con más frecuencia la cavidad oral, se calcula que el 60% de HNSCC se asocia con una infección por

HPV oncogénica aunque estudios recientes de EE.UU. señalan tasas aún más altas del 70% al 80% (Toman et al., 2016). El carcinoma de células escamosas orofaríngeo (OSCC) ocupa el catorceavo lugar de incidencia mundial en varones, con 114.800 nuevos casos al año, y el veinteavo lugar en mujeres encontrándose 27.000 casos nuevos al año (De Santis, Spinosi, Cambi, Bengala, & Boccuzzi, 2017). En un estudio global que incluyó 26 países diferentes se encontró una prevalencia de HPV del 35.6% en cáncer orofaríngeo, 23.5% en cavidad oral y 24% el laringe (Maestre Rodríguez et al., 2012). En América del Sur y Central se halló una prevalencia de HPV del 37% en cáncer orofaríngeo (Wen et al., 2017), y es particularmente el HPV 16 el que se asocia con el cáncer orofaríngeo en más del 90% de los casos (Woelber et al., 2017).

El cáncer anal es una neoplasia poco frecuente cuya incidencia ha estado aumentado significativamente en las últimas décadas, y más del 95% de los casos están asociados con la infección por el *virus del papiloma humano* (Rademacher et al., 2017), encontrándose 30.400 nuevos casos por año en todo el mundo, con mayor aumento en mujeres (Valmary-Degano et al., 2013). En un estudio en Puerto Rico, de una muestra poblacional de mujeres hispanas residentes en este país, describieron una prevalencia de HPV en la región anal, con y sin infección cervical, del 39%; y, solamente anal del 19% (Ortiz et al., 2016). Así mismo, en un estudio realizado en una población de hombres provenientes de Brasil, México y Estados Unidos, se identificó una prevalencia de HPV en el tracto anal del 24%, 15% y 15% respectivamente (Sudenga et al., 2017). El tipo más prevalente en carcinoma anal de células escamosas (ASCC) es el HPV 16, encontrándose en hasta el 90% de los casos (Hickman et al., 2016).

1.3 Generalidades del HPV:

1.3.1 Estructura.

Las partículas del HPV son icosaédricas, no presentan envoltura, la cápside está constituida por 72 capsómeros pentaméricos de la proteína más abundante (L1). Otra proteína de la cápside denominada L2 se asocia internamente a un subgrupo de capsómeros formados por L1. Dentro de la cápside se ubica el genoma viral, constituido por ADN de doble cadena circular (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015) (Figura 1).

En su genoma posee 8.000 pares de bases de longitud, y codifica ocho regiones de lectura abierta (ORF: open reading frame). Está dividido en tres regiones: regiones tempranas (E) encargadas de regular la síntesis proteica temprana, regiones tardías (L) que codifican las proteínas de la cápside vírica, estas dos son de lectura abierta, y región larga de control (WO, Verónica, & Yeimer, 2017) (Figura 2).

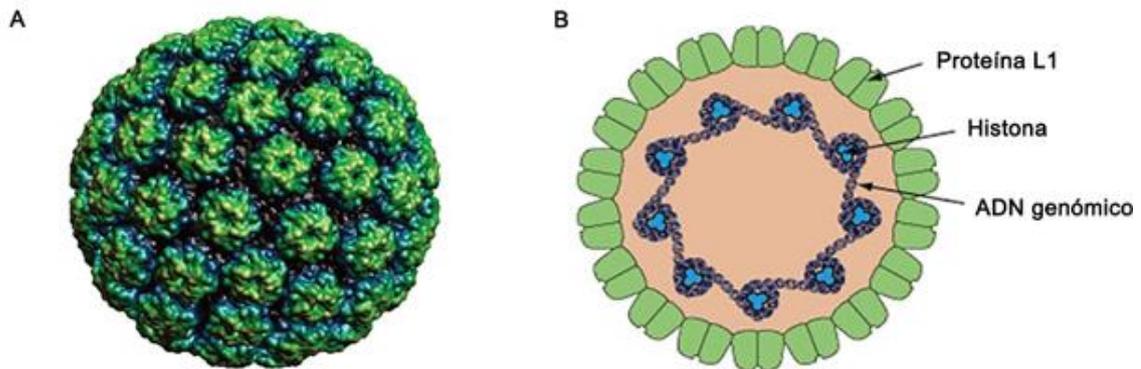


Figura 1. Estructura de los Papilomavirus. (A: Imagen 3D de un virión y de la proteína L1 cristalizada, B: Diagrama de la cápside del VPH, donde se observa la proteína principal de la cápside L1, así como el genoma viral empaquetado con histonas celulares).

Fuente: Santos-López 2015

Elaborado por: Santos-López

1.3.1.1 Región Temprana (E, early).

Incluye genes de expresión temprana como son E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que dan origen a proteínas no estructurales y están involucrados en procesos tales como la replicación viral, la regulación de la transcripción, y la inmortalización celular (Vega-Malagón et al., 2014). En la Tabla 1 se resumen las funciones generales de las proteínas tempranas.

Tabla 1. Proteínas tempranas del HPV y funciones asociadas.

Proteínas Tempranas	Funciones o actividades asociadas
E6	Inmortaliza y modula la transcripción, se une a la P53 e induce su degradación.
E7	Inmortaliza y modula la transcripción, se une a Rb inactivándola.
E2	Regula la transcripción viral. Se une al DNA, coopera con E1 en la replicación viral.

E1	Participa en la replicación viral, inicia la replicación, modula la función E2.
E5	Transforma, se pierde durante la integración viral.
E4	Participa en la maduración de partículas virales.

Fuente: Vega-Malagón 2014.
Elaborado por: Vega-Malagón.

1.3.1.2 Región Tardía (L, late).

Contiene los genes de expresión tardía L1 Y L2, dan origen a dos proteínas estructurales de la cápside vírica (Santos-López et al., 2015). En la Tabla 2 se resumen las funciones generales de las proteínas tardías.

Tabla 2. Proteínas tardías del HPV y funciones asociadas.

Proteínas Tardías	Funciones o actividades asociadas
L1	Proteína principal de la cápside. Reconoce receptores sobre la célula hospedera. Es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes.
L2	Proteína secundaria de la cápside. Participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones.

Fuente: Vega-Malagón 2014.
Elaborado por: Vega-Malagón.

1.3.1.3 Región Larga de Control (LCR, long control region).

Región reguladora no codificante de aproximadamente 1 kb, la cual no posee marco de lectura alguno, contiene elementos de respuesta para factores de transcripción celulares, tales como AP1, SP1, Oct1, etcétera, así como para las proteínas virales E1 y E2, que controlan la replicación y la expresión del genoma viral (Santos-López et al., 2015).

Esta región contiene un centro promotor llamado p97 (en VPH16) o p105 (en VPH 18) que permite potenciar o silenciar secuencias que regulan la replicación del ADN mediante el control de la transcripción de los ORF (Astudillo González et al., 2014), así como la presencia de ARNm con modificaciones de corte y empalme (splicing) durante la diferenciación de las células epiteliales (Santos-López et al., 2015), además esta región contiene la mayor variación genética entre un tipo viral y otro (Astudillo González et al., 2014).

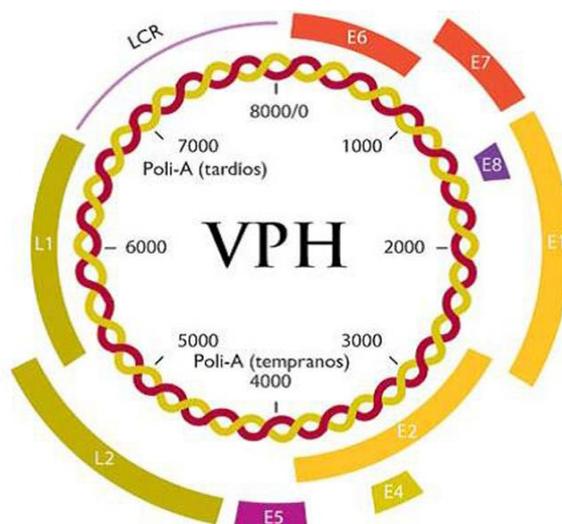


Figura 2. Genoma del HPV. Dividido en tres regiones E, L y LCR.
Fuente: Beltrán-Lissabet 2014
Elaborado por: Beltrán-Lissabet

1.4 Clasificación del virus del papiloma humano.

Se han clasificado en dos grandes grupos según su capacidad oncogénica:

1.4.1 Virus del papiloma humano de Bajo Riesgo (HPV-BR): este grupo comprende los genotipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 son no oncogénicos, únicamente ocasionan verrugas y condilomas genitales, y otras patologías benignas de piel y mucosas, siendo los más frecuentes el VPH6 y VPH11 (Mateos-Lindemann et al., 2016).

1.4.2 Virus del papiloma humano de Alto Riesgo (HPV-AR): este grupo comprende los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 son oncogénicos, provocan cambios celulares y con el tiempo pueden conducir al cáncer (Mateos-Lindemann et al., 2016). Los tipos 16 y 18 son los genotipos más frecuentes asociados a cáncer cervical, vulvar, anal, de pene y boca (WO et al., 2017).

1.4.3 Virus del papiloma humano de probable/posible Alto Riesgo (HPV-PAR): este grupo comprende los genotipos 68, 26, 53, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 73 y 82, son de probable/posible alto riesgo oncogénico o riesgo intermedio (Mateos-Lindemann et al., 2016). En la Tabla 3 se presenta más detalladamente los tipos de HPV relacionados con diferentes patologías.

Tabla 3. Tipos de HPV asociados a enfermedades.

Patologías Asociadas	Tipos de HPV
Verrugas plantares	1, 2, 4, 63
Verrugas comunes	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
Verrugas planas	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Otras lesiones cutáneas (ej. Quistes epidermoides, carcinoma laríngeo)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermodisplasia verruciforme	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papilomatosis respiratoria recurrente	6, 11
Hiperplasia epitelial focal	13, 32
Papilomas carcinomas conjuntivales	6, 11, 16
Condiloma acuminado	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Neoplasia Intraepitelial: Inespecífico	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Neoplasia Intraepitelial: Bajo riesgo	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
Neoplasia Intraepitelial: Alto riesgo	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Carcinoma cervical	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

Fuente: Zelada-Fando 2013

Elaborado por: Zelada-Fando

1.5 Formas clínicas de la Infección por HPV.

Las manifestaciones clínicas del virus varían dependiendo del sitio, huésped, y tipo de virus (Pacheco, Valencia, Quijano, & Zárate, 2012) y puede ir desde estados asintomáticos con resolución espontánea, transitorios o pasar desapercibidos, hasta el desarrollo de neoplasias tan severas como el cáncer de diversos sitios anatómicos que puede llevar a la muerte (Mateos-Lindemann et al., 2016).

La expresión de la infección por el virus del papiloma humano se clasifica en:

1.5.1 Forma latente (asintomática): la cual no tiene expresión clínica ya que no presentan lesiones visibles y solo se detectan mediante una prueba de biología molecular positiva o métodos inmunohistoquímicos con uso de anticuerpos monoclonales específicos (Pacheco et al., 2012).

1.5.2 Forma subclínica: la mayor parte de las infecciones causadas por este virus son subclínicas y pueden detectarse en la mayoría de los casos por estudio colposcópico (Pacheco et al., 2012), ya que solo mediante este examen las lesiones son visibles tras la aplicación de ácido acético al 3-5%, por lo que es de suma importancia su diagnóstico (WO et al., 2017).

1.5.3 Forma clínica: la cual puede identificarse clínicamente ya que se manifiesta como condilomas acuminados en mucosa, verrugas genitales y papilomas venéreos (WO et al., 2017).

1.6 Transmisión del HPV.

El HPV es el agente responsable de una enfermedad altamente contagiosa que afecta a la especie humana debido a su comportamiento sociable, se da generalmente por el contacto directo permitiendo así su transferencia entre las células epiteliales (WO et al., 2017).

Las vías de transmisión pueden ser diversas según algunos estudios: por vía perinatal, por infección transplacentaria, por líquido amniótico, por sangre, por contacto sexual, por autoinoculación y algunos autores sugieren la posible transmisión por saliva (Serena-Gómez, Eduardo Bologna-Molina, Nevarez-Rascon, & Rocha Buelvas, 2011).

Los datos que se tiene hasta el momento indican que la transmisión del HPV entre parejas heterosexuales es extremadamente común, principalmente por contacto con la piel de la zona genital, pero también puede transmitirse por contacto con mucosas y fluidos biológicos. Se ha descrito algún caso por compartir objetos sexuales, también es común en la mujer la autoinoculación entre las regiones genitales y anales. Los estudios demuestran que las infecciones por HPV en la región anal en mujeres y en hombres que tienen sexo con hombres son muy comunes, sobre todo en personas infectadas por el VIH. Del mismo modo, el aclaramiento del HPV anal es también común y pocos individuos muestran persistencia, siempre y cuando no estén infectados por el VIH, siendo este un factor que influye fuertemente en el desarrollo del estadio precursor del cáncer invasivo anal. Tener un alto número de parejas sexuales aumenta el riesgo de adquisición de HPV, existiendo otros factores de riesgo como no utilizar protección en el acto sexual, aunque se ha comprobado

que utilizar preservativo no protege al 100% y tener una disminución de la inmunidad (Mateos-Lindemann et al., 2016).

1.7 Relación entre el Virus del Papiloma Humano y el Cáncer.

Está demostrado que en la mayoría de los casos la infección por HPV es una condición necesaria, aunque no suficiente, para el desarrollo del cáncer. Existe asociación entre este virus y carcinomas de útero, vulva, vagina, de pene, anal, orofaríngeo, laringe, esófago y tracto respiratorio. Principalmente los genotipos 16 y 18 están involucrados en estas patologías, y con menor frecuencia el 31 y 45 (Mateos-Lindemann et al., 2016).

1.7.1 Patogenia general en el cáncer.

El HPV infecta los queratinocitos de la capa basal a través de zonas discontinuas en la capa superior del epitelio (lesiones, microheridas o microabrasiones), donde inicia su ciclo infectando a las células poco diferenciadas del epitelio y allí comienza la transcripción de sus genes. Estas microheridas proporcionan el contacto entre los receptores presentes en las células basales y los viriones, que entran así por endocitosis. Cuando el HPV se asocia a lesiones benignas como condilomas, la replicación del genoma viral es extracromosomal, mientras que para que se produzca una lesión maligna el DNA viral se integra en el cromosoma del huésped (Elorza, Saralegui, Enríquez-Navascués, Placer, & Velaz, 2016) (Figura 3).

Hay dos ciclos para la replicación viral, uno es la infección lítica en la que el virus llega a las células parabasales con mucha capacidad de replicación, se introduce en el citoplasma y posteriormente en el núcleo, y el otro es la infección lisogénica, aquí se ve afectado directamente el genoma celular, como ocurre con los HPV de alto riesgo 16 y 18. Al alcanzar el núcleo celular el virus se integra al genoma de la célula huésped, primordialmente con los segmentos E6 y E7. Cuando estas células están infectadas inducen a la activación de la expresión en cascadas de los genes virales provocando una producción de 20 a 100 copias aproximadamente extra cromosómicas del ADN viral por célula, este promedio de copias permanece estable en las células basales indiferenciadas a través del curso de la infección (WO et al., 2017).

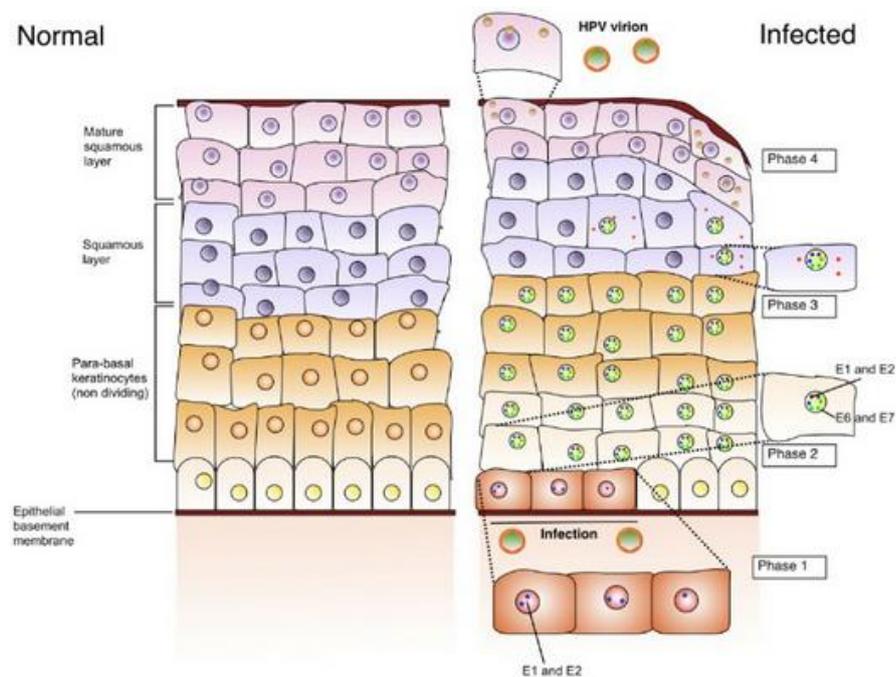


Figura 3. Ciclo viral del HPV.
Fuente: Pérez-Plasencia 2012
Elaborado por: Pérez-Plasencia

1.7.2 Carcinogénesis y HPV.

Dentro de los mecanismos carcinogénicos utilizados por el HPV para lograr la transformación celular, se describen las proteínas E6 y E7 como responsables del proceso de malignización. Una vez que el ADN viral se integró al de la célula huésped se pierde la proteína E2 del virus (encargada de la regulación transcripcional) y como consecuencia se sobreexpresan las oncoproteínas E6 y E7, estas dos proteínas son sintetizadas con el objetivo de bloquear los puntos de control en el ciclo celular, evadiendo así los mecanismos de quiescencia o apoptosis endógenos que son llevados a cabo por proteínas supresoras de tumores (Contreras & Venegas, 2015).

Las oncoproteínas del HPV de alto riesgo E6 y E7 expresadas en células epiteliales infectadas con el virus, están implicadas en el aumento de la proliferación y en la diferenciación anormal de estas células. Cuando las proteínas E6/E7 son la expresión de la infección de la célula con HPV de bajo riesgo, y se activan, pueden inducir neoplasias benignas. Sin embargo, cuando las proteínas E6/E7 son la expresión de una infección por HPV de alto riesgo, estas favorecen el papel de las oncoproteínas y tienen la capacidad de

inducir lesiones epiteliales displásicas y malignas (Feller, Wood, Khammissa, & Lemmer, 2010).

La proteína E7 de aproximadamente 13 KDa se localiza principalmente en el núcleo, tiene la capacidad de unirse a la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (pRb) y alterar su función en la fase G1-S del ciclo celular. La interacción de E7 con pRb, permite la liberación del factor de transcripción E2F, promoviendo así la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular y la síntesis de ADN. Otro de los efectos que provoca E7 en el ciclo celular es la sobreexpresión sin efecto alguno de p16INK4a, la cual, en condiciones de normalidad mantiene en estado hipofosforilado a pRb evitando la liberación de E2F, logrando frenar la multiplicación de las células y la progresión del ciclo (Contreras & Venegas, 2015).

La proteína E6 de aproximadamente 18 KDa es capaz de formar un complejo con la proteína p53 por medio de una ubiquitinaligasa y así degradarla por vía proteosomal, evitando así el punto de control en el ciclo celular en la fase G1, logrando así, la evasión de apoptosis. También tiene la capacidad de inhibir acetiltransferasas de histonas, que acetilan y estabilizan a p53. Además, puede interactuar con otras proteínas que están involucradas en actividades de transformación de la célula, supresoras de tumores e inductoras de apoptosis, factores de reparación y replicación de ADN. Así mismo, E6 cuenta con algunas funciones independientes que promueven la formación tumoral incluida la promoción de la activación indirecta de la telomerasa; cuya activación evita el acortamiento de los telómeros que resulta en la prolongación de la vida útil de las células infectadas por el HPV, e interacción con proteínas PDZ relacionadas a uniones celulares y estructuras del citoesqueleto (Contreras & Venegas, 2015).

Las actividades de p53 median la proliferación celular en respuesta a la estimulación mitogénica; mediar la detención del crecimiento del ciclo celular en el punto de control G1 después del daño del ADN, permitiendo de este modo la reparación del ADN dañado antes de que la célula entre en la fase de síntesis de ADN; y mediar la inducción de la apoptosis de las células en las que el daño del ADN está más allá de la reparación. Por lo tanto, la inactivación, degradación o mutación del gen p53 puede desregular sus funciones dando como resultado un aumento de la proliferación celular, en la acumulación de ADN dañado, en el crecimiento de células que albergan errores de ADN y en la supervivencia celular prolongada. Sin embargo, la pérdida de la función p53 por sí sola no es suficiente para el

desarrollo de cáncer, y se requieren otras alteraciones citogenéticas para la transformación maligna completa (Feller et al., 2010).

Los efectos patológicos separados del HPV E6 y E7 de alto riesgo, en el ciclo celular se complementan entre sí, juntos E6/E7 median la transformación de las células epiteliales asociadas al HPV y promueven la inestabilidad genómica celular que predispone a las células infectadas a una transformación maligna completa. El HPV E7 de alto riesgo activa la síntesis de ADN y los mecanismos de replicación celular que normalmente son inactivos en células epiteliales maduras, iniciando así el crecimiento de células patológicas. Al inducir la supervivencia celular y la apoptosis retardada de las células con daño al ADN, E6 permite que E7 ejerza y mantenga su efecto patológico (Feller et al., 2010) (Figura 4).

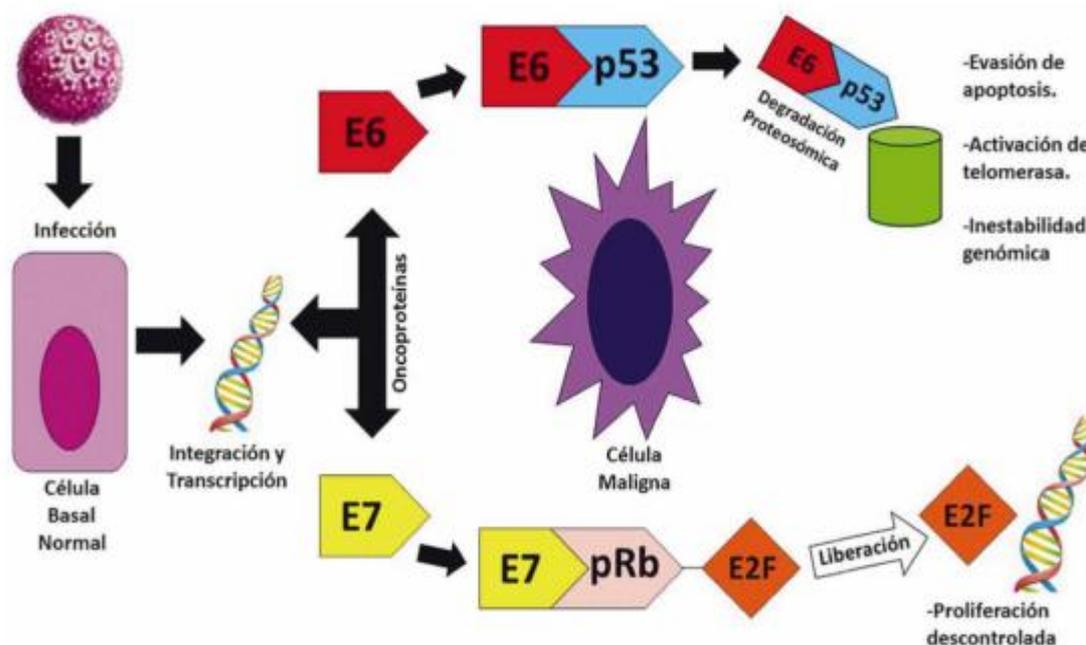


Figura 4. Mecanismo de acción carcinógena del HPV-AR.

Fuente: Contreras-Venegas 2015

Elaborado por: Contreras-Venegas.

1.7.3 Relación con el Cáncer Oral.

El cáncer oral es una enfermedad por la que se forman células malignas en los tejidos de cualquier parte de la boca. El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC por sus siglas en inglés) es el sexto cáncer más común en el mundo y la octava causa principal de muertes relacionadas con el cáncer. Los principales factores de riesgo para el

HNSCC son el consumo de tabaco, el consumo de alcohol y, más recientemente, la infección por el *virus del papiloma humano*. En la cabeza y el cuello, la infección por HPV se observa más a menudo en el cáncer orofaríngeo, un subconjunto de HNSCC, que está aumentando en su incidencia. Es importante destacar que los tumores que contienen este virus se comportan de manera menos agresiva que los HPV-negativos, lo que da como resultado un mejor pronóstico (Khanal et al., 2017) (Figura 5).

Aproximadamente el 20% de los cánceres orales y del 60% al 80% de cánceres orofaríngeos son atribuidos a la infección por HPV. En 2012, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) declaró que había pruebas suficientes para asociar un subtipo de HPV, el 16, con cánceres orales. Además, estos cánceres orales relacionados con el HPV difieren de los tumores o cánceres negativos para HPV en su respuesta clínica y en las tasas de supervivencia global. Un total de 99% de las infecciones por HPV en el HNSCC están relacionadas con los tipos de alto riesgo 16, 18, 31 o 33, siendo el HPV 16 el subtipo más común y el HPV 33 el que representa hasta el 10% de los casos. Epidemiológicamente, el HNSCC HPV positivo es más frecuente en los pacientes más jóvenes (menores de 50 años), que difiere de la edad típica de los pacientes con HNSCC, también se ha demostrado una correlación directa entre los pacientes con HPV positivo y el comportamiento sexual en HNSCC. El HPV-16 de alto riesgo se correlaciona con el sexo vaginal u oral y los encuentros sexuales frecuentes sin uso de barrera. Los cambios actuales en las prácticas sexuales, incluyendo la primera experiencia sexual a una edad más temprana, el alto número de parejas sexuales y la alta probabilidad de sexo oral, pueden estar asociados con la creciente prevalencia de la infección por HPV (Kim, 2016).

Clínicamente, los tumores asociados al HPV pueden aparecer como una lesión exofítica tipo fresa, frecuentemente en la base de la lengua o en el área de las amígdalas. La mayoría presenta hallazgos patológicos poco diferenciados y cambios quísticos en los ganglios linfáticos metastáticos del cuello. La transformación de la mucosa oral normal en carcinoma oral podría estar relacionada con lesiones precancerosas, tales como leucoplasia oral (OL), eritroplasia oral (OE), liquen plano oral (OLP), estomatitis de nicotina, queratosis de la bolsa de tabaco y fibrosis submucosa oral. El papel del HPV en la transformación maligna de las lesiones precancerosas no se ha confirmado, pero se ha reportado la OL como la lesión potencialmente maligna más frecuente, la OE puede asociarse con displasia epitelial grave combinada con carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo, la mucocutánea crónica tipo OLP es

susceptible a la infección por HPV, y p16 con proteína INK4a es un marcador precanceroso fiable en queratosis de tabaco sin humo (tabaco para mascar) (Kim, 2016).

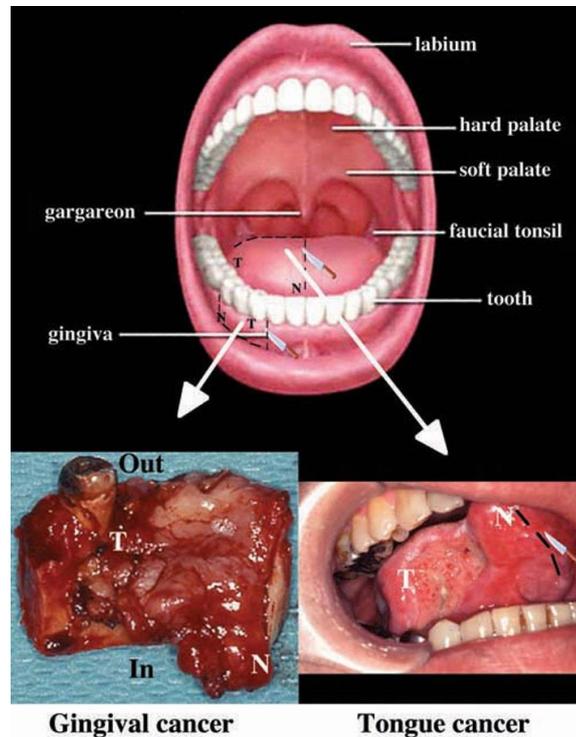


Figura 5. Carcinoma Gingival y de Lengua por HPV de Alto Riesgo.
Fuente: Tatsuk *et al.* 2014
Elaborado por: Tatsuk.

1.7.4 Relación con el Cáncer Anal.

El carcinoma anal es una patología maligna poco común, que surge en el canal anal, especialmente en la zona de transición del epitelio (Ríos, Ángeles, & Menéndez, 2013), representando el 2% de los cánceres gastrointestinales (Elorza *et al.*, 2016), cuya incidencia ha estado aumentando en las últimas décadas, encontrándose 30.400 nuevos casos por año en todo el mundo (Valmary-Degano *et al.*, 2013), siendo más frecuente entre las mujeres (60%) que entre los hombres (40%) (D'Hauwers *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha demostrado la relación que existe entre el cáncer anal y el HPV, más del 95% de los casos están asociados con la infección por el *virus del papiloma humano* (Rademacher *et al.*, 2017), el serotipo más prevalente en cáncer anogenital es el HPV 16, encontrándose en hasta el 90% de los casos (Hickman *et al.*, 2016).

El incremento de la incidencia de cáncer anal puede atribuirse a prácticas sexuales cambiantes que incluyen la edad de las relaciones sexuales y un mayor número de parejas sexuales, así mismo hay ciertas poblaciones que tienen un mayor riesgo, específicamente hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (HSH), personas que viven con VIH/SIDA, receptores de trasplante y mujeres con enfermedad cervical asociada a HPV previa (Sudenga et al., 2017).

El carcinoma anal al igual que el de cuello uterino es precedido por anomalías celulares o neoplasias intraepiteliales, también progresan desde lesiones de bajo grado hasta lesiones de alto grado y finalmente, dependiendo de algunas circunstancias, al cáncer, aunque el porcentaje de regresión y progresión de las lesiones en estos pacientes no está claro. Los genotipos implicados en la neoplasia intraepitelial anal son similares a los presentes en cuello uterino, y no es infrecuente observar la infección por múltiples tipos (de Carvalho, Ferreira, & Tremel Bueno, 2011).

La neoplasia intraepitelial anal (AIN, por sus siglas en inglés) es una lesión precancerosa que puede evolucionar hacia un cáncer escamoso de canal y margen anal, se ha demostrado que al igual que en la neoplasia intraepitelial de cérvix (CIN) y vulvar (VIN) se relaciona con la infección por HPV en más del 90% de los casos, sobre todo con los genotipos 16 (85%) y 18 (7%). Las AIN se clasifican histológicamente como AIN I (displasia de bajo grado) y AIN II-III (displasia de alto grado) dependiendo de la profundidad del epitelio afectado, es significativo identificar estas lesiones, ya que la mayoría de ellas presentarán una clínica inespecífica y poco característica (Elorza et al., 2016) (Figura 6).

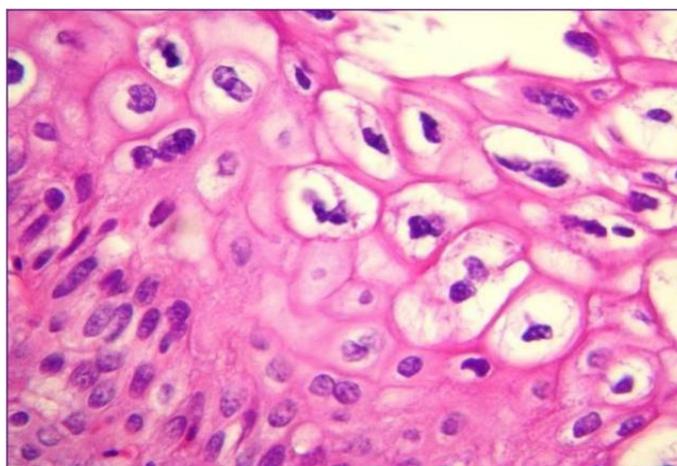


Figura 6. Citología Anal. Neoplasia Intraepitelial de Bajo Grado (HPV).
Fuente: Cachau et al. 2011
Elaborado por: Cachau.

1.8 Prevención de la infección por HPV.

1.8.1 Vacunación frente al HPV.

Las vacunas frente al HPV están constituidas por partículas no infecciosas similares al virus (VLPs) producidas mediante el autoensamblaje de las proteínas L1. Las VLPs se adquieren mediante métodos de recombinación genética de la cápside de los diferentes genotipos del HPV. Hoy en día existe en el mercado tres vacunas para la prevención de la infección por HPV aprobadas por la FDA (U.S. Food and Drug Administration), una de ellas es la bivalente (Cervarix vph2 ®) que protege contra los genotipos 16 y 18, la tetravalente (Gardasil vph4 ®) que además protege contra los tipos 6 y 11 porque son los implicados en la aparición de verrugas (WO et al., 2017), y la nonavalente (Gardasil9 ®) que incluye los 4 genotipos de HPV incluidos en la tetravalente (16, 18, 6 y 11), así como los tipos 31, 33, 45, 52 y 58 responsables de un 20% adicional de casos de cáncer de cuello de útero, alcanzando un potencial preventivo de un 90% para dicha neoplasia (Campins M, Alemany L, Bayas JM, Borrueal N, Castellsagué X, Curran A, Díaz Heredia C, Martínez X, Moraga Ilop FA, 2016), y que han sido distribuidas a nivel mundial. Pero las vacunas no tienen acción terapéutica para inducir regresión o prevenir la progresión de infecciones que ya están formadas (WO et al., 2017) (Tabla 4).

En la vacuna bivalente la pauta de vacunación en adolescentes de 9 a 14 años incluye dos dosis, la primera y la segunda administrada a los 6 meses, la pauta a partir de los 15 años de edad es de 3 dosis en los meses 0, 1 y 6. Para la tetravalente la pauta de vacunación entre los 9 y 13 años es también de dos dosis, administradas en los meses 0 y 6, mientras que para la nonavalente el intervalo de edad es de 9 a 14 años. La pauta de vacunación posteriormente es de 3 dosis (0, 2 y 6 meses). Estas vacunas no están indicadas en menores de 9 años ya que faltan estudios sobre inmunogenicidad y seguridad, en personas con inmunodepresión independientemente de la edad, se recomienda usar siempre la pauta de 3 dosis (Campins M, Alemany L, Bayas JM, Borrueal N, Castellsagué X, Curran A, Díaz Heredia C, Martínez X, Moraga Ilop FA, 2016). El objetivo principal de la vacunación es la prevención del cáncer y así mismo en un futuro tener menos población con dicha patología (WO et al., 2017).

Tabla 4. Principales características de las tres vacunas frente al HPV.

	Cervarix ® (23) - GSK	Gardasil ® (24) – Merck/SPMSD	Gardasil 9 ® (25) – Merck/SPMSD
Tipos de VLP	16/18	6/11/16/18	6/11/16/18/ 31/33/45/52/58
Contenido	20/10 mcg	20/40/40/20 mcg	30/40/60/40 mcg 20/20/20/20/20 mcg
Adyuvante	ASO4 (hidróxido de aluminio, MPL)	Hidroxifosfato sulfato de aluminio (AAHS)*	Hidroxifosfato sulfato de aluminio (AAHS)*
Pautas***	0, 6 meses (9-14 años) 0, 1, 6 meses (≥ 15 años)	0, 6 meses (9-13 años) 0, 2, 6 meses (≥ 14 años)	0, 6 meses (9-14 años) 0, 2, 6 meses (≥ 15 años)
Indicaciones	Lesiones precancerosas cervicales, vulvares, vaginales y anales, y cáncer de cérvix y ano	Lesiones precancerosas cervicales, vulvares, vaginales y anales, y cáncer de cérvix y ano; verrugas genitales	Lesiones precancerosas y cáncer de cuello uterino, vulva, vagina y ano; verrugas genitales
MPL: monofosforil lípido A; VLP: virus-like particles * 225 mcg ** 500 mcg *** En situaciones de inmunodepresión, la pauta será siempre de tres dosis			

Fuente: Campins *et al.* 2016

Elaborado por: Campins.

1.9 Tratamiento.

Hasta la actualidad no existe un medicamento que sea específico contra el HPV, sin embargo, se busca dar una mejor calidad de vida al paciente, teniendo en cuenta la extensión de la lesión que presenta y el tipo de morfología, para darle un tratamiento oportuno, este puede ser aplicado por el paciente o por el médico según el tipo de lesión. Para asegurar el éxito en el tratamiento es necesario tener opciones terapéuticas adaptadas, basándose en la forma clínica de presentación, preferencias y adherencia al tratamiento. Hoy en día se dispone de una serie de terapias: químicos, los que actúan mediante citotoxicidad química; tópicos, como el ácido tricloroacético y los antimetabolitos que comprenden el 5-fluoracilo y agentes antimicóticos, como la podofilina-podofilotoxina; y los métodos que permiten la destrucción del tejido dañado como: crioterapia, electrocoagulación diatérmica, termocoagulación, vaporización con láser de CO₂, asa dérmica y conización con bisturí e histerectomía, también antivirales y e inmunorreguladores como el interferón-alfa, imiquimod y el ácido clicirricínico (WO et al., 2017). Para tumores, el tratamiento estándar es la cirugía y la radioterapia, en estadios precoces se pueden utilizar de forma única la radioterapia con buenos resultados y en

estadios más avanzados la combinación de cirugía y radioterapia produce mejores resultados. La quimioterapia por sí sola no es curativa pero se la debe tomar en cuenta en protocolos de investigación de tumores avanzados, para intentar conservar las funciones de la fonación y la deglución por ser un tratamiento conservador y evitar las cirugías mutilantes (Serena-Gómez et al., 2011).

1.10 Diagnóstico del virus del papiloma humano.

El diagnóstico oportuno se utiliza para realizar un tratamiento inmediato, así mismo disminuir la mortalidad, además tiene por objeto conocer la morbilidad de la infección y patologías asociadas al virus con la finalidad de tener un diagnóstico definitivo ofreciendo una mejor calidad de vida (WO et al., 2017).

Puesto que el HPV es considerado como el principal agente causal de diversos carcinomas como el de cavidad oral y anal, surge la necesidad de disponer de ensayos que permitan el diagnóstico temprano de la infección por HPV. Han surgido métodos alternativos y tecnológicamente diferentes, entre ellos las pruebas de detección del material genético del *virus papiloma humano* por medio de la biología molecular (Astudillo González et al., 2014).

La detección de HPV mediante su ADN se ha utilizado como un marcador de la presencia del virus en una lesión o como cribado de prevención, aunque lesiones clínicas y alteraciones citológicas siguen siendo los métodos más utilizados, hoy en día se han introducido técnicas moleculares para detectar el ADN del HPV en muestras de diferentes localizaciones anatómicas como objetivo de identificar infecciones por este virus en riesgo de desarrollar un carcinoma (Astudillo González et al., 2014). Sólo las técnicas moleculares permiten detectar con alta sensibilidad el genoma del virus y determinar el tipo viral implicado en diversas clases de muestras como: células exfoliadas, tejidos embebidos en parafina o tumores frescos. La tipificación es trascendental en la prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento más adecuado a beneficio de los pacientes.

En la actualidad existen varias técnicas moleculares para la detección de ADN del HPV, siendo la PCR tiempo real una de las más empleadas en los últimos años, para la determinación cuantitativa de la carga viral para el diagnóstico molecular del HPV.

1.10.1 PCR tiempo real.

La PCR tiempo real es considerada una técnica cuantitativa que garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia, cuyo objetivo es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción y cuantitativo a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. La nomenclatura para ADN genómico es qPCR (*quantitative* PCR) y si primero obtenemos ADN complementario (la enzima transcriptasa reversa convierte el ARNm en una molécula de ADNc) para luego realizar la PCR se denomina RT-qPCR. La aplicación más usada es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos, pudiendo detectarse a partir de concentraciones bajas (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Para llevar a cabo este ensayo existen varios métodos entre los cuales se encuentran: el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena; el reportero más usado se llama SYBR Green, las pruebas basadas en hidrólisis mediante sondas fluorescentes como por ejemplo las comerciales TaqMan, y los métodos por hibridación mediante sondas como son las *molecular Beacons* (Tamay de Dios et al., 2013), pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que se desea amplificar (Cultek, 2016). Para cualquier método que se utilice se necesita de la tecnología incluida en los termocicladores de PCR en tiempo real para excitar al reportero, capturar la señal de emisión del mismo y realizar el análisis cuantitativo. Primero el reportero es excitado y su señal de emisión colectada a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda correspondiente que llega hasta un fotodetector que captura la información proveniente de la muestra para su análisis en el software del equipo (Tamay de Dios et al., 2013).

Los métodos basados en la utilización de sondas tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos siguen el principio conocido como “transferencia de energía de resonancia fluorescente” (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; esta técnica consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o “quencher”. Para ello, existen dos métodos específicos, éstos son: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación. Los primeros se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero

fluorescente y un «quencher», ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el quencher, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad es muy alta. Las pruebas por hibridación consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia (Tamay de Dios et al., 2013) (Figura 7).

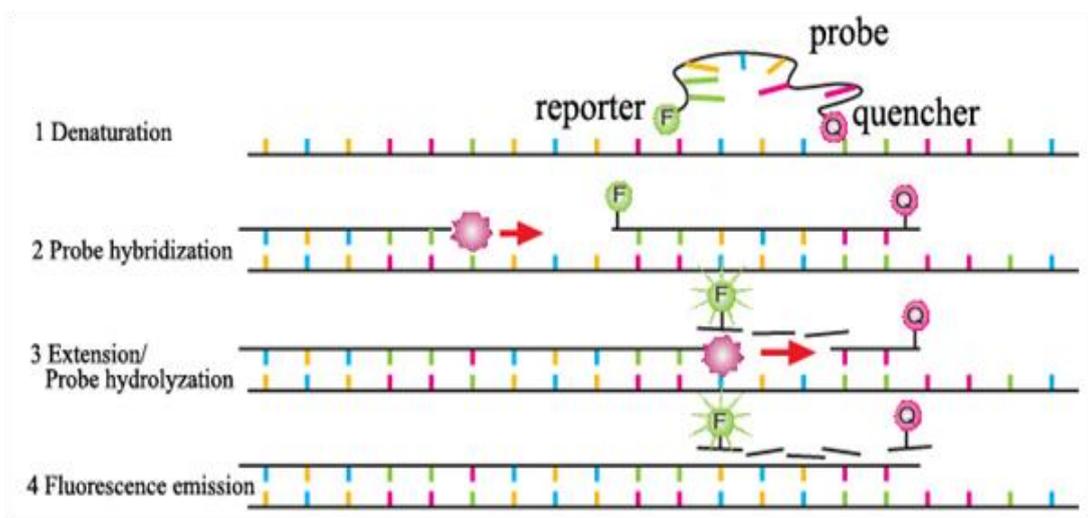


Figura 7. PCR Tiempo Real. Fundamento

Fuente: Sino Biological 2017

Elaborado por: Sino Biological

La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por tanto, proporcional a la cantidad de molde de ADNc presente en la PCR. El aumento exponencial del producto de PCR se utiliza para determinar el ciclo de umbral o Ct, que es el número de ciclos de PCR en los que se detecta un aumento significativo en la fluorescencia, es el principio básico de la PCR tiempo real. El Ct es directamente proporcional al número de copias de la plantilla de ADNc presente en la reacción (Fan & Robetorye, 2010). Es importante mencionar que un valor de Ct mayor a los 40 ciclos significa que no hay amplificación.

Los valores del C_t , del inglés *cycle threshold* o ciclo umbral deben ser obtenidos, y anteriormente un umbral adecuado debe ser fijado en un punto significativamente por encima de la línea base, habitualmente el software lo establece automáticamente mediante diferentes algoritmos o bien se puede asignar de forma manual. La posición del umbral se puede establecer en cualquier punto en la fase exponencial de la PCR (Bonab et al., 2015) (Figura 8).

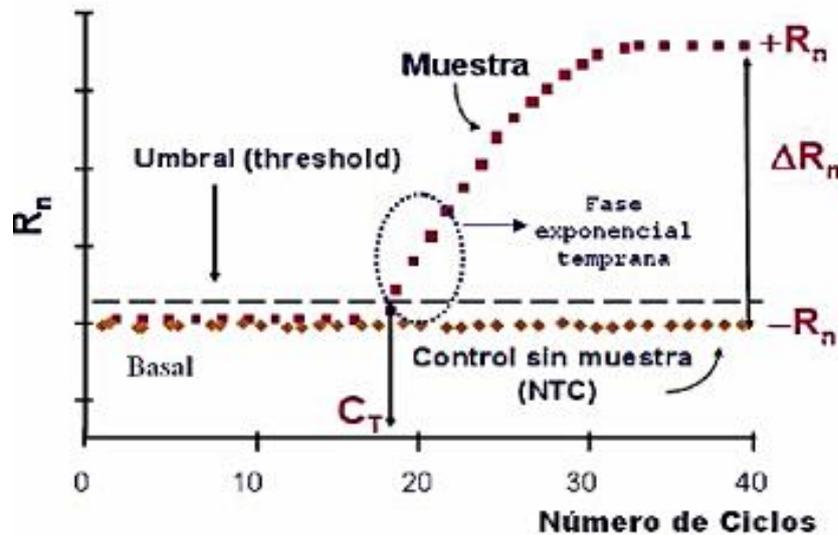


Figura 8. Curva de Amplificación. PCR en tiempo real.

Fuente: Ferramola 2011

Elaborado por: Ferramola

1.10.1.1 Ventajas de la PCR tiempo real.

- Detecta y cuantifica secuencias específicas de ácidos nucleicos.
- Garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia.
- Útil para una variedad de muestras clínicas como tejidos frescos y fijados en parafina, secreciones corporales, líquido cefalorraquídeo, sangre total, plasma, leucocitos, material fecal, exudados de garganta, vaginales o anales, etc.
- Requiere poca cantidad de muestra.
- Los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo tubo de reacción, sin necesidad de manipulación posterior.
- Detecta más de un producto específico en una misma reacción.
- Genera resultados confiables y reproducibles.

CAPITULO II
METODOLOGÍA

Fin del Proyecto.

La información proporcionada por esta investigación contribuirá con datos de interés científico y social los cuales son importantes para el desarrollo de estrategias de prevención que permitan reducir la incidencia del virus del papiloma humano, así como el cáncer asociado a su infección en diferentes regiones anatómicas.

Propósito del Proyecto.

Determinar la frecuencia y genotipos de HPV en muestras de tejidos parafinados de regiones orofaríngea y anogenital con alteraciones citológicas procedentes del Hospital Regional "Isidro Ayora" y de "Solca Núcleo de Loja" mediante PCR tiempo real.

Componentes del Proyecto.

- Determinar la frecuencia y genotipos de HPV en muestras de tejidos parafinados con diferentes alteraciones citológicas de regiones orofaríngea y anogenital.

2.1 Tipo de Estudio

El presente trabajo de investigación es de tipo observacional. Se procesaron 73 muestras de tejidos parafinados de regiones orofaríngea y anogenital con diferentes alteraciones citológicas procedentes de los laboratorios de patología del Hospital Regional “Isidro Ayora” y “Solca Núcleo de Loja” de los años 2010, 2011, 2016 y 2017. Los criterios para la selección de las muestras fueron los siguientes:

- Bloques de parafina en buen estado.
- Cantidad de tejido representativo.
- Diagnósticos histopatológicos de citología alterada.

Cabe señalar que las muestras procesadas corresponden al 100% del total de los casos encontrados en las dos casas de salud en los años mencionados, y este proceso se realizó previa aceptación por parte del director médico de cada casa de salud.

2.2 Extracción de ADN

La extracción del material genético se realizó a partir de bloques del tejido parafinado, el cual se colocó previamente sobre hielo durante 20 minutos para facilitar el corte. El espesor de cada corte fue de 10-15 μ m, los mismos se realizaron con un micrótopo de rotación (AO´ROTARY MICROTOME 820). Se descartó los primeros cortes para evitar posibles contaminaciones, así como también se realizó entre cada corte la limpieza de las cuchillas con detergente y DNA AWAY Decontaminant. Se colocaron de 8 a 10 cortes en tubos estériles de 1.5mL (según la cantidad de tejido).

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

La extracción de ADN se llevó a cabo empleando el kit comercial Purelink Genomic DNA Mini kit FFPE TISSUE LYSATE de Invitrogen, el cual se basa en la unión selectiva de ADN a una membrana a base de sílice en presencia de sales caotrópicas, el cual se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (Life technologies, 2013).

Posterior a la extracción de ADN se procedió a evaluar la concentración y pureza del material genético empleando un espectrofotómetro (Nanodrop 200c-Thermo scientific), mediante la medición de su densidad óptica 260/280 - 260/230 nm, identificando la presencia o ausencia de contaminantes (proteínas, fenoles) para determinar la calidad de la muestra.

2.3 Genotipificación del HPV

Con el material genético se realizó la determinación de los genotipos de HPV mediante PCR en tiempo real utilizando el kit AmpliSens HPV HCR genotype-FRT de Ecoli, que es una prueba in vitro de amplificación de ácidos nucleicos para la detección cualitativa y diferenciación de los genotipos de alto riesgo cancerígeno del HPV como son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 mediante la detección de fluorescencia en tiempo real de productos amplificados.

Esta prueba se basa en una PCR multiplex para la detección en tiempo real de tres genotipos de HPV además de β -globina como control interno, en cuatro tubos diferentes detectando en total 12 genotipos diferentes. Cada tipo de HPV se registra en su propio canal que permite no sólo detectar, sino también diferenciar el genotipo del virus. El ADN seleccionado como control interno es un fragmento del genoma humano y debe presentarse siempre en la muestra. Este proceso se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (AmpliSens, 2016).

El análisis de los datos obtenidos se basó en la detección del ciclo umbral o threshold cycle (Ct), las muestras se consideraron positivas si el valor de Ct es menor o igual a 35 ciclos, si la curva de acumulación de fluorescencia cruza la línea umbral, y si se amplificó la señal del control interno β -globina (al menos en un coctail de cada muestra). Los resultados se consideraron negativos si se amplificó la señal del control interno β -globina (al menos en un coctail de cada muestra) y las señales positivas para los fluoróforos (FAM/Green, JOE/Amarillo, ROX/Orange) están ausentes en otros canales.

La prueba es válida, si para los controles negativos la señal positiva de los fluoróforos está ausente en todos los canales y para el control positivo se detectan los 12 genotipos del HPV, y se considera inválida, si no se detecta ninguna señal positiva en ningún canal en ningún tubo, incluyendo el canal del control interno β -globina.

2.4 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva, los resultados se muestran en tablas que indican frecuencias y porcentajes de las características generales, así como de los tipos de virus encontrados.

CAPITULO III

RESULTADOS

En el presente estudio se procesaron 73 muestras de tejidos parafinados de las regiones orofaríngea y anogenital, procedentes de los laboratorios de patología del Hospital Regional “Isidro Ayora” y “Solca Núcleo de Loja” de los años 2010, 2011, 2016 y 2017; las características que presentaron las muestras se mencionan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características generales de las muestras analizadas

Región	Masculino n (%)	Femenino n (%)	Diagnóstico
Orofaríngea	21 (28,8%)	41 (56,2%)	Epulis Fibroso Epulis de Células Gigantes Adenoma Carcinoma Escamocelular bien diferenciado Carcinoma Escamocelular Infiltrante Carcinoma Basocelular Amígdala Palatina Papiloma Nevo Intradérmico Nevo Displásico Granuloma piógeno con reacción inflamatoria Fibroma Mucocele Hemangioma Leucoplaquia Leucoplaquia con Displasia de Bajo Grado y cambios virales Queratosis actínica ulcerada Pápula Fibrosa Oral Hiperplasia Reactiva Hiperplasia de anillo de Waldeyer Hiperplasia Epitelial Miofibroma Ulcerado Fibrocioma con signos de inflamación crónica Pólipo Fibroepitelial Hiperqueratosis por Fricción Granulación Inflamación Aguda
			Adenocarcinoma Adenomatosis con displasia leve e hiperplásicos Reacción crónica granulomatosa Reacción inflamatoria crónica Displasia Moderada

Anogenital	3 (4,1%)	8 (10,9%)	Lipoma Granuloma Inflamatorio Acrocordón Adenoma tubular vellosos con displasia moderada Pólipo Fibroso Pólipo Inflamatorio
TOTAL	24 (32,9%)	49 (67,1%)	

Fuente y Elaboración: Autora

De las 73 muestras, 24 pertenecían a hombres correspondiente al 32,9%, del cual el 87,5% eran de la región orofaríngea y el 12,5% de la región anogenital. Las 49 muestras restantes pertenecían a mujeres, y corresponden al 67,1%, del cual el 83,7% eran de la región orofaríngea y el 16,3% de la anogenital.

La extracción del material genético que se realizó con el kit comercial invitrogen Purelink Genomic DNA Mini kit, permitió obtener una concentración de ADN de las muestras con un promedio de 58,86 ng/ul. La integridad del ADN se evaluó mediante la amplificación del control interno β -globina, considerando inválidas a aquellas muestras que no cumplieron con este criterio de calidad, en este caso se encontró un 67,1% de muestras válidas. En la Tabla 6 se indica el porcentaje de muestras válidas según la amplificación de β -globina y la región anatómica de la muestra.

Tabla 6. Amplificación del control interno β -globina en muestras analizadas

Región	Amplifica β -globina	No Amplifica β -globina	Muestras no procesadas*	TOTAL
Orofaringea	42 (67,7%)	13 (21%)	7 (11,3%)	62 (100%)
Anogenital	7 (63,6%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	11 (100%)
TOTAL	49 (67,1%)	16 (21,9%)	8 (11%)	73 (100%)

*Estas muestras no fueron sometidas a PCR, por presentar concentraciones de ADN menores a 10ng/ul, valores con los cuales no se obtenía producto de amplificación

Fuente y Elaboración: Autora

Como se muestra en la Tabla 7, la presencia de HPV se analizó en todas las muestras válidas, obteniéndose un total de 18 muestras positivas para HPV, correspondientes al 36,7% y 31 fueron negativas para el virus, correspondientes al 63,3%. Del porcentaje de

casos positivos el 94,4% corresponden a la región orofaríngea y el 5,6% al tracto anogenital, los detalles se muestran en la Tabla 8.

Tabla 7. Frecuencia de HPV en muestras validadas

Detección HPV	N° casos Positivos	Frecuencia
Positivo	18	36,7 %
Negativo	31	63,3 %
TOTAL	49	100 %

Fuente y Elaboración: Autora

Tabla 8. Frecuencia de HPV según el género y región anatómica

Región Anatómica	Género	N° casos Positivos	Frecuencia
Orofaringea	Masculino	6	33,3 %
	Femenino	11	61,1 %
Anogenital	Masculino	0	0,0 %
	Femenino	1	5,6 %
TOTAL		18	100 %

Fuente y Elaboración: Autora

Como se manifiesta en la Tabla 8, en el presente estudio, la mayor frecuencia de HPV se encontró en mujeres con un 66,7%, mientras que en hombres se encontró una frecuencia del 33,3%.

Los genotipos de HPV encontrados en las muestras analizadas se indican en la Tabla 9, siendo el más frecuente el 16 con un 25%, seguido del HPV 18 con un 20,8 %, y del HPV 58 con un 12,6%.

Tabla 9. Frecuencia de los genotipos de HPV encontrados en las muestras analizadas de las regiones orofaríngea y anogenital

GENOTIPO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
16	6	25,0%
18	5	20,8%
31	2	8,3%

33	2	8,3%
39	2	8,3%
51	1	4,2%
52	1	4,2%
56	2	8,3%
58	3	12,6%
TOTAL	24	100%

Fuente y Elaboración: Autora

Cabe recalcar que dentro de los casos positivos se detectó coinfección en un 22,2%, asociando los HPV 18-31 (dos muestras), HPV 16-18 (una muestra), y HPV 16, 51, 52 y 58 (una muestra).

Finalmente, al revisar los casos positivos de HPV y el diagnóstico histopatológico se determinó una mayor frecuencia de HPV en alteraciones premalignas con un 71% de los casos que presentaron algún genotipo de HPV de alto riesgo. En cuanto se refiere a los tipos de HPV encontrados, se puede determinar una mayor diversidad en las alteraciones benignas, la cual disminuye en las alteraciones premalignas y carcinoma, encontrándose en este último solamente los genotipos 16, 18 y 33, los detalles se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Relación del HPV con los diagnósticos histopatológicos.

Diagnóstico Histopatológico	Frecuencia de casos positivos para HPV	Genotipos de HPV
Carcinoma	33 %	16, 18, 33
Lesiones Premalignas	71 %	16, 18, 31, 39, 58
Alteraciones Citológicas Benignas	30 %	16, 18, 31, 33, 39, 51, 52, 56, 58

Fuente y Elaboración: Autora

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

En la última década, se ha identificado al HPV como el principal agente etiológico de los cánceres del tracto orofaríngeo y de las regiones anogenitales en hombres y mujeres (Nelson & Lai, 2017) a nivel mundial, en nuestro país son pocos los estudios relacionados al HPV en estas regiones anatómicas, por lo que la presente investigación contribuye con un aporte importante para conocer la frecuencia de este virus en nuestro medio en la actualidad.

Para la detección y genotipificación del HPV en este estudio se utilizó el ADN de muestras de tejidos embebidos en parafina, el cual presentó una concentración promedio de 58,86 ng/ul y la relación de absorbancias 260/280 se presentó un valor aceptable en el 96% de las muestras considerándose de forma general como una buena calidad de muestra para trabajar, ya que se considera un ADN de pureza óptima cuando la relación 260/280 es de 1,8 – 2,0, y valores mayores a 1,6 son aceptables (Meza & Gutierrez, 2013), mientras que los menores a este, indican una posible contaminación por compuestos aromáticos por lo que se considerarían no apropiados, en el total de muestras analizadas solo 3 de ellas presentaron valores menos a 1,6. Sin embargo, no todas las muestras analizadas amplificaron el control interno (β -globina), presentándose un porcentaje de 32,9% de muestras inválidas. Esta contrariedad ha sido reportada constantemente en varios estudios a partir de muestras parafinadas, planteando varios problemas debido a que dicho ADN puede contener sustancias como la formalina, los alcoholes o los aldehídos que preservan el tejido, pero que inhiben el procedimiento molecular, ocasionando un entrecruzamiento de las hebras de ADN, modificando las bases y degradando parcialmente la molécula (Jelassi et al., 2016), siendo éste el principal limitante para el análisis de estas muestras. Otras variables, como el tiempo de fijación, el tamaño del tejido fijado, la edad del bloque, la temperatura, el pH de los reactivos, los solventes orgánicos usados en la desparafinación, entre otros, también pueden afectar la calidad de los ácidos nucleicos extraídos y, por lo tanto, la eficacia en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Meza & Gutierrez, 2013).

En el presente estudio la frecuencia de HPV en las regiones orofaríngea y anogenital del total de muestras validadas y analizadas fue del 36,7%. En la región orofaríngea hubo una mayor frecuencia de HPV con el 94,4%, lo que difiere con un estudio global que incluyó 26 países diferentes encontrándose una prevalencia de HPV del 35,6% en cáncer orofaríngeo (Maestre Rodríguez et al., 2012), en América del Sur y Central se halló una frecuencia del 37% (Wen et al., 2017), y en Ecuador en un estudio realizado en la ciudad de Loja se reportó una frecuencia de HPV del 26,7% en esta misma región anatómica (Dalgo, 2016).

En la región anal se encontró una frecuencia de HPV del 5,6%, aunque son pocos los estudios realizados en esta región, en una investigación desarrollada en Italia se encontró una frecuencia de HPV del 42% (Ciccarese, Herzum, Rebora, & Drago, 2017), en Portugal realizaron un estudio a partir de verrugas anogenitales en donde se encontró infección por genotipos de alto riesgo en el 40,8% de los pacientes, y en Loja se reportó una frecuencia de HPV del 25% (Dalgo, 2016); estos datos no se asemejan a los encontrados en el presente trabajo, sin embargo, cabe recalcar que en este estudio el bajo número de muestras válidas para la región ano genital puede interferir en los resultados sesgando la información.

El HPV afecta a hombres y mujeres por igual, en el presente trabajo investigativo, el porcentaje de casos positivos de HPV para mujeres fue del 66,7%, y del 33,3% para hombres. Considerando la región anatómica y el sexo se pudo determinar que en la región orofaríngea la mayor frecuencia de HPV se encontró en mujeres con un 61,1%. En un estudio realizado en Italia, hubo igual frecuencia de HPV oral tanto en hombres como en mujeres con un 37% en ambos (Ciccarese et al., 2017), en la región central de Brasil se encontró en carcinoma oral y orofaríngeo una frecuencia de HPV mayor en hombres con un 78% y menor en mujeres con un 22% (Petito et al., 2017), en Colombia hubo una mayor frecuencia de HPV en la región orofaríngea en hombres con un 25,81% y en mujeres se encontró un 13,33% (Motta Vargas, 2014), igualmente en México se presentó una mayor frecuencia de HPV en hombres con un 43% y en menor porcentaje en mujeres con un 17,5% (Perla et al., 2015). Estos datos no concuerdan con la presente investigación, ya que en está, la mayor frecuencia de HPV en casos de alteraciones citológicas de la región orofaríngea se la encuentra en mujeres, pero esta situación es semejante a lo reportado por Dalgo (2016) en su estudio realizado en la misma población en diferente período de tiempo, donde se encontró que el 62,5% de las muestras procedentes de la región orofaríngea positivas para el virus correspondían al sexo femenino. Según los registros del Hospital "Isidro Ayora" y "Solca Núcleo de Loja" se determinó que a nivel de la población lojana desde el año 2010, la mayoría de muestras analizadas tanto en la región orofaríngea como anogenital pertenecen al sexo femenino, lo cual podría influir en esta diferencia de resultados con otros estudios a nivel mundial.

La infección anal por el *virus del papiloma humano* y su relación con el cáncer anal, se ha convertido en una realidad frecuente (Fidel et al., 2017), en este estudio se encontró una frecuencia de HPV en la región anogenital (excluido cérvix) del 5,6% el cual solo correspondió al género femenino, en el masculino no hubo casos positivos, ya que 2 de las

3 muestras del sexo masculino fueron validadas y no presentaron el virus. En un trabajo investigativo en Italia hubo una frecuencia similar de HPV en hombres y mujeres con un 43% y 41%, respectivamente para muestras de la región anogenital (Ciccarese et al., 2017), en la Habana, Cuba se indica un ligero predominio de HPV en el sexo femenino con una frecuencia de 55,8%, mientras que en el sexo masculino fue 44,11% (Fidel et al., 2017), en un estudio en Puerto Rico, de una muestra poblacional de mujeres, describieron una prevalencia de HPV en la región anal, con y sin infección cervical, del 39%; y, solamente anal del 19% (Ortiz et al., 2016). En un trabajo realizado en una población de hombres provenientes de Brasil, México y Estados Unidos, se identificó una prevalencia de HPV en el tracto anal del 24%, 15% y 15% respectivamente (Sudenga et al., 2017). En un trabajo previo realizado en la ciudad de Loja se encontró una mayor frecuencia de HPV en hombres con un 75% versus un 25% en mujeres (Dalgo, 2016). Aunque se ha documentado un mayor aumento de la frecuencia de HPV en la región anogenital en mujeres (Valmary-Degano et al., 2013), se puede observar que en la actualidad la mayoría de investigaciones revelan que la frecuencia de HPV en esta región es similar en hombres y mujeres, con un ligero predominio en el género femenino.

Los estudios moleculares epidemiológicos apuntan principalmente al HPV tipo 16, como el principal agente causal para un grupo de cánceres en diferentes localizaciones anatómicas (De Santis et al., 2017). La prevalencia de genotipos de HPV de alto riesgo a carcinogénesis, como el HPV 16, no parece ser diferente entre las regiones anatómicas (Rebolledo Cobos, Arango Fernández, Rebolledo Cobos, & Alonso Brujes, 2016), y los resultados finales de esta investigación son similares a los obtenidos en otros estudios realizados en varios países donde se muestra al HPV 16 como el más frecuente. Los genotipos de HPV encontrados en las muestras analizadas de las regiones orofaríngea y anogenital fueron el 16, 18, 31, 33, 39, 51, 52, 56, y 58. El genotipo más frecuente fue el HPV 16 con un 25%, seguido del HPV 18 con un 20,8 %. En la región orofaríngea, en Brasil encontraron una frecuencia de HPV 16 de 33,3% y HPV 18 de 14,3% (Petito et al., 2017), en la India Central el genotipo 16 fue el más frecuente con el 72%, el HPV 31 con el 12%, HPV 18 con un 8% y el HPV 35 y 56 con el 4% (Gheit et al., 2017), Estados Unidos, Europa, Japón, Colombia y Venezuela también presentaron una mayor frecuencia del HPV 16, con el 59,3%, 31,1%, 29,5%, 90% y 73% respectivamente, (Wen et al., 2017, Toman et al., 2016, Motta Vargas, 2014, Rebolledo Cobos et al., 2016). Así mismo, en la región anogenital también se encontró en varios países una mayor frecuencia del HPV 16, hasta en el 90% de los casos de cáncer anogenital (Hickman et al., 2016), como en Bélgica la prevalencia de

HPV 16 fue de 89%, HPV 39 el 4,1% y HPV 33 el 2,7% (Valmary-Degano et al., 2013), en Alemania el HPV más frecuente fue el tipo 16 con un 41%, HPV 51 con el 27%, el HPV 52 con el 24%, el HPV 31 con el 19% y el HPV 18 con un 13% (Kost et al., 2017). Estos resultados se presentan consistentes aun considerando que la cantidad de muestras analizadas en los diferentes trabajos varía considerablemente.

En este trabajo la mayoría de las muestras estudiadas presentaron infección de HPV ocasionada por un solo genotipo, pero el 22,2% de las muestras presentó coinfección asociando los HPV 18-31, HPV 16-18 y HPV 16, 51, 52 y 58, siendo la relación HPV 18-31 la más frecuente (2 muestras). En varios estudios a nivel mundial se ha reportado coinfección, sin embargo en otros países revelan una coinfección principalmente entre los genotipos 16-18 (Coello, Mata, Correnti, & Hematología-mpps, 2017), como lo reporta un estudio con pacientes tawaineses donde encontraron una mayor frecuencia de coinfección asociando los genotipo 16-18 (Lee et al., 2015), de igual manera se encontró la misma asociación en una investigación en la universidad de Trujillo (Arteaga-Núñez et al., 2014) y en la región central de Brasil (Petito et al., 2017).

La relación entre el HPV y el cáncer está muy estudiada, y se puede evidenciar en estudios realizados por diversos autores a nivel mundial, que la incidencia de la infección y el cáncer ocasionados por este virus va aumentando en la sociedad (Rebolledo Cobos et al., 2016). De los casos positivos de HPV encontrados en este trabajo, se pudo determinar que según el tipo de alteración citológica el 71% de las alteraciones premalignas presentan HPV, mientras que el 30 y 33% de los casos de alteraciones benignas y de carcinomas fueron positivos para el virus. En estudios realizados en Estados Unidos, Europa y Venezuela se encontró una frecuencia de HPV del 60%, 31% y el 88% respectivamente, en cáncer de cabeza y cuello (Wen et al., 2017; Coello et al., 2017), en un trabajo realizado en Brasil se evidencio un 25,6% de HPV en carcinomas de cavidad oral y orofaríngea (Petito et al., 2017), en una investigación realizada en Alemania con muestras anales procedentes de Europa del este/occidental, América central/del sur y África, se encontró un 100% de HPV en alteraciones atípicas de células escamosas, un 60% en lesiones premalignas y un 45% de HPV en alteraciones benignas (Kost et al., 2017). Estos datos indican la importancia del virus en el desarrollo de alteraciones en estas regiones anatómicas, incluso el desarrollo de cáncer.

La detección oportuna de la presencia de HPV, permite establecer de manera certera el comportamiento, evolución de las lesiones, determinar la presencia de actividad displásica

para evitar estadios invasivos, tener un mejor pronóstico para cánceres HPV positivos y poder escoger el mejor tratamiento, para reducir la morbilidad y mortalidad (Rebolledo Cobos et al., 2016), así mismo, permite contribuir para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención, para evitar un desarrollo maligno en los casos con diagnósticos histopatológicos negativos o alteraciones citológicas benignas, por lo que estudios de detección del virus son claves en el proceso de manejo clínico de alteraciones citológicas.

CONCLUSIONES

- La frecuencia de HPV fue del 36,7% del total de muestras válidas analizadas, encontrándose una mayor incidencia en mujeres con el 66,7% y en hombres un 33,3%.
- El 94,4% de casos positivos para HPV de alto riesgo carcinogénico se determinó en muestras de la región orofaríngea y el 5,6% al tracto anogenital.
- En genotipo más frecuente fue el HPV 16 con el 25,0%, seguido del HPV 18 con el 20,8%, y en menor porcentaje se encontraron los genotipos 31, 33, 39, 51, 52, 56, y 58.
- Se detectó un 22,2% de coinfección, asociando los HPV 18-31, HPV 16-18 y HPV 16, 51, 52 y 58.
- Se detectaron genotipos de HPV de alto riesgo en todas las alteraciones citológicas, encontrándose una mayor frecuencia en lesiones premalignas (71%).

RECOMENDACIONES

Conociendo que la incidencia del carcinoma en región orofaríngea y anogenital va aumentando en los últimos años y asumiendo al HPV como el principal agente causal de esta patología, se recomienda la implementación de pruebas moleculares como PCR, para la detección oportuna de este virus en las diferentes casas de salud, contribuyendo a la población con nuevas técnicas para un diagnóstico más óptimo y seguro, gracias a su alta sensibilidad, especificidad y eficacia, a beneficio de un mejor seguimiento, tratamiento y pronóstico; así también, es importante impulsar el desarrollo de investigaciones en diferentes poblaciones, ya que en nuestro país son pocos los estudios dirigidos al HPV en estas regiones anatómicas.

BIBLIOGRAFIA

- Aguiar, C., Jaumandreu, S., Álvarez Santín, C., Rodríguez Álvarez, M. C., & Ortega, C. (2015). Lesiones rectoanales por VPH, diagnóstico mediante PAP anal y anoscopía de alta resolución con biopsias: primera serie en Uruguay. *Revista Médica Del Uruguay*, 31(2),97–102.Retrievedfrom.
http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S168803902015000200003&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.edu.uy/pdf/rmu/v31n2/v31n2a03.pdf
- AmpliSens, F. B. I. of S. C. R. I. for E. (2016). AmpliSens HPV HCR genotype-FRT PCR kit. InstructionManual.
[http://www.pcrdiagnostics.eu/files/documents/productspdf/20140310/hpv%20hcr%20genotype-frt%20010216_\(r-v25\).pdf](http://www.pcrdiagnostics.eu/files/documents/productspdf/20140310/hpv%20hcr%20genotype-frt%20010216_(r-v25).pdf)
- Arteaga-Núñez, J., Rodríguez-Delfín, L., Pesantes-Vera, M., & Villanueva-Baltuano, M. (2014). Detección molecular de regiones oncogénicas E6 y E7 de virus del papiloma humano mediante PCR en pacientes Papanicolaou negativo del instituto regional de enfermedades neoplásicas de la libertad. *Sciéndo*, 17(2). Retrieved from <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/view/1046/974>
- Astudillo González, O. B., Flores Montesinos, C., & Espinoza Salamea, M. R. (2014). Diagnóstico molecular del virus del papiloma humano. *Panorama Medico*, 53(1), 16–21.
- Bernáldez, J. P. (2014). Actualización en el virus del papiloma humano. *FMC Formacion Medica Continuada En Atencion Primaria*, 21(2), 67–75. [https://doi.org/10.1016/S1134-2072\(14\)70705-4](https://doi.org/10.1016/S1134-2072(14)70705-4)
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B., ... O'Shea, K. S. (2015). NIH Public Access. *Lab Chip*, 4(2), 189–200. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>
- Brebi M., P., Hartley B., R., Ili, C. G., Roa S., J. C., & Sánchez G., R. (2013). Infección por el virus del papiloma humano en el hombre y su relación con el cáncer: estado actual y prospectivas. *Revista Internacional de Andrología*, 11(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.androl.2012.09.001>
- Campins M, Alemany L, Bayas JM, Borrueal N, Castellsagué X, Curran A, Diaz Heredia C, Martinez X, Moraga Ilop FA, T. A. (2016). *Vacunación selectiva frente al virus del papiloma humano en poblaciones de riesgo elevado. Publicaciones AEPPC.*
- Ciccarese, G., Herzum, A., Reborá, A., & Drago, F. (2017). Prevalence of genital, oral, and anal HPV infection among STI patients in Italy. *Journal of Medical Virology*, 89(6), 1121–1124. <https://doi.org/10.1002/jmv.24746>

- Coello, C., Mata, J. F., Correnti, M., & Hematología-mpps, O. Y. (2017). Detección molecular de la infección por vph en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, 29(3), 194–200.
- Contreras, W., & Venegas, B. (2015). Virus Papiloma Humano en Cáncer Oral y Orofaringeo. Revisión de la Literatura. *Int. J. Odontostomat*, 9(3), 427–435. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2015000300012>
- Cultek. (2016). PCR en Tiempo Real, 1–6. Instruction Manual. <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Q-PCR-Introduccion.pdf>
- D'Hauwers, K. W. M., Cornelissen, T., Depuydt, C. E., Bogers, J., Donders, A. R. T., Leuridan, E., ... Tjalma, W. A. A. (2012). Anal human papillomavirus DNA in women at a colposcopy clinic. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 164(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.05.014>
- Dalgo, P. (2016). *Determinación y genotipificación de HPV en muestras con diagnósticos de cáncer de las regiones orofaríngeo y anogenital procedentes del Hospital de Solca Núcleo de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- de Carvalho, N. S., Ferreira, A. M., & Tremel Bueno, C. C. (2011). HPV infection and intraepithelial lesions from the anal region: How to diagnose? *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(5), 473–477. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70230-6](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70230-6)
- De Santis, S., Spinosi, M. C., Cambi, J., Bengala, C., & Boccuzzi, S. (2017). Oropharyngeal squamous cell carcinoma and HPV. Systematic review on overall management. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 118(2), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2017.02.004>
- De Socio, G. V., Bidovanets, O., Tomassini, G. M., Fanelli, L., & Simonetti, S. (2017). Human Papilloma Virus–Associated Lips Verrucous Carcinoma in HIV-Infected Male. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC)*, 232595741771125. <https://doi.org/10.1177/2325957417711255>
- Elorza, G., Saralegui, Y., Enríquez-Navascués, J. M., Placer, C., & Velaz, L. (2016). Neoplasia intraepitelial anal: Una revisión de conjunto. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 108(1), 31–39.
- Fan, H., & Robetorye, R. S. (2010). Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, 630(1), 199–213. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0>
- Feller, L., Wood, N. H., Khammissa, R. A. G., & Lemmer, J. (2010). Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head & Face Medicine*, 6, 15. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-6-15>

- Fidel, F., Llano, L., González, C. R., Comandante, H., Fajardo, M., & Habana, L. (2017). Prevalencia de infección anal por el virus del papiloma humano en el Hospital “Comandante Manuel Fajardo,” 56(1), 27–36.
- Gallegos-Hernández, J. F., Paredes-Hernández, E., Flores-Díaz, R., Minauro-Muñoz, G., Apresa-García, T., & Hernández-Hernández, D. M. (2007). Virus del papiloma humano asociado a cáncer de cabeza y cuello. *Cirugia Y Cirujanos*, 75(3), 151–155.
- Gheit, T., Anantharaman, D., Holzinger, D., Alemany, L., Tous, S., Prabhu, P. R., ... Rehm, S. (2017). *Role of Mucosal High-Risk Human Papillomavirus Types in Head and Neck Cancers in Central India*, 141, 2–26.
- Hickman, R. A., Bradshaw, A.-D., Cassai, N., Neto, A. G., Zhou, D., Fu, T., ... Wiczorek, R. (2016). A rare case of anal carcinosarcoma with human papilloma virus infection in both biphasic tumor elements: An immunohistochemical, molecular and ultrastructural study. *Papillomavirus Research*, 2(June), 164–166. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2016.09.002>
- Jelassi, R., Abdallah, R. Ben, Chelbi, H., Alaya, N. Ben, Haouet, Al., Bouratbine, A., & Aoun, K. (2016). Comparison of two deparaffinization techniques and three DNA extraction methods from paraffin-embedded biopsies. *Journal of Infection and Molecular Biology*, 4(3), 44–48.
- Khanal, S., Trainor, P. J., Zahin, M., Ghim, S. je, Joh, J., Rai, S. N., ... Shumway, B. S. (2017). Histologic variation in high grade oral epithelial dysplasia when associated with high-risk human papillomavirus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 123(5), 566–585. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.01.008>
- Kim, S. M. (2016). *Human Papilloma Virus in Oral Cancer*, 42, 327–336. Oral and Maxillofacial Microvascular Reconstruction Laboratory. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2016.42.6.327>
- Koncar, R. F., Feldman, R., Bahassi, E. M., & Hashemi Sadraei, N. (2017). Comparative molecular profiling of HPV-induced squamous cell carcinomas. *Cancer Medicine*. <https://doi.org/10.1002/cam4.1108>
- Kost, B., Hofmann, J., Stoellnberger, S., Bergauer, F., Blankenstein, T., Alba-Alejandre, I., ... Gingelmaier, A. (2017). Prevalence of human papillomavirus infection of the anal canal in women: A prospective analysis of high-risk populations. *Oncology Letters*, 13, 2495–2501. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5714>
- Lee, L.-A., Huang, C.-G., Tsao, K.-C., Liao, C.-T., Kang, C.-J., Chang, K.-P., ... Yen, T.-C. (2015). Human Papillomavirus Infections are Common and Predict Mortality in a Retrospective Cohort Study of Taiwanese Patients With Oral Cavity Cancer. *Medicine*, 94(47), e2069. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002069>

- Life technologies. (2013). *PureLink Genomic DNA Kits For Purification of Genomic DNA*. InstructionManual.(25),1–48.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf
- Maestre Rodríguez, O., Cabrera Rodríguez, J., Mateo Arias, J., Monge Gil, F., & González García, R. (2012). Actualización sobre el virus del papiloma humano como factor etiopatogénico y pronóstico en el carcinoma oral de células escamosas. *Rcoe*, 17(2), 105–110.
- Mateos-Lindemann, M. L., Pérez-Castro, S., Rodríguez-Iglesias, M., & Pérez-Gracia, M. T. (2016). Microbiological diagnosis of human papilloma virus infection. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.05.008>
- Meza, G., & Gutierrez, F. (2013). Técnica no convencional de extracción de ADN a partir de tejido embebido en parafina para uso en la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista UDCA Actualidad Y Divulgacion Científica*, 16(1), 35–41.
- Mirghani, H., Sturgis, E. M., Aupérin, A., Monsonogo, J., & Blanchard, P. (2017). Is there an increased risk of cancer among spouses of patients with an HPV-related cancer: A systematic review. *Oral Oncology*, 67, 138–145.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.02.024>
- Motta Vargas, L. A. (2014). *Genotipificación, niveles de expresión y estado de integración del virus de papiloma humano en el carcinoma orofaríngeo de células escamosas*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Nelson, R. A., & Lai, L. L. (2017). Elevated risk of human papillomavirus-related second cancers in survivors of anal canal cancer. *Cancer*, 1–9.
<https://doi.org/10.1002/cncr.30828>
- Ortiz, A. P., Romaguera, J., Pérez, C. M., González, D., Muñoz, C., González, L., ... Palefsky, J. (2016). Prevalence, genotyping, and correlates of anogenital HPV infection in a population-based sample of women in Puerto Rico. *Papillomavirus Research*, 2, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2016.04.002>
- Pacheco, A. C., Valencia, M. H., Quijano, T. H., & Zárata, A. (2012). Terapéutica en infección por virus del papiloma humano, 80(11), 712–719. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/ginobs/mex/gom-2012/gom1211e.pdf>
- Perla, C. A., María Elisa, V. M., Graciela, Z. G., Alma Graciela, G. C., Ixchel Araceli, M. G., & Juan Carlos, C. G. (2015). Presencia del Virus Papiloma Humano en la Cavidad Oral: Revisión y Actualización de la Literatura. *International Journal of Odontostomatology*, 9(2),233–238.Retrievedfrom
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-

381X2015000200009&lang=pt

- Petito, G., Carneiro, M. A. dos S., Santos, S. H. de R., Silva, A. M. T. C., Alencar, R. de C., Gontijo, A. P., & Saddi, V. A. (2017). Papilomavírus humano (HPV) em carcinomas de cavidade oral e orofaringe na região central do Brasil. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 83(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.01.004>
- Rademacher, B. L., Matkowskyj, K. A., Meske, L. M., Romero, A., Sleiman, H., & Carchman, E. H. (2017). The role of pharmacologic modulation of autophagy on anal cancer development in an HPV mouse model of carcinogenesis. *Virology*, 507(March), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.007>
- Rebolledo Cobos, M., Arango Fernández, H., Rebolledo Cobos, R., & Alonso Brujes, I. (2016). Rol del virus del papiloma humano en el desarrollo de carcinoma oral: una revisión. *Avances En Odontoestomatología*, 32(3), 135–44. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852016003300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ríos, H., Ángeles, M. D. L., & Menéndez, M. H. (2013). Papilomavirus humano, su asociación a lesiones Anogenitales en el hombre. *Rev Cub Urol*, 2(1), 81–94.
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). *General Aspects of Structure, Classification and Replication of Human Papillomavirus*, 53(244).S166–S171. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=110960665&lang=es&site=ehost-live>
- Serena-Gómez, E., Eduardo Bologna-Molina, R., Nevarez-Rascon, A., & Rocha Buelvas, A. (2011). Prevalencia del VPH en el Proceso de Malignización de Lesiones de Vías Aérodigestivas Superiores. *Int. J. Odontostomat*, 5(1), 5–12. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2011000100001>
- Snietura, M., Lamch, R., Kopec, A., Waniczek, D., Likus, W., Lange, D., & Markowski, J. (2017). Oral and oropharyngeal papillomas are not associated with high-risk human papillomavirus infection. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4649-x>
- Soria-Céspedes, D., Aguilar, G. C., Lara-Torres, C. O., Sánchez-Marle, J. F., Hernández-Peña, R. E., & Ortiz-Hidalgo, C. (2013). Carcinoma epidermoide orofaríngeo metastásico en ganglios linfáticos cervicales asociado a los subtipos 16 y 45 del virus del papiloma humano (VPH). estudio clínico, morfológico y molecular de dos casos. *Gaceta Medica de Mexico*, 149(6), 673–679.
- Sudenga, S. L., Nyitray, A. G., Torres, B. N., Silva, R., Villa, L., Lazcano-Ponce, E., ...

- Giuliano, A. R. (2017). Comparison of anal HPV natural history among men by country of residence: Brazil, Mexico, and the United States. *Journal of Infection*, *75*(1), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.03.010>
- Tamay de Dios, J., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *2*(5), 299–305. <https://doi.org/10.1157/13059826>
- Toman, J., Von Larson, S., Umeno, H., Kurita, T., Furusaka, T., Hasegawa, H., ... Sasaki, C. T. (2016). HPV-Positive Oropharyngeal Cancer Via p16 Immunohistochemistry in Japan. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, *126*(2), 152–158. <https://doi.org/10.1177/0003489416681582>
- Valmary-Degano, S., Jacquin, E., Prétet, J. L., Monnien, F., Girardo, B., Arbez-Gindre, F., ... Mougín, C. (2013). Signature patterns of human papillomavirus type 16 in invasive anal carcinoma. *Human Pathology*, *44*(6), 992–1002. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.08.019>
- Vega-Malagón, G., Ávila-Morales, J., García-Solís, P., Camacho-Calderón, N., Becerril-Santos, A., & Leo-Amador, G. E. (2014). Infección Por El Virus Del Papiloma Humano. *Biología Molecular. European Scientific Journal*, *10*(18), 352–362.
- Wen, W.-S., Yuan, Z.-M., Ma, S.-J., Xu, J., Yuan, D.-T., & Sciences, L. (2017). *Geographic Heterogeneity in the Prevalence of Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer*, *140*, 1–23. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200179>
- WO, V.-B., Verónica, R.-F., & Yeimer, O.-M. (2017). Virus Del Papiloma Humano: Revisión De La Literatura. *Ciencia E Investigación Médico Estudiantil Latinoamericana*, *22*(1), 72–74. <https://doi.org/10.23961/cimel.2017.221.749>
- Woelber, L., Breuer, J., Meyer, T., Vettorazzi, E., Prieske, K., Bohlmann, I., ... Grimm, D. (2017). Oral Human Papillomavirus in Women With High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, *21*(3), 1. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000313>

ANEXOS

ANEXO I: Detección de HPV mediante PCR tiempo real (Valores de Ct de muestras analizadas validadas)

MUESTRA	TARGET NAME	Ct THRESHOLD	Ct	OBSERVACION
1	B globine	10.000	39,214886	
1	HPV 16	10.000	37,01499	
1	HPV 18	10.000	40.0	
1	HPV 31	10.000	40.0	
1	B globine	10.000	40.0	
1	HPV 39	10.000	40.0	
1	HPV 45	10.000	40.0	
1	HPV 59	10.000	40.0	
1	B globine	10.000	28,143444	
1	HPV 33	10.000	40.0	
1	HPV 35	10.000	40.0	
1	HPV 56	10.000	40.0	
1	B globine	10.000	25,092157	
1	HPV 51	10.000	40.0	
1	HPV 52	10.000	40.0	
1	HPV 58	10.000	29,4191	
4	B globine	10.000	30,778296	
4	HPV 16	10.000	40.0	
4	HPV 18	10.000	40.0	
4	HPV 31	10.000	40.0	
4	B globine	10.000	32,678802	
4	HPV 39	10.000	40.0	
4	HPV 45	10.000	40.0	
4	HPV 59	10.000	40.0	
4	B globine	10.000	33,041866	
4	HPV 33	10.000	40.0	
4	HPV 35	10.000	40.0	
4	HPV 56	10.000	40.0	
4	B globine	10.000	31,551378	
4	HPV 51	10.000	40.0	
4	HPV 52	10.000	40.0	
4	HPV 58	10.000	40.0	
5	B globine	10.000	40.0	
5	HPV 16	10.000	40.0	
5	HPV 18	10.000	40.0	
5	HPV 31	10.000	40.0	
5	B globine	10.000	34,049034	
5	HPV 39	10.000	40.0	

5	HPV 45	10.000	40.0	
5	HPV 59	10.000	40.0	
5	B globine	10.000	40.0	
5	HPV 33	10.000	40.0	
5	HPV 35	10.000	40.0	
5	HPV 56	10.000	38,78185	
5	B globine	10.000	40.0	
5	HPV 51	10.000	40.0	
5	HPV 52	10.000	40.0	
5	HPV 58	10.000	40.0	
6	B globine	10.000	40.0	
6	HPV 16	10.000	40.0	
6	HPV 18	10.000	40.0	
6	HPV 31	10.000	40.0	
6	B globine	10.000	32,436935	
6	HPV 39	10.000	40.0	
6	HPV 45	10.000	40.0	
6	HPV 59	10.000	40.0	
6	B globine	10.000	40.0	
6	HPV 33	10.000	40.0	
6	HPV 35	10.000	40.0	
6	HPV 56	10.000	40.0	
6	B globine	10.000	40.0	
6	HPV 51	10.000	40.0	
6	HPV 52	10.000	40.0	
6	HPV 58	10.000	40.0	
8	B globine	10.000	40.0	
8	HPV 16	10.000	40.0	
8	HPV 18	10.000	40.0	
8	HPV 31	10.000	40.0	
8	B globine	10.000	32,637978	
8	HPV 39	10.000	40.0	
8	HPV 45	10.000	40.0	
8	HPV 59	10.000	40.0	
8	B globine	10.000	34,502224	
8	HPV 33	10.000	39,851322	
8	HPV 35	10.000	40.0	
8	HPV 56	10.000	40.0	
8	B globine	10.000	31,28432	
8	HPV 51	10.000	40.0	
8	HPV 52	10.000	40.0	
8	HPV 58	10.000	40.0	
9	B globine	10.000	32,08962	

9	HPV 16	10.000	40.0	
9	HPV 18	10.000	33,315735	
9	HPV 31	10.000	33,639492	
9	B globine	10.000	29,824787	
9	HPV 39	10.000	40.0	
9	HPV 45	10.000	40.0	
9	HPV 59	10.000	32,924892	Curva no valida
9	B globine	10.000	33,327835	
9	HPV 33	10.000	40.0	
9	HPV 35	10.000	40.0	
9	HPV 56	10.000	40.0	
9	B globine	10.000	31,239866	
9	HPV 51	10.000	40.0	
9	HPV 52	10.000	40.0	
9	HPV 58	10.000	40.0	
10	B globine	10.000	40.0	
10	HPV 16	10.000	40.0	
10	HPV 18	10.000	37,258995	
10	HPV 31	10.000	40.0	
10	B globine	10.000	40.0	
10	HPV 39	10.000	40.0	
10	HPV 45	10.000	40.0	
10	HPV 59	10.000	40.0	
10	B globine	10.000	40.0	
10	HPV 33	10.000	40.0	
10	HPV 35	10.000	40.0	
10	HPV 56	10.000	40.0	
10	B globine	10.000	31,516464	
10	HPV 51	10.000	40.0	
10	HPV 52	10.000	40.0	
10	HPV 58	10.000	40.0	
11	B globine	10.000	37,20942	
11	HPV 16	10.000	40.0	
11	HPV 18	10.000	40.0	
11	HPV 31	10.000	40.0	
11	B globine	10.000	30,650993	
11	HPV 39	10.000	40.0	
11	HPV 45	10.000	40.0	
11	HPV 59	10.000	40.0	
11	B globine	10.000	31,389643	
11	HPV 33	10.000	40.0	
11	HPV 35	10.000	40.0	
11	HPV 56	10.000	40.0	

11	B globine	10.000	30,3393	
11	HPV 51	10.000	40.0	
11	HPV 52	10.000	40.0	
11	HPV 58	10.000	40.0	
12	B globine	10.000	32,43031	
12	HPV 16	10.000	40.0	
12	HPV 18	10.000	40.0	
12	HPV 31	10.000	40.0	
12	B globine	10.000	30,218765	
12	HPV 39	10.000	40.0	
12	HPV 45	10.000	40.0	
12	HPV 59	10.000	40.0	
12	B globine	10.000	30,438677	
12	HPV 33	10.000	40.0	
12	HPV 35	10.000	40.0	
12	HPV 56	10.000	40.0	
12	B globine	10.000	28,814215	
12	HPV 51	10.000	32,47252	Curva no valida
12	HPV 52	10.000	40.0	
12	HPV 58	10.000	37,17568	
13	B globine	10.000	31,036516	
13	HPV 16	10.000	40.0	
13	HPV 18	10.000	40.0	
13	HPV 31	10.000	40.0	
13	B globine	10.000	29,014687	
13	HPV 39	10.000	40.0	
13	HPV 45	10.000	40.0	
13	HPV 59	10.000	40.0	
13	B globine	10.000	30,71673	
13	HPV 33	10.000	40.0	
13	HPV 35	10.000	40.0	
13	HPV 56	10.000	40.0	
13	B globine	10.000	30,55146	
13	HPV 51	10.000	40.0	
13	HPV 52	10.000	40.0	
13	HPV 58	10.000	40.0	
14	B globine	10.000	28,669315	
14	HPV 16	10.000	40.0	
14	HPV 18	10.000	22,261862	Curva no valida
14	HPV 31	10.000	40.0	
14	B globine	10.000	26,205996	
14	HPV 39	10.000	40.0	
14	HPV 45	10.000	40.0	

14	HPV 59	10.000	40.0	
14	B globine	10.000	28,519163	
14	HPV 33	10.000	40.0	
14	HPV 35	10.000	40.0	
14	HPV 56	10.000	31,214563	
14	B globine	10.000	26,802753	
14	HPV 51	10.000	36,861797	
14	HPV 52	10.000	40.0	
14	HPV 58	10.000	40.0	
15	B globine	10.000	40.0	
15	HPV 16	10.000	31,226233	
15	HPV 18	10.000	40.0	
15	HPV 31	10.000	40.0	
15	B globine	10.000	35,555843	
15	HPV 39	10.000	40.0	
15	HPV 45	10.000	40.0	
15	HPV 59	10.000	40.0	
15	B globine	10.000	32,13049	
15	HPV 33	10.000	40.0	
15	HPV 35	10.000	40.0	
15	HPV 56	10.000	40.0	
15	B globine	10.000	33,009285	
15	HPV 51	10.000	40.0	
15	HPV 52	10.000	40.0	
15	HPV 58	10.000	40.0	
17	B globine	10.000	25,62842	
17	HPV 16	10.000	34,268784	Curva no valida
17	HPV 18	10.000	10,154673	Curva no valida
17	HPV 31	10.000	40.0	
17	B globine	10.000	23,860498	
17	HPV 39	10.000	40.0	
17	HPV 45	10.000	40.0	
17	HPV 59	10.000	23,857943	Curva no valida
17	B globine	10.000	25,399563	
17	HPV 33	10.000	40.0	
17	HPV 35	10.000	40.0	
17	HPV 56	10.000	40.0	
17	B globine	10.000	23,125877	
17	HPV 51	10.000	35,514946	
17	HPV 52	10.000	40.0	
17	HPV 58	10.000	40.0	
18	B globine	10.000	32,604626	
18	HPV 16	10.000	36,04667	

18	HPV 18	10.000	37,254585	
18	HPV 31	10.000	40.0	
18	B globine	10.000	29,995983	
18	HPV 39	10.000	40.0	
18	HPV 45	10.000	40.0	
18	HPV 59	10.000	35,269157	
18	B globine	10.000	31,498274	
18	HPV 33	10.000	40.0	
18	HPV 35	10.000	40.0	
18	HPV 56	10.000	40.0	
18	B globine	10.000	28,235113	
18	HPV 51	10.000	30,023575	Curva no valida
18	HPV 52	10.000	40.0	
18	HPV 58	10.000	38,870872	
19	B globine	10.000	21,968006	
19	HPV 16	10.000	20,973913	
19	HPV 18	10.000	40.0	
19	HPV 31	10.000	40.0	
19	B globine	10.000	18,975868	
19	HPV 39	10.000	40.0	
19	HPV 45	10.000	40.0	
19	HPV 59	10.000	40.0	
19	B globine	10.000	20,053116	
19	HPV 33	10.000	40.0	
19	HPV 35	10.000	40.0	
19	HPV 56	10.000	40.0	
19	B globine	10.000	19,42975	
19	HPV 51	10.000	40.0	
19	HPV 52	10.000	40.0	
19	HPV 58	10.000	40.0	
20	B globine	10.000	38,465195	
20	HPV 16	10.000	40.0	
20	HPV 18	10.000	40.0	
20	HPV 31	10.000	40.0	
20	B globine	10.000	29,107092	
20	HPV 39	10.000	40.0	
20	HPV 45	10.000	40.0	
20	HPV 59	10.000	40.0	
20	B globine	10.000	28,444174	
20	HPV 33	10.000	40.0	
20	HPV 35	10.000	40.0	
20	HPV 56	10.000	40.0	
20	B globine	10.000	32,3924	

20	HPV 51	10.000	40.0	
20	HPV 52	10.000	40.0	
20	HPV 58	10.000	40.0	
22	B globine	10.000	26,267609	
22	HPV 16	10.000	40.0	
22	HPV 18	10.000	40.0	
22	HPV 31	10.000	40.0	
22	B globine	10.000	22,807781	
22	HPV 39	10.000	40.0	
22	HPV 45	10.000	40.0	
22	HPV 59	10.000	40.0	
22	B globine	10.000	23,837816	
22	HPV 33	10.000	40.0	
22	HPV 35	10.000	40.0	
22	HPV 56	10.000	40.0	
22	B globine	10.000	22,98351	
22	HPV 51	10.000	40.0	
22	HPV 52	10.000	40.0	
22	HPV 58	10.000	40.0	
23	B globine	10.000	25,049671	
23	HPV 16	10.000	40.0	
23	HPV 18	10.000	40.0	
23	HPV 31	10.000	40.0	
23	B globine	10.000	21,776613	
23	HPV 39	10.000	40.0	
23	HPV 45	10.000	40.0	
23	HPV 59	10.000	40.0	
23	B globine	10.000	22,992716	
23	HPV 33	10.000	40.0	
23	HPV 35	10.000	40.0	
23	HPV 56	10.000	40.0	
23	B globine	10.000	22,083038	
23	HPV 51	10.000	40.0	
23	HPV 52	10.000	40.0	
23	HPV 58	10.000	32,278595	
24	B globine	10.000	38,24757	
24	HPV 16	10.000	40.0	
24	HPV 18	10.000	31,86516	
24	HPV 31	10.000	40.0	
24	B globine	10.000	30,152792	
24	HPV 39	10.000	40.0	
24	HPV 45	10.000	40.0	
24	HPV 59	10.000	40.0	

24	B globine	10.000	31,845226	
24	HPV 33	10.000	40.0	
24	HPV 35	10.000	40.0	
24	HPV 56	10.000	40.0	
24	B globine	10.000	29,925531	
24	HPV 51	10.000	40.0	
24	HPV 52	10.000	40.0	
24	HPV 58	10.000	40.0	
26	B globine	10.000	29,816185	
26	HPV 16	10.000	40.0	
26	HPV 18	10.000	35,48234	
26	HPV 31	10.000	35,943382	
26	B globine	10.000	26,67717	
26	HPV 39	10.000	40.0	
26	HPV 45	10.000	40.0	
26	HPV 59	10.000	40.0	
26	B globine	10.000	27,847048	
26	HPV 33	10.000	40.0	
26	HPV 35	10.000	40.0	
26	HPV 56	10.000	40.0	
26	B globine	10.000	27,059114	
26	HPV 51	10.000	40.0	
26	HPV 52	10.000	40.0	
26	HPV 58	10.000	40.0	
27	B globine	10.000	31,359024	
27	HPV 16	10.000	40.0	
27	HPV 18	10.000	40.0	
27	HPV 31	10.000	40.0	
27	B globine	10.000	27,72181	
27	HPV 39	10.000	40.0	
27	HPV 45	10.000	40.0	
27	HPV 59	10.000	40.0	
27	B globine	10.000	28,897682	
27	HPV 33	10.000	40.0	
27	HPV 35	10.000	40.0	
27	HPV 56	10.000	40.0	
27	B globine	10.000	27,809956	
27	HPV 51	10.000	40.0	
27	HPV 52	10.000	40.0	
27	HPV 58	10.000	40.0	
28	B globine	10.000	23,916883	
28	HPV 16	10.000	40.0	
28	HPV 18	10.000	40.0	

28	HPV 31	10.000	40.0	
28	B globine	10.000	27,529274	
28	HPV 39	10.000	29,033161	
28	HPV 45	10.000	40.0	
28	HPV 59	10.000	32,391438	Curva no valida
28	B globine	10.000	26,695778	
28	HPV 33	10.000	40.0	
28	HPV 35	10.000	40.0	
28	HPV 56	10.000	40.0	
28	B globine	10.000	40.0	
28	HPV 51	10.000	40.0	
28	HPV 52	10.000	40.0	
28	HPV 58	10.000	40.0	
29	B globine	10.000	20,67064	
29	HPV 16	10.000	29,02144	
29	HPV 18	10.000	29,422783	
29	HPV 31	10.000	40.0	
29	B globine	10.000	21,651342	
29	HPV 39	10.000	40.0	
29	HPV 45	10.000	40.0	
29	HPV 59	10.000	40.0	
29	B globine	10.000	20,76449	
29	HPV 33	10.000	40.0	
29	HPV 35	10.000	40.0	
29	HPV 56	10.000	40.0	
29	B globine	10.000	22,13235	
29	HPV 51	10.000	40.0	
29	HPV 52	10.000	40.0	
29	HPV 58	10.000	40.0	
31	B globine	10.000	18,508541	
31	HPV 16	10.000	25,14981	
31	HPV 18	10.000	40.0	
31	HPV 31	10.000	40.0	
31	B globine	10.000	19,336756	
31	HPV 39	10.000	40.0	
31	HPV 45	10.000	40.0	
31	HPV 59	10.000	40.0	
31	B globine	10.000	18,420702	
31	HPV 33	10.000	40.0	
31	HPV 35	10.000	40.0	
31	HPV 56	10.000	40.0	
31	B globine	10.000	18,891874	
31	HPV 51	10.000	40.0	

31	HPV 52	10.000	40.0	
31	HPV 58	10.000	40.0	
32	B globine	10.000	17,09273	
32	HPV 16	10.000	40.0	
32	HPV 18	10.000	40.0	
32	HPV 31	10.000	40.0	
32	B globine	10.000	18,53594	
32	HPV 39	10.000	40.0	
32	HPV 45	10.000	40.0	
32	HPV 59	10.000	40.0	
32	B globine	10.000	17,259697	
32	HPV 33	10.000	40.0	
32	HPV 35	10.000	40.0	
32	HPV 56	10.000	40.0	
32	B globine	10.000	17,033857	
32	HPV 51	10.000	40.0	
32	HPV 52	10.000	40.0	
32	HPV 58	10.000	40.0	
33	B globine	10.000	21,873535	
33	HPV 16	10.000	30,360542	
33	HPV 18	10.000	40.0	
33	HPV 31	10.000	40.0	
33	B globine	10.000	23,22441	
33	HPV 39	10.000	40.0	
33	HPV 45	10.000	40.0	
33	HPV 59	10.000	40.0	
33	B globine	10.000	20,885176	
33	HPV 33	10.000	40.0	
33	HPV 35	10.000	40.0	
33	HPV 56	10.000	40.0	
33	B globine	10.000	21,619982	
33	HPV 51	10.000	40.0	
33	HPV 52	10.000	40.0	
33	HPV 58	10.000	40.0	
34	B globine	10.000	23,844635	
34	HPV 16	10.000	40.0	
34	HPV 18	10.000	40.0	
34	HPV 31	10.000	40.0	
34	B globine	10.000	26,055573	
34	HPV 39	10.000	40.0	
34	HPV 45	10.000	40.0	
34	HPV 59	10.000	40.0	
34	B globine	10.000	24,357552	

34	HPV 33	10.000	40.0	
34	HPV 35	10.000	40.0	
34	HPV 56	10.000	40.0	
34	B globine	10.000	24,295662	
34	HPV 51	10.000	40.0	
34	HPV 52	10.000	40.0	
34	HPV 58	10.000	40.0	
37	B globine	10.000	21,301462	
37	HPV 16	10.000	40.0	
37	HPV 18	10.000	40.0	
37	HPV 31	10.000	40.0	
37	B globine	10.000	23,224007	
37	HPV 39	10.000	40.0	
37	HPV 45	10.000	40.0	
37	HPV 59	10.000	40.0	
37	B globine	10.000	21,23321	
37	HPV 33	10.000	40.0	
37	HPV 35	10.000	40.0	
37	HPV 56	10.000	40.0	
37	B globine	10.000	20,890081	
37	HPV 51	10.000	40.0	
37	HPV 52	10.000	40.0	
37	HPV 58	10.000	40.0	
39	B globine	10.000	23,091677	
39	HPV 16	10.000	31,58752	
39	HPV 18	10.000	40.0	
39	HPV 31	10.000	40.0	
39	B globine	10.000	25,218678	
39	HPV 39	10.000	40.0	
39	HPV 45	10.000	40.0	
39	HPV 59	10.000	40.0	
39	B globine	10.000	23,31368	
39	HPV 33	10.000	40.0	
39	HPV 35	10.000	40.0	
39	HPV 56	10.000	40.0	
39	B globine	10.000	20,415688	
39	HPV 51	10.000	24,998653	
39	HPV 52	10.000	28,644386	
39	HPV 58	10.000	26,421246	
40	B globine	10.000	28,543316	
40	HPV 16	10.000	40.0	
40	HPV 18	10.000	40.0	
40	HPV 31	10.000	40.0	

40	B globine	10.000	26,104921	
40	HPV 39	10.000	40.0	
40	HPV 45	10.000	40.0	
40	HPV 59	10.000	40.0	
40	B globine	10.000	33,415558	
40	HPV 33	10.000	40.0	
40	HPV 35	10.000	40.0	
40	HPV 56	10.000	40.0	
40	B globine	10.000	26,818836	
40	HPV 51	10.000	40.0	
40	HPV 52	10.000	40.0	
40	HPV 58	10.000	40.0	
42	B globine	10.000	20,706701	
42	HPV 16	10.000	40.0	
42	HPV 18	10.000	40.0	
42	HPV 31	10.000	40.0	
42	B globine	10.000	19,142048	
42	HPV 39	10.000	29,807522	
42	HPV 45	10.000	40.0	
42	HPV 59	10.000	40.0	
42	B globine	10.000	22,96432	
42	HPV 33	10.000	40.0	
42	HPV 35	10.000	40.0	
42	HPV 56	10.000	40.0	
42	B globine	10.000	19,395933	
42	HPV 51	10.000	40.0	
42	HPV 52	10.000	40.0	
42	HPV 58	10.000	40.0	
45	B globine	10.000	31,302114	
45	HPV 16	10.000	40.0	
45	HPV 18	10.000	40.0	
45	HPV 31	10.000	40.0	
45	B globine	10.000	20,254591	
45	HPV 39	10.000	40.0	
45	HPV 45	10.000	40.0	
45	HPV 59	10.000	40.0	
45	B globine	10.000	24,521757	
45	HPV 33	10.000	40.0	
45	HPV 35	10.000	40.0	
45	HPV 56	10.000	40.0	
45	B globine	10.000	20,23558	
45	HPV 51	10.000	40.0	
45	HPV 52	10.000	40.0	

45	HPV 58	10.000	40.0	
46	B globine	10.000	24,202307	
46	HPV 16	10.000	40.0	
46	HPV 18	10.000	40.0	
46	HPV 31	10.000	40.0	
46	B globine	10.000	20,27233	
46	HPV 39	10.000	40.0	
46	HPV 45	10.000	40.0	
46	HPV 59	10.000	40.0	
46	B globine	10.000	25,78695	
46	HPV 33	10.000	40.0	
46	HPV 35	10.000	40.0	
46	HPV 56	10.000	40.0	
46	B globine	10.000	23,125639	
46	HPV 51	10.000	40.0	
46	HPV 52	10.000	40.0	
46	HPV 58	10.000	40.0	
47	B globine	10.000	20,392405	
47	HPV 16	10.000	40.0	
47	HPV 18	10.000	40.0	
47	HPV 31	10.000	40.0	
47	B globine	10.000	19,412973	
47	HPV 39	10.000	40.0	
47	HPV 45	10.000	40.0	
47	HPV 59	10.000	40.0	
47	B globine	10.000	23,038748	
47	HPV 33	10.000	40.0	
47	HPV 35	10.000	36,631134	
47	HPV 56	10.000	35,613407	
47	B globine	10.000	19,326216	
47	HPV 51	10.000	40.0	
47	HPV 52	10.000	40.0	
47	HPV 58	10.000	31,020802	
48	B globine	10.000	19,339212	
48	HPV 16	10.000	40.0	
48	HPV 18	10.000	40.0	
48	HPV 31	10.000	40.0	
48	B globine	10.000	18,400595	
48	HPV 39	10.000	40.0	
48	HPV 45	10.000	40.0	
48	HPV 59	10.000	40.0	
48	B globine	10.000	23,400484	
48	HPV 33	10.000	40.0	

48	HPV 35	10.000	36,631134	
48	HPV 56	10.000	33,697384	Curva no valida
48	B globine	10.000	22,46111	
48	HPV 51	10.000	40.0	
48	HPV 52	10.000	40.0	
48	HPV 58	10.000	40.0	
52	B globine	10.000	25,3001	
52	HPV 16	10.000	40.0	
52	HPV 18	10.000	40.0	
52	HPV 31	10.000	40.0	
52	B globine	10.000	23,859858	
52	HPV 39	10.000	40.0	
52	HPV 45	10.000	34,031887	Curva no valida
52	HPV 59	10.000	30,168478	Curva no valida
52	B globine	10.000	24,299105	
52	HPV 33	10.000	40.0	
52	HPV 35	10.000	40.0	
52	HPV 56	10.000	40.0	
52	B globine	10.000	37,705463	
52	HPV 51	10.000	40.0	
52	HPV 52	10.000	40.0	
52	HPV 58	10.000	40.0	
53	B globine	10.000	17,053532	
53	HPV 16	10.000	40.0	
53	HPV 18	10.000	40.0	
53	HPV 31	10.000	40.0	
53	B globine	10.000	17,10858	
53	HPV 39	10.000	40.0	
53	HPV 45	10.000	40.0	
53	HPV 59	10.000	40.0	
53	B globine	10.000	17,18986	
53	HPV 33	10.000	40.0	
53	HPV 35	10.000	40.0	
53	HPV 56	10.000	40.0	
53	B globine	10.000	25,991585	
53	HPV 51	10.000	40.0	
53	HPV 52	10.000	40.0	
53	HPV 58	10.000	40.0	
54	B globine	10.000	40.0	
54	HPV 16	10.000	40.0	
54	HPV 18	10.000	40.0	
54	HPV 31	10.000	40.0	
54	B globine	10.000	25,128332	

54	HPV 39	10.000	40.0	
54	HPV 45	10.000	39,37927	
54	HPV 59	10.000	40.0	
54	B globine	10.000	25,72809	
54	HPV 33	10.000	31,044231	
54	HPV 35	10.000	40.0	
54	HPV 56	10.000	40.0	
54	B globine	10.000	40.0	
54	HPV 51	10.000	40.0	
54	HPV 52	10.000	40.0	
54	HPV 58	10.000	40.0	
55	B globine	10.000	40.0	
55	HPV 16	10.000	40.0	
55	HPV 18	10.000	40.0	
55	HPV 31	10.000	40.0	
55	B globine	10.000	22,736929	
55	HPV 39	10.000	40.0	
55	HPV 45	10.000	40.0	
55	HPV 59	10.000	40.0	
55	B globine	10.000	25,625196	
55	HPV 33	10.000	31,928144	
55	HPV 35	10.000	40.0	
55	HPV 56	10.000	40.0	
55	B globine	10.000	40.0	
55	HPV 51	10.000	40.0	
55	HPV 52	10.000	40.0	
55	HPV 58	10.000	40.0	
57	B globine	10.000	26,006485	
57	HPV 16	10.000	40.0	
57	HPV 18	10.000	16,723467	
57	HPV 31	10.000	16,702335	
57	B globine	10.000	20,50747	
57	HPV 39	10.000	40.0	
57	HPV 45	10.000	40.0	
57	HPV 59	10.000	40.0	
57	B globine	10.000	18,958824	
57	HPV 33	10.000	40.0	
57	HPV 35	10.000	40.0	
57	HPV 56	10.000	38,963886	
57	B globine	10.000	37,113674	
57	HPV 51	10.000	39,561134	
57	HPV 52	10.000	40.0	
57	HPV 58	10.000	40.0	

59	B globine	10.000	23,009296	
59	HPV 16	10.000	40.0	
59	HPV 18	10.000	40.0	
59	HPV 31	10.000	40.0	
59	B globine	10.000	24,29279	
59	HPV 39	10.000	40.0	
59	HPV 45	10.000	40.0	
59	HPV 59	10.000	40.0	
59	B globine	10.000	29,858465	
59	HPV 33	10.000	40.0	
59	HPV 35	10.000	40.0	
59	HPV 56	10.000	40.0	
59	B globine	10.000	40.0	
59	HPV 51	10.000	40.0	
59	HPV 52	10.000	40.0	
59	HPV 58	10.000	40.0	
60	B globine	10.000	40.0	
60	HPV 16	10.000	40.0	
60	HPV 18	10.000	40.0	
60	HPV 31	10.000	40.0	
60	B globine	10.000	31,140015	
60	HPV 39	10.000	40.0	
60	HPV 45	10.000	40.0	
60	HPV 59	10.000	40.0	
60	B globine	10.000	40.0	
60	HPV 33	10.000	40.0	
60	HPV 35	10.000	40.0	
60	HPV 56	10.000	40.0	
60	B globine	10.000	40.0	
60	HPV 51	10.000	40.0	
60	HPV 52	10.000	40.0	
60	HPV 58	10.000	40.0	
64	B globine	10.000	40.0	
64	HPV 16	10.000	40.0	
64	HPV 18	10.000	40.0	
64	HPV 31	10.000	40.0	
64	B globine	10.000	31,006119	
64	HPV 39	10.000	40.0	
64	HPV 45	10.000	40.0	
64	HPV 59	10.000	40.0	
64	B globine	10.000	33,496296	
64	HPV 33	10.000	40.0	
64	HPV 35	10.000	40.0	

64	HPV 56	10.000	40.0	
64	B globine	10.000	40.0	
64	HPV 51	10.000	40.0	
64	HPV 52	10.000	40.0	
64	HPV 58	10.000	40.0	
67	B globine	10.000	40.0	
67	HPV 16	10.000	40.0	
67	HPV 18	10.000	32,980846	
67	HPV 31	10.000	40.0	
67	B globine	10.000	40.0	
67	HPV 39	10.000	40.0	
67	HPV 45	10.000	40.0	
67	HPV 59	10.000	40.0	
67	B globine	10.000	34,483932	
67	HPV 33	10.000	40.0	
67	HPV 35	10.000	40.0	
67	HPV 56	10.000	40.0	
67	B globine	10.000	40.0	
67	HPV 51	10.000	40.0	
67	HPV 52	10.000	40.0	
67	HPV 58	10.000	40.0	
68	B globine	10.000	40.0	
68	HPV 16	10.000	40.0	
68	HPV 18	10.000	40.0	
68	HPV 31	10.000	40.0	
68	B globine	10.000	40.0	
68	HPV 39	10.000	40.0	
68	HPV 45	10.000	40.0	
68	HPV 59	10.000	40.0	
68	B globine	10.000	31,792936	
68	HPV 33	10.000	40.0	
68	HPV 35	10.000	40.0	
68	HPV 56	10.000	29,093565	
68	B globine	10.000	40.0	
68	HPV 51	10.000	40.0	
68	HPV 52	10.000	40.0	
68	HPV 58	10.000	40.0	
70	B globine	10.000	35,7984	
70	HPV 16	10.000	40.0	
70	HPV 18	10.000	40.0	
70	HPV 31	10.000	40.0	
70	B globine	10.000	40.0	
70	HPV 39	10.000	40.0	

70	HPV 45	10.000	40.0	
70	HPV 59	10.000	40.0	
70	B globine	10.000	31,746965	
70	HPV 33	10.000	40.0	
70	HPV 35	10.000	40.0	
70	HPV 56	10.000	40.0	
70	B globine	10.000	40.0	
70	HPV 51	10.000	40.0	
70	HPV 52	10.000	40.0	
70	HPV 58	10.000	40.0	
71	B globine	10.000	30,915686	
71	HPV 16	10.000	40.0	
71	HPV 18	10.000	34,11748	Curva no valida
71	HPV 31	10.000	36,24525	
71	B globine	10.000	37,820457	
71	HPV 39	10.000	40.0	
71	HPV 45	10.000	40.0	
71	HPV 59	10.000	40.0	
71	B globine	10.000	28,209055	
71	HPV 33	10.000	40.0	
71	HPV 35	10.000	40.0	
71	HPV 56	10.000	40.0	
71	B globine	10.000	40.0	
71	HPV 51	10.000	40.0	
71	HPV 52	10.000	40.0	
71	HPV 58	10.000	40.0	
72	B globine	10.000	33,30577	
72	HPV 16	10.000	40.0	
72	HPV 18	10.000	32,918648	
72	HPV 31	10.000	40.0	
72	B globine	10.000	40.0	
72	HPV 39	10.000	40.0	
72	HPV 45	10.000	40.0	
72	HPV 59	10.000	40.0	
72	B globine	10.000	29,998028	
72	HPV 33	10.000	40.0	
72	HPV 35	10.000	40.0	
72	HPV 56	10.000	40.0	
72	B globine	10.000	40.0	
72	HPV 51	10.000	40.0	
72	HPV 52	10.000	40.0	
72	HPV 58	10.000	40.0	
73	B globine	10.000	40.0	

73	HPV 16	10.000	40.0	
73	HPV 18	10.000	40.0	
73	HPV 31	10.000	40.0	
73	B globine	10.000	40.0	
73	HPV 39	10.000	40.0	
73	HPV 45	10.000	40.0	
73	HPV 59	10.000	40.0	
73	B globine	10.000	32,49843	
73	HPV 33	10.000	40.0	
73	HPV 35	10.000	40.0	
73	HPV 56	10.000	40.0	
73	B globine	10.000	40.0	
73	HPV 51	10.000	40.0	
73	HPV 52	10.000	40.0	
73	HPV 58	10.000	40.0	
C+	B globine	10.000	19,466173	
C+	HPV 16	10.000	25,834093	
C+	HPV 18	10.000	24,469091	
C+	HPV 31	10.000	26,73407	
C-	B globine	10.000	40.0	
C-	HPV 16	10.000	40.0	
C-	HPV 18	10.000	40.0	
C-	HPV 31	10.000	40.0	
C+	B globine	10.000	18,827696	
C+	HPV 39	10.000	25,746353	
C+	HPV 45	10.000	27,166758	
C+	HPV 59	10.000	24,027258	
C-	B globine	10.000	40.0	
C-	HPV 39	10.000	40.0	
C-	HPV 45	10.000	40.0	
C-	HPV 59	10.000	40.0	
C+	B globine	10.000	19,587704	
C+	HPV 33	10.000	29,692904	
C+	HPV 35	10.000	23,180935	
C+	HPV 56	10.000	23,039137	
C-	B globine	10.000	40.0	
C-	HPV 33	10.000	40.0	
C-	HPV 35	10.000	40.0	
C-	HPV 56	10.000	40.0	
C+	B globine	10.000	18,465012	
C+	HPV 51	10.000	24,309353	
C+	HPV 52	10.000	26,009277	
C+	HPV 58	10.000	25,311062	

C-	B globine	10.000	40.0	
C-	HPV 51	10.000	40.0	
C-	HPV 52	10.000	40.0	
C-	HPV 58	10.000	40.0	