

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
UNIDAD DE POSGRADO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL GRADO
ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**“IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
(HPV) MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL Y DOT BLOT
REVERSO EN PACIENTES DEL HOSPITAL LUIS VERNAZA,
DURANTE ABRIL 2015 A MARZO 2016”.**

AUTOR (A): LCDA. LISSETTE YAMEL RIVERA ZAVALA

TUTOR (A): DR. HÉCTOR XAVIER ZAMBRANO MANRIQUE

GUAYAQUIL – ECUADOR

NOVIEMBRE 2016



REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA		
FICHA DE REGISTRO DE TESIS		
TÍTULO Y SUBTÍTULO: "Identificación del virus del papiloma humano (HPV) mediante PCR en Tiempo Real y Dot Blot Reverso en pacientes del Hospital Luis Vernaza, durante abril 2015 a marzo 2016".		
AUTOR: Lcda. Lissette Yamel Rivera Zavala	TUTOR: Dr. Héctor Xavier Zambrano Manrique	
	REVISORES: Ing. Sisiana Chávez Chica, Mg.	
INSTITUCIÓN: Universidad de Guayaquil	FACULTAD: Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo	
CARRERA: Maestría en Biotecnología Molecular		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	No. DE PÁGS:	
TÍTULO OBTENIDO: LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO		
ÁREAS TEMÁTICAS: (el área al que se refiere el trabajo. Ej. Auditoría Financiera, Auditoria, Finanzas).		
PALABRAS CLAVE: Virus del papiloma Humano, cáncer de útero, lesiones intraepiteliales, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Dot Blot Reverso.		
RESUMEN: El Virus del Papiloma Humano (HPV) es causante de una infección de transmisión sexual, más frecuente en el mundo, asociada con el cáncer de cuello uterino, que constituye un problema de salud pública, tiene como objetivo identificar el HPV en pacientes del área de consulta externa del Hospital General Luis Vernaza, en el periodo abril de 2015 a marzo 2016. Es un estudio de corte transversal, descriptivo con enfoque cualitativo, en un universo de 4 237 pacientes de 18 a 75 años, el tamaño de la muestra responde al número de 1 771, entre ellos 1 602 mujeres y 169 hombres. La prevalencia de HPV en mujeres fue 249 pacientes, lo que representa un 16 % de positividad. En hombres se identificaron 30 casos positivos, lo que indica el 18 % de positividad, de estos 15 con infecciones de alto riesgo y 15 con infecciones de bajo riesgo. Se llegó a la conclusión que la incidencia presentada en esta investigación permite sugerir que se considere la realización de diagnósticos moleculares para la prevención de futuros cánceres.		
No. DE REGISTRO (en base de datos):	No. DE CLASIFICACIÓN:	
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
CONTACTO CON AUTOR/ES	Teléfono: 0969358378	E-mail: lissrivera89@gmail.com
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Unidad de Posgrado Investigación y Desarrollo	
	Teléfono: 2325530-38 Ext. 114	
	E-mail: upid@ug.edu.ec	

CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular, nombrado por el Director General de la Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo, CERTIFICO: que he analizado la Tesis presentada, como requisito para optar el grado académico de Magíster en Biotecnología Molecular titulada: "Identificación del virus del papiloma humano (HPV) mediante PCR en Tiempo Real y Dot Blot Reverso en pacientes del Hospital Luis Vernaza, durante abril 2015 a marzo 2016".

La cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de posgrado.

Firma

Guayaquil, 18 de noviembre del 2016

Dr. Héctor Xavier Zambrano Manrique
C.I.0915827562

CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO

Dra. Rosa Olmedo Noriega, con registro del SENESCYT 1006-06-722799, por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR**: Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado, elaborado (a) por el Señor (a) Lisette Yamel Rivera Zavala, con C.I.1205595422, previo a la obtención del título de MAGISTER EN Biotecnología Molecular.

Tema de tesis:

“Identificación del virus del papiloma humano (HPV) mediante PCR en Tiempo Real y Dot Blot Reverso en pacientes del Hospital Luis Vernaza, durante abril 2015 a marzo 2016”.

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.

Dra. Rosa Olmedo Noriega
C.I. 091289431-8
Reg. 1006-06-722799

Telf. 0993774324
Olmedorosa1@hotmail.com

DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR

Yo, Lissette Yamel Rivera Zavala, declaro bajo juramento ante la Dirección de Posgrado de la Universidad de Guayaquil, que el trabajo aquí descrito, así como sus resultados, conclusiones y recomendaciones, presentado es de mi autoría y exclusiva responsabilidad, que es inédito y no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

La reproducción total o parcial de esta tesis en forma idéntica o modificada, no autorizada por los editores transgrede los derechos de autoría. Cualquier utilización debe ser previamente solicitada a la Universidad de Guayaquil, a través de la Dirección de Posgrado o al autor.

Firma. -----
C.I. 120559542-2

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Zambrano Feje del área de Biología Molecular del hospital General Luis Vernaza por el incondicional apoyo, sus importantes opiniones y sugerencias para la ejecución de la presente investigación y sobre todo por su paciencia.

A la Lcda. Cathy Ordoñez que gentilmente y con enorme entusiasmo proporcionó su ayuda para la ejecución del desarrollo de esta investigación.

Al QF. José Landivar y MSc. Marcela Vega por compartir desinteresadamente sus conocimientos.

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a mis padres por haberme forjado por la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. A mi hermana por lo que representa para mí y por ser parte importante de una hermosa familia unida.

Gracias padres y hermana.

ÌNDICE

Pág.		
	INTRODUCCIÓN	1
	CAPÍTULO I	
	1. Formulación del problema y justificación e importancia	3
	1.2. Objetivos	5
	1.2.1. Objetivo General	5
	1.2.2. Objetivos Específicos	5
	1.3. Hipótesis	5
	CAPÍTULO II	
	2. MARCO TEÓRICO	6
	2.1. Cáncer Cèrvicouterino	6
	2.1.1. Historia natural y epidemiología	6
	2.1.2. Estructura, acción patógena y clasificación del HPV	9
	2.1.3. Clasificación de las lesiones intraepiteliales cervical	16
	2.1.4. Tipos de HPV de acuerdo a su potencial de causar cáncer cervicouterino	19
	2.1.5. Diagnóstico de la patología cervical y el HPV	21
	2.1.6. Tratamiento y prevención de las lesiones cervicales y Uretrales	21
	2.1.7. Inmunización	27
	2.1.8. Infección por HPV en hombres	30
	2.1.9. Introducción de los métodos de detección del HPV	32
	2.1.9.1. Diagnóstico morfológico	34
	2.1.9.2. Diagnóstico inmunohistoquímico	34
	2.1.9.3. Métodos de biología molecular	36
	2.1.9.3. ADN recombinante sondas y técnicas utilizadas En biología molecular	37
	2.1.9.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	38
	2.1.9.3.2. DotBlot Reverso	41
	2.1.9.3.3. Hibridación in situ	46
	2.1.9.3.4. Secuenciación de genes	47
	2.1.9.3.5. Secuenciación automatizada	50
	2.1.9.4. Programas bioinformáticos de análisis	52
	2.1.9.5. El HPV y el sistema inmune	53
	CAPÍTULO III	
	3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
	3.1. MATERIALES	55
	3.1.1. Manejo y ejecución de la investigación	55

3.1.2. Localización socio-geográfica	55
3.1.3. Recursos empleados	55
3.1.3.1. Recursos humanos	55
3.1.3.2. Recursos de laboratorio y oficina	56
3.2. MÉTODOS	57
3.2.1. Diseño de la investigación	57
3.2.1.1. Tipo de investigación	57
3.2.1.2. Enfoque del estudio	57
3.2.1.3. Universo y tamaño de la muestra	57
3.2.1.3.1. Universo	57
3.2.1.4. Muestreo	57
3.2.1.5. Criterios de inclusión	57
3.2.1.6. Criterios de exclusión	57
3.2.1.7. Aspectos éticos y legales	57
3.2.2. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	57
3.2.3. Métodos y técnicas de laboratorio	58
3.2.3.1. Procedimiento para la toma de las muestras	58
3.2.3.1.1. Toma de muestra en mujeres	60
3.2.3.1.2. Reactivo utilizados	60
3.2.3.2. Extracción de ADN	63
3.2.3.2.1. PCR en Tiempo Real	63
3.2.3.3. Detección del HPV	64
3.2.3.4. Identificación de los genotipos virales	64
3.2.4. Procedimientos de datos y análisis de resultado	64
3.3.3.7. Interpretación de resultados	65

CAPÍTULO IV

RESULTADOS	66
4.1 Infección de HPV en mujeres	66
4.2. Resultados de infección de HPV en hombres	70
4.3. DISCUSIÓN	75
4.3.1. HPV en mujeres	75
4.3.2. HPV en hombres	77

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
5.1. CONCLUSIONES	79
5.2. RECOMENDACIONES	80
6. BIBLIOGRAFIA	81

ANEXO

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 2.1 Características de las vacunas contra el HPV y otros aspectos	28
Tabla 3.1 reactivos empleados para extracción y amplificación de muestras cervicales	59
Tabla 3.2 reactivos empleados para extracción y amplificación demuestras uretrales	63
Tabla 4. Frecuencia de infecciones de HPV en 1602 mujeres	67
Tabla 4.1 Frecuencia de infecciones simples de HPV	67
Tabla 4.2 Frecuencia de coinfecciones múltiples	68
Tabla 4.3 Frecuencia 1 602 mujeres que asistieron a Consulta ginecológica	68
Tabla 4.4 Signo más frecuente estudiado en mujeres	69
Tabla 4.5 Signo más frecuente estudiado en mujeres Por motivo de consulta	69
Tabla 4.6 Mayor número de casos según porcentaje	70
Tabla 4.7 Signo más frecuente estudiado en mujeres	71
Tabla 4.8 Frecuencia de genotipo de alto riesgo	72
Tabla 4.9 Frecuencia de genotipos de bajo riesgo	72
Tabla 4.10 Detección de HPV de acuerdo a edad cronológica	
Tabla 4.11 Frecuencia de 169 hombre que asistieron A consulta con el urólogo	73
Tabla 4.12 Signo más frecuente estudiado en hombres	74
Tabla 4.13 Segundo signo más frecuente estudiado en hombres Por motivo de consulta	74

RESUMEN

Antecedentes: El Virus del Papiloma Humano (HPV) es causante de una infección de transmisión sexual, más frecuente en el mundo, asociada con el cáncer de cuello uterino, que constituye un problema de salud pública.

Objetivo: Identificar el virus de papiloma humano en pacientes del área de consulta externa del Hospital General Luis Vernaza, en el periodo abril de 2015 a marzo 2016.

Diseño metodológico: Estudio de corte transversal, descriptivo con enfoque cualitativo, en un universo de 4 237 pacientes de 18 a 75 años, el tamaño de la muestra responde al número de 1 771, entre ellos 1602 mujeres y 169 hombres, obtenida según los criterios de inclusión y exclusión definidos para este estudio.

Resultados: La prevalencia de HPV en mujeres fue 249 pacientes, lo que representa un 16 % de positividad. De estos, en 206 pacientes se identificó la presencia de infecciones simples y en 43 pacientes con infecciones múltiples. En hombres se identificaron 30 casos positivos, lo que indicó el 18 % de positividad, de estos 15 con infecciones de alto riesgo y 15 con infecciones de bajo riesgo. El genotipo de alto riesgo más identificado en el estudio fue el HPV 45 (13.3%) y de bajo riesgo fue el genotipo HPV 6 (16.7 %).

Conclusión: La incidencia presentada en esta investigación permite sugerir que se considere la realización de diagnósticos moleculares para la prevención de futuros cánceres.

Claves: Virus del papiloma Humano, cáncer de útero, lesiones intraepiteliales, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Dot Blot Reverso.

ABSTRACT

Background:The Human Papillomavirus (HPV) causes a sexual transmitted disease, very common around the world. It is associated with the cervical cancer, which is a wealth issue.

Objective: Identify the Human Papillomavirus in patients from the health external services of the Luis Vernaza Hospital, in the period between April 2015 to March 2016.

Methodology:A descriptive cross-sectional study with qualitative approach in a 4 237 patient universe, from 18 to 75 years old. The sample size was of 1771 patients, between 1 602 women and 169 men, obtained according to inclusion and exclusion criteria defined in this study.

Results:The prevalence was of 249 patients, which represents a 16 % of positive results. From them, 206 patients had simple infections and 43 had multiple infections. In men, 30 were positive, which represented a 18 % of positive results, 15 of them with high-risk infections and 15 with low-risk infections. The most high-risk genotype identified was the HPV 45 (13.3 %) and the low-risk genotype was the HPV 6 (16.7 %).

Conclusions:The infectious incidence presented in this research permit to suggest the performance of molecular diagnosis to prevent a further development of cancer.

KEY: Human papillomavirus, uterine cancer, squamous intraepithelial lesions, PCR Real Time, Dot Blot Reverse.

INTRODUCCIÓN

En la última década se ha demostrado que la infección del virus de papiloma humano (HPV), constituye una de las principales causas de cáncer de cuello uterino y es un precursor de neoplasia intraepitelial a nivel mundial. La presencia HPV es muy común en personas sexualmente activas, se presenta generalmente de forma asintomática favoreciendo que las personas transmitan el virus sin saberlo. (Resende, LS de A Rabelo Santos, SH, Sarian, DC, Alves, FRR, Ribeiro, AA, Zeferino, LC y Derchain, 2014).

El análisis de la Organización Panamericana de la Salud indica la situación del cáncer cérvicouterino en América Latina y el Caribe, como la segunda causa de cáncer entre mujeres de 15 a 44 años; en el año 2012 hubo alrededor de 36.000 muertes, ocupando el 80%, los datos presentados fueron recopilados a partir de GLOBOCAN (Negrin, 2015).

En Ecuador, la infección por HPV se considera un problema de salud pública atendiendo a que hay un incremento de mortalidad por este cáncer en los últimos diez años, relacionado con el desconocimiento de la prevalencia de los genotipos que circulan en el país y los escasos programas de detección oportuna de que se disponen. Según la sociedad de lucha contra el cáncer del Cantón Cuenca, la incidencia de cáncer de cuello uterino *in situ* es de 3.9 % y del cáncer invasor 17.5 % en esta región del país. (José A. Cabrera V., Oswaldo J, Cárdena H, Manuel A, Campoverde C, José I & Ortiz S, 2015).

Existe más de 150 tipos diferentes de HPV y aproximadamente 40 de estos son capaces de infectar la mucosa genital y algunos de ellos tienen actividad oncogénica. Esto ha motivado el desarrollo de

nuevas pruebas diagnósticas moleculares, las que han permitido diferenciar los virus de alto y bajo riesgo oncogénico. Observaciones recientes muestran que las pruebas de detección para HPV basadas en ADN deben centrarse en los tipos 16, 18 y 45 del virus, por motivo que a nivel global estos genotipos se relacionan con el 75 % de todos los carcinomas escamosos y con el 80 % de los cánceres de cuello uterino invasivos (Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF & Clifford GM, 2011).

En el Hospital General Luis Vernaza, de la ciudad de Guayaquil se cuenta con un laboratorio de Biología Molecular donde se han estandarizado dos técnicas para el diagnóstico del HPV que tienen en común iniciar por un paso de PCR. Para el estudio en mujeres se dispone de un PCR en Tiempo Real que identifica, con un 99 % de sensibilidad, los genotipos HPV16 y HPV18, además de 12 genotipos HPV de alto riesgo. Para el diagnóstico en hombres se cuenta con un Dot Blot Reverso que detecta 23 genotipos de VPH: 14 de alto riesgo y 5 genotipos de bajo.

Este trabajo tuvo como objetivo identificar el HPV en muestra de pacientes con sospecha clínica de la infección, recibidas en el laboratorio en el periodo de abril de 2015 a marzo de 2016, por las técnicas moleculares antes mencionadas, con el fin de contribuir al conocimiento de la prevalencia de la infección en la provincia Guayas y la identificación de los genotipos oncogénicos en estos pacientes. Los resultados contribuirán a disminuir la morbimortalidad por cáncer en el país.

CAPÍTULO I

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

El virus del papiloma humano está involucrado directamente con el cáncer de cuello uterino que constituye un problema de salud pública, ya que afecta a mujeres desde los 18 años, especialmente en los países en vía de desarrollo donde ocupa el segundo lugar de muerte por cáncer a nivel mundial. Se estima que hasta un 75% de mujeres están expuestas al HPV en algún momento de su vida; más del 90% de las mujeres infectadas son capaces de producir neoplasia intraepitelial cervical (NIC) aunque estas lesiones pueden generar una respuesta inmune eficaz capaz de erradicar la infección en un período de 6 a 24 meses, sin sufrir consecuencias a largo plazo para la salud (Ochoa Carrillo, Guarneros de Regil, & Velasco Jiménez, 2015).

Según el registro nacional de cáncer del Ecuador, el cáncer de cuello uterino ocupa la segunda causa de mortalidad en el país. La incidencia de cáncer cervical es de 20 casos por cada 100.000 habitantes, con variaciones regionales importantes. En Quito la incidencia es de 19 por cada 100.000 habitantes y en Loja alcanza cifras aún más alarmantes (32/100.000).

La infección por HPV en hombre ha sido considerada como un problema menor y de escasa relevancia. En general se ha catalogado al hombre como vector silencioso de este microorganismo, ya que a pesar de jugar un papel importante en la transmisión del virus, sólo el 1% experimenta algún signo o síntoma clínico que puede ir desde la presencia de verrugas hasta lesiones precancerosas del pene, ano y bucofaríngeo (Aranda Flores, 2016).

En Ecuador no se dispone de estudios suficientes que reporten la prevalencia y genotipificación del HPV lo que resulta importante para conocer la situación epidemiológica de esta infección en el país, así como los genotipos circulantes en el mismo.

Los cánceres asociados a la infección por HPV implican un alto costo social y económico. Estos pueden prevenirse al realizardiagnóstico más preciso mediantepruebas moleculares por PCR para la identificación de los genotipos de alto y bajo riesgo del virus, que incluso puedendetectarloen pacientes que no presentan lesiones visibles. Esta metodología forma parte de la rutina diagnóstica en países industrializados pero por su alto costo son pocas las instituciones que la aplican en nuestro país.

Contar con datos reales de la presencia del HPV, detectado por técnicas moleculares de alta especificidad y sensibilidad, así como con la identificación de genotipos oncogénicos, resulta de importancia en la reducción de la morbi-mortalidad asociada a la infección por este virus. Así mismo, sienta las pautas para el establecimiento de programas preventivos contra los tipos de cáncer asociados al mismo.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar el virus de papiloma humano en pacientes del área de consulta externa del Hospital Luis Vernaza en el periodo abril de 2015 a marzo 2016.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.2.2.1** Determinar la prevalencia del HPV en el total de muestras cervicales y uretrales y por grupo etario.
- 1.2.2.2** Definir la frecuencia de infecciones simples y múltiples con genotipos de alto riesgo en pacientes femeninos.
- 1.2.2.3** Describir la participación de los genotipos de alto y bajo riesgo en la infección de pacientes masculinos

1.3. HIPÓTESIS

La identificación del VPH mediante las técnicas de PCR en Tiempo Real y Dot Blot Reverso permitirá determinar la prevalencia de la infección de los pacientes que asisten a consulta externa del Hospital Luis Vernaza.

CAPÍTULO II

MARCOTEÓRICO

2.1. CÁNCER CERVICO-UTERINO

2.1.1 HISTORIA NATURAL Y EPIDEMIOLOGÍA

La historia del cáncer cervical está relacionada directamente con la infección por el virus del papiloma Humano (HPV). En el año 2008, el médico Alemán Harald Zur Hausen recibió el premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de HPV como una causa de cáncer cervical. Las investigaciones sobre las infecciones se consolidaron en los últimos años de la década de los 70, cuando aparecieron indicios entre la relación de algunos tipos de HPV y los cánceres del área ano-genital. A partir de entonces numerosas investigaciones han reafirmado esta relación demostrando claramente que el HPV se transmite fundamentalmente por contacto sexual y en la actualidad se clasifica en alto riesgo y bajo riesgo oncogénico, los tipos de bajo riesgo causan generalmente lesiones benignas, los más frecuentes son HPV6 y HPV11 y los tipos de alto riesgo son detectado en más del 95% de los casos de cáncer de cuello uterino siendo más frecuentes los genotipos de HPV16 y HPV18 (Martinez & Troconis, 2014).

Los estudios epidemiológicos de cáncer de cérvix han revelado, que hay algunos factores implicados:

- Inicio temprano de actividad sexual.
- Promiscuidad sexual, riesgo que se incrementa cuando se mantiene contacto sexual con trabajadoras del sexo.

La multiparidad es otro de los elementos a considerar, ya que durante el embarazo se produce una depresión inmunológica y de folatos en la sangre, los que se han asociado para el incremento de lesiones intraepiteliales mientras más embarazos tenga la mujer (Roura et al., 2016).

- La reducción de antioxidantes se considera uno de los factores que influyen en la infección del virus, por lo que es aconsejable ingerir alto contenido de vitamina A para evitar desgarros del epitelio que puedan producirse durante el parto.
- Consumo de tabaco.
- Los factores hormonales: los métodos anticonceptivos por más de 5 años en mujeres portadoras de HPV con lesiones intraepiteliales puede ser causa del incremento del cáncer cervical según algunas investigaciones (Rodríguez González, Pérez Piñeiro, & Sarduy Nápoles, 2014).

Existen además condiciones que conducen a la propagación de la infección del virus como:

- El tipo de HPV
- El estado inmunológico de la persona infectada, es una causa fundamental para que el virus persista y haya progresión acelerada de las lesiones desarrollando cáncer cervical.
- Coinfecciones de otras enfermedades de transmisión sexual como herpes simple, ureaplasma, vaginitis bacterial, clamidea, gonorrea (Ochoa Carrillo et al., 2015).

La mayoría de los tipos de HPV no causan sintomatología y desaparecen por sí mismo sin embargo, alguno de los aspectos mencionados, son realmente factores directos para el desarrollo del cáncer uterino.

La evolución natural del virus está dada por la abrasión o maceración de los epitelios facilitan la trasmisión del papiloma, además la infección anogenital está dada por contacto sexual, ya que existe una correlación entre parejas sexuales. La infección orogenital también proporciona la infección del virus.

En general, se puede establecer que las células cancerosas no obedecen el control de proliferación a las que están sujetas las células normales, sin embargo la proliferación acelerada no es la única ni la mayor característica de las células malignas, sino con la migración producir nuevos bazos sanguíneos produciendo metástasis; además se sabe que estos procesos son independientes de la proliferación celular. Otro evento está dado por la característica de evadir la regulación por parte del sistema inmunitario, las células que forman un tumor descienden de un origen clonal en la célula que ha acumulado a través de un periodo prolongado de tiempo una serie de alteraciones en el material genético como mutaciones deleciones y amplificaciones o inactivaciones genéticas.

En la actualidad, la mayor parte de los estudios con relación al HPV y el cáncer se centran primero por los mecanismos por los cuales estos virus afectan el mecanismo celular y causan cáncer y en segundo lugar en la respuesta del huésped contra la infección viral y el control de las lesiones premalignas e invasorias, razón por la cual la investigación se ha extendido a otros tumores como el cáncer de piel y orofaringe, en su conjunto, los datos actuales indican que el HPV es el virus que con mayor frecuencia cusa cáncer en los seres humanos.

La infección por HPV produce alteraciones celulares que pueden progresar a cáncer invasor, en la mayor parte de los casos inicia con una atipia celular o una lesión escamosa intraepitelial usualmente bajo grado,

en su mayoría la infección es temporal y controlable debido a la intervención del sistema inmune, pero cuando el sistema inmune por diferentes factores se encuentra deprimido, el paciente es susceptible a contraer infecciones múltiples y persistentes.

El cáncer cervical en la actualidad se muestra como un factor etiológico dado que en muchas ocasiones la infección del virus de HPV persiste. Incluso antes de la identificación de sus factores etiológicos, la difusión del conocimiento ya que sigue siendo un problema de salud pública en los países en desarrollo, actualmente se acepta como estrategias de prevención primaria y secundaria que tendrán un mayor impacto en el control de cáncer cervical y otros tumores malignos asociados con la infección del HPV. (Herrera Ya, Piña, P, Sánchez, 2015).

2.1.2 ESTRUCTURA, ACCIÓN PATÓGENA Y CLASIFICACIÓN DEL HPV

Pertenece a la familia *papillomaviridae* incluida en el género *papillomavirus* constituido por una molécula de ADN circular, de doble cadena con una longitud de 8000 pares de base, no tienen envoltura, miden entre 52 y 55 nm, compuesta por 72 capsómeros que rodean al genoma formada de varias zonas de regiones abiertas conocidas como ORF, ricos en la proteína L2 que son los genes que se dividen en dos tipos de expresión temprana (E1-E7) que codifican proteínas implicadas en la regulación y replicación viral y genes de expresión tardía que codifican las proteínas para el ensamblaje de la cubierta, el VPH codifica sólo 9 a 10 tipos de proteínas, carece de proteasas, ADN polimerasa, o de enzimas involucradas en el metabolismo de los nucleótidos.

El estado de metilación de proteínas promotores de genes y se asocia a los hábitos, características demográficas en pacientes con infección de HPV con cáncer cervical de baja y alta lesiones escamosas intraepiteliales para determinar la metilación en regiones promotoras mediante la técnica de reacción de la polimerasa.

Los virus son patógenos intracelulares que se reproducen solo en la célula viva con el fin de producir más virus, a medida que el virus se replica afecta a los genes celulares del huésped en múltiples células cancerosas, la infección viral causa inflamación crónica que conduce a la muerte celular, proliferación incontrolada y la expresión modulada de alguna de las proteínas reguladoras. La oncogénesis es un paso de múltiples de las células huésped normales son transformadas para producir proteínas virales y complejos de proteínas. Los virus que están asociados en el desarrollo del cáncer del cuello del útero son Hepatitis B, hepatitis C, EBV, herpes virus.

El HPV pertenece a un grupo más grande que tiene afinidad con el tejido epitelial y muchos de ellos están asociados con infección humana que inducen a lesiones benignas como los condilomas y a su vez se asocian con algunas enfermedades malignas epiteliales como el cáncer de cuello uterino y otros tumores en el tracto urogenital, se encuentran encapsulados de proteínas y la expresión genética se da básicamente por las células del huésped para iniciar los programas de replicación del virus. La proteína Brd4 es una importante molécula que sirve como adaptador de la cromatina celular para iniciar el proceso de la transcripción y alargamiento.

Los HPV son patógenos humanos que ocasiona una gran variedad de morbilidades cutáneas y cancerígenas especialmente a esta proteína lo que podría proporcionar una nueva célula diana terapéutica de la prevención de las infecciones de HPV.

El genoma del virus del papiloma se distingue en tres regiones:

1. La región reguladora que es una región no codificante de aproximadamente 1 kb, la cual se denomina región larga de control, sirve para la regulación de la replicación y de la transcripción, contiene ORI que es inicio de la replicación del genoma, posee uno o dos promotores y facilitadores de la

transcripción, así como puntos de unión para las proteínas represoras de la replicación. Esta región está sometida a complejas interacciones con proteínas reguladoras tanto del virus como de la célula hospedera.

2. La región que incluye los genes de expresión temprana que dan origen a las proteínas no estructurales, la integración viral del genoma huésped ocurre bajo la expresión de los genes E6-E7 frecuentemente en la región E1 y E2 provocando la pérdida de expresión de la proteína del gen regulador E2. Los genes E6 y E7 al expresarse interfieren con procesos que regulan el crecimiento y la diferenciación celular. Los virus requieren de la célula huésped para su replicación, por ello desarrollan mecanismos que aseguran su permanencia para integrar el genoma al ADN celular, produciendo transformación en el virus alterando la estructura y funcionamiento de los genes responsables del crecimiento y diferenciación celular. La telomerasa se encuentran en los extremos de los cromosomas lineales y su expresión produce la activación de la subunidad catalítica de la telomerasa en las que actúan las proteínas E6 y E7.
3. La región tardía de los genes L1 y L2 estimula la replicación viral y codifica las proteínas estructurales con ayuda de la E4 para el ensamblaje mayor y menor de la cápside, logrando el empaquetamiento de los viriones de HPV, las infecciones se producen en los epitelios escamosos y las mucosas, no son específicos sino que también tienen una preferencia concreta de tejido y localización.

Las funciones y actividades de cada una de las proteínas se dividen en proteínas estructurales y no estructurales y son las siguientes:

Proteínas no estructurales

E1.-Tiene funciones de la enzima helicasa, la que es importante para la replicación y transcripción.

E2.-Es fundamental para que inicie la replicación, transcripción, segregación genómica y encapsidación.

E4.-Regula la expresión de los genes tardíos, controla la maduración y salida de los viriones.

E5.-Estimula la actividad de E6 y E7, promueve la fusión celular generando inestabilidad cromosómica, contribuye a la invasión de la respuesta inmune.

E6.-Esta proteína se une e inicia la degradación de la proteína supresora de tumores p53 impidiendo la apoptosis, la E6 interactúa con proteínas del sistema inmunitario innato, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y la persistencia del virus, activa la acción telomerasa.

E7.-Se une e inicia la degradación de la proteína supresora de tumores pRB, incrementa la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas; afecta la expresión de genes en la fase S por interacción directa con factores de transcripción E2F con histona desacetilasa; contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria

Proteínas estructurales

L1.- Es la proteína principal de la cápside, su función es reconocer los receptores sobre la célula hospedera, es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes.

L2.- Esta proteína ocupa el segundo lugar en la cápside, su función es participar en la unión del virión a la célula, en la entrada a la célula, su transporte al núcleo, liberación del genoma y el ensamblaje de los

viriones(Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).

El HPV inicia su ciclo de vida infectando a las células a través de lesiones, manera coordinada con la diferenciación y división celular de los queratinocitos produciendo muchas capas epidérmicas que histológicamente se producen en acantosis, paraqueratosis e hiperqueratosis, esta última secuencia incluye la expresión de los genes tardías (L1, L2), iniciando la transcripción de sus genes uniéndose a la célula blanco a través de un receptor de la membrana (molécula $\alpha 6$ - Integrina), tiene una alta especificidad por las células escamosas y es aquí donde inicia la síntesis de las partículas virales, se produce la infección del virus dentro del núcleo de las células basales, el ADN permanece en esta circular replicándose a niveles bajos produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo; el HPV se vale de las características propias de las células para su propagación, puesto que no presentan una fase lítica sufriendo un proceso de descamación desencadenando el desarrollo de lesiones (Sanabria Negrín, 2015).

Para que la infección del virus esté permanente necesita de queratinocitos basales, los que son ingresados a través de abrasiones o lesiones en el tejido necesitando de la presencia de la actividad mitótica, lo que inicia por la intervención de la proteína L1, la mayoría de los virus del papiloma entran a la célula mediante endocitosis dependiente de clatrina mediada por receptor, la obtención del virion y la salida del genoma viral ocurren en el endosoma, luego la proteína L2 que se encuentra dentro del núcleo, el genoma pasa por una serie de procesos en los cuales están varios promotores de modificación del ARNm produciendo las proteínas E1 y E2, las cuales generan un control en la producción del número de copias del genoma viral, por lo general generan de 20 y 100 copias por célula, generando una maquinaria de polimerización celular y factores para la replicación del genoma, en la capa suprabasal la expresión de los genes E1, E2, E5, E6 y E7 forman parte del mantenimiento del genoma viral

induciendo la proliferación celular, aumentando el número de células susceptibles a ser infectadas (Santos-López et al., 2015).

En comparación a otros virus, los virus del papiloma no generan una respuesta inmunitaria humoral, para la clasificación inicial se toman dos criterios básicos que son: el hospedero que son altamente específicos y las secuencias genéticas.

La secuencia más utilizada para la clasificación del virus del papiloma es la del gen L1, que es altamente conservado, aunque se han utilizado también otros genes como E6 y E7.

Se establece un nuevo tipo de virus cuando las secuencias del gen L1 varían en más de 10 % respecto a tipos virales ya conocidos. Si la diferencia es de 2 a 10 %, se les clasifica como subtipos virales y si la diferencia es menor a 2 % se definen como variantes virales (Santos-López et al., 2015).

Para el desarrollo del cáncer es necesario la integración del virus del HPV en la célula huésped, muestra una señal en la región del marco de lectura abierta E1- E2, lo que permite la inhibición de la E2 en la denominada caja TATA o región de control, produciéndose la unión de los factores de transcripción (complejo de transcripción TFIID y SP1), lo que logra la activación de las proteínas E6 y E7, la proteína E6 logra unirse con la P53, iniciando un complejo de proteínas celulares, entre ellas la proteína E6, proteína Kinasa y la proteína ligante al calcio, sobre el que actúa un complejo enzimático llamado ubiquitina degradando a la enzima P53, brindando un resultado como efecto final un aumento de la transcripción del ADN dañado por inhibición del gen P21 o WAF1 activado en el ciclo celular en la fase G1 logrando bloquear la apoptosis de células mutadas, la proteína E7 se une a la proteína retinoblastoma (PRB) logrando liberar el factor de transcripción E2F el que se encuentra unido a la fase G1 y se activan los genes de proliferación como resultado de este acontecimiento.

La diferencia entre la integración del virus en los tipos de HPV de alto y bajo riesgo oncogénico está dada en la actividad diferencial de sus respectivas proteínas E6 y E7 con las proteínas P53 y PRB. Cabe resaltar que es importante que el ADN viral se integre al genoma del huésped, pudiendo explicar el efecto proliferante a través de mutaciones en sitios de control YY1 los que básicamente inhiben la expresión de promotor P9 y de este modo se logra activar la expresión de las proteínas E6 y E7. (Rivera Z., René, Aguilera T., Jorge, & Larraín H, Angelica.2002).

Se ha identificado, por medio de la hibridación de células somáticas normales inmortales un grupo de cuatro genes celulares que participan en el control de los oncogénesis. Lo que es probable que en este sistema participen mutaciones o aberraciones cromosómicas como por ejemplo aberraciones en los cromosomas 3 y 18 de queratinocitos humanos inmortalizados. Lo que se ha encontrado que la introducción de los cromosomas 4, 2 y 1 incluso en las células transformadas se convierten en células seniles que dejan de proliferar. Se especula que alguno de estos genes corresponde a inhibidores de las cinasas dependientes de las ciclinas que regulan el ciclo celular como p16 y NK4.

El ADN que se replica en el epitelio escamoso estratificado y causan una variedad de tumores malignos, la importancia de las interacciones entre el microentorno del estroma y las células tumorales pueden afectar el ciclo normal provocando progresión de las lesiones a cáncer.

Se los llama papilomavirus porque algunos tipos pueden causar verrugas o papilomas. El nombre se deriva del latín: papilla (pústula) y el sufijo griego oma (tumor), estas verrugas son tumores benignos (no cancerosos).

Los papilomavirus que causan las verrugas comunes que crecen en las manos y en los pies son diferentes a los que afectan a la mucosa de la boca, ojos, nariz, garganta y el tracto respiratorio o el área anogenital de la mujer o del hombre; estos virus están relacionados con varios tipos de

cáncer como el de faringe, amígdalas, esófago, pulmones, útero, ovarios, próstata, pene, uretra, etc.

La clasificación del HPV en virus de riesgo elevado y bajo para el desarrollo del cáncer, se basa en que se detectara con una frecuencia mayor en muestras de tejido canceroso. Luego se observó que los queratinocitos humanos como una consecuencia del efecto de las oncoproteínas virales en el desarrollo celular.

Los carcinomas basocelulares y espinocelulares de la piel se encuentran asociados con un número elevado de tipos virus diferentes que tienen un nivel bajo de malignizarse. Lo que explica la necesidad de depender de otros agentes mutagenicos para el desarrollo del cáncer.

La verrugas genitales que generalmente se presentan en la vulva, vagina, cuello del útero, pene, uretra son denominadas condilomas acuminados, casi siempre están relacionados con los genotipos 6 y 11 de comportamiento generalmente benigno llamados de bajo riesgo.

2.1.3 CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES INTRAEPITELIALES CERVICALES

El cáncer de cuello uterino es el resultado de un proceso que se inicia con una serie de cambios citohistopatológicos que dan lugar desde la atipia celular hasta diversos grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical (NIC o CIN) antes de convertirse en carcinoma invasor.

El diagnóstico de la patología cervical hasta los últimos años de los 70, se basó en tres aspectos fundamentales:

- Citología como método de rastreo.
- Colposcopia como instrumento para dirigir las biopsias.
- Anatomía patológica para el diagnóstico definido.

Pero a partir de los años 80, con la aparición de los virus del papiloma y del herpes simple, se incluyó, sobre todo en investigación la identificación

y tipificación viral. Los cambios que se generan básicamente en las clasificaciones de las lesiones premalignas del cáncer del cuello del útero han evolucionado paralelamente desde el conocimiento de biología hasta su historia natural. Inicialmente se usó el término “carcinoma in situ”, se consagro este término en la histopatología cervical por los cambios citológicos similares a algunas displasias y el CIS condujo a la displasia de neoplasia cervical intraepitelial (CIN) el termino del grado III incluye las displasias severas, la mayoría de los patólogos coinciden que la CIN 3 puede ser comparada con el CIS ya sea la displasia severa o no. La clasificación de las neoplasias cervicales intraepiteliales tiene una baja reproductividad en el diagnóstico, tanto en el material histológico como citológico y sobre todo en lesiones graves. En 1989 se hicieron avances con el conocimiento de carcinogénesis para el estudio Bethesda para descubrir las alteraciones citológicas, incluyendo nuevo estudios y conceptos relacionados con el virus, a pesar de que la clasificación no es absoluta a efectos prácticos, el sistema Bethesda se constituye por el termino de neoplasia intraepitelial con dos categorías de alto y bajo grado, estos dos grupos se justifica por la evidencia que las LSIL corresponden a infecciones víricas y que excepcionalmente progresan cáncer los que corresponden a displasia moderada (CIN 2), displasia (CIN3) y carcinoma in situ.

Una de las situaciones más críticas en el manejo de la patología cervical ha sido el reporte del citopatólogo, la valoración de esta prueba y la interpretación.

El HPV de alto riesgo es la causa principal de la displasia cervical y cáncer, estudios recientes demuestran que el HPV es un marcador de resultado clínico en cáncer de la orofaringe, aunque la información reportada carece de prevalencia de la infección de HPV con el cáncer de vulva, su lesión precursora y el pronóstico de esta patología.

Las lesiones cervicales más importantes: carcinoma invasor, carcinoma in situ y displasias, estas últimas clasificadas en tres grados: leves,

moderadas y severas, según fuera la dimensión o espesor del epitelio transformado(Burks et al., 2012).

Este virus está relacionado con el proceso de carcinogénesis cervical, implicando una serie de eventos; ocupando el primer lugar la actividad sexual, lo que permite la entrada del virus en las células basales del epitelio. Si la infección se hace persistente puede iniciarse un proceso de oncogénesis ocasionando alteraciones del epitelio del cuello uterino denominadas Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), las cuales se han clasificado en tres grados:

Tras esta clasificación se consideró a toda lesión NIC, como precursora del cáncer cervical y todas deben de ser tratadas.

NIC 1.- No es considerada como lesión precancerosa, es diagnosticada como una infección por HPV, ya que tienen un riesgo menor a progresar a cáncer cervical, es importante identificar las lesiones precancerosas de las que no son, ya que aún existe heterogeneidad en la biología, incluyendo errores de localización e interpretación de la biopsia.

El seguimiento de las mujeres con NIC1 demuestra que la mayoría van a presentar NIC 1 persistente, por lo que las mujeres jóvenes tienen elevados índices de resolución lo que se demuestra por biopsia, no se recomienda procedimientos de escisión para NIC1 persistentes en mujeres con posibilidad de tener hijos de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud, con el fin de evitar posibles daños reproductivos. El manejo de las mujeres post menopáusicas con NIC1 es un problema mayor porque las infecciones persisten con mayor frecuencia por lo que se realizan procedimientos de escisión para descartar posibles lesiones clínicamente importantes(Sawaya& Smith-Mccune, 2016).

NIC 2.- Son consideradas como lesiones precancerosas equivocadas, son heterogéneas, en algunas ocasiones se producen por infecciones de HPV

no carcinógenos, algunas regiones son tratadas por razones de seguridad ante el desarrollo de cáncer cervicouterino.

La manera práctica de definir al NIC 2 se da mediante las células basaloides inmaduras ya que ocupan hasta 2 tercios del espesor epitelial y la mitosis en el tercio inferior del epitelio.

Por lo tanto el diagnóstico de NIC 2 puede definirse como un diagnóstico equivoco o como un resultado citológico de ASCUS (células escamosas atípicas de significado intermedio).

NIC 2 Y 3.- Es un diagnóstico más fiable y abarca todo el espesor del epitelio.

El seguimiento de las mujeres después del tratamiento por NIC 2 y NIC 3 inicia con vigilancia después del tratamiento, mediante citología y colposcopia a los 6 meses, la ASCCP recientemente recomendó pruebas conjuntas anuales, con seguimiento de los resultados negativos a los 3 años, razón por la cual el riesgo acumulado de recurrencia de NIC 2 es más severa a lo largo de 5 años (Sawaya & Smith-Mccune, 2016).

NIC 3.- Es el auténtico precursor de las lesiones precancerosas, si no son tratadas a tiempo progresará a cáncer cervical en una proporción de alrededor del 30% en los siguientes 20 años.

El tratamiento es obligatorio en el caso de diagnóstico de lesión de alto grado, en general los tratamientos tienen una efectividad por encima del 90%, el carcinoma que aparece en las células epiteliales glandulares es el segundo tipo más frecuente.

2.1.4 TIPOS DE HPV DE ACUERDO A SU POTENCIAL DE CAUSAR CÁNCER CERVICOUTERINO

Estudios demuestran que más de 40 tipos de HPV son transmitidos por contacto sexual, la infección genital por estos virus se ha constituido en

una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en el mundo y se dividen en dos grupos:

Tipos de HPV bajo riesgo

Llamados de esta manera porque no pueden progresar a cáncer cervical, ciertos genotipos pueden causar condilomas. Se los conoce a estos tipos por los números 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 y 81 siendo los tipos 6 y 11 los causantes más comunes de producir verrugas genitales.

La Agencia Internacional para las investigaciones sobre cáncer (IARC) tiene clasificado a los genotipos 6 y 11 como agentes potencialmente oncogénico. En ocasiones, además de estos dos genotipos suele estar presente el HPV 16 que se lo considera como marcador cancerígeno.

Tipos de HPV de alto riesgo

Pueden causar que se formen células anormales pudiéndose convertir de manera paulatina en cáncer cervical, los genotipos más peligrosos son el 16 y el 18 causando el 70% de los cánceres cervicales, seguidamente se han considerado de alto poder oncogénico los genotipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 72 y 82.

Los tipos 16 y 18 son los que en mayor proporción están relacionados con la infección del epitelio de la transformación del cérvix, pene, ano y tracto respiratorio, produciendo lesiones de alto grado que pueden evolucionar a carcinomas infiltrantes.

En la actualidad, la mayor parte de los estudios del HPV en el cáncer se centran en los mecanismos por los cuales estos virus afectan al mecanismo celular y causan cáncer. La investigación del virus se ha extendido a otros tumores como cáncer de piel y orofaríngeo.

El cáncer cervical se ha relacionado con otras formas: vías respiratorias y cánceres digestivos y también causa verrugas anogenitales, se

caracteriza por la persistencia de la infección de HPV; se ha desarrollado múltiples mecanismos para evadir el ataque inmune para eliminar la infección persistente determinando la carga viral con el riesgo de progresión hacia el cáncer de cuello uterino, tomando en cuenta información crucial como las vacunas profilácticas y terapéuticas contra el HPV asociado a cáncer de cuello del útero.

2.1.5 DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA CERVICAL Y EL HPV

El HPV juega un papel crucial en el desarrollo de lesiones cervicales, sin embargo la mayoría de las lesiones que contienen HPV de alto riesgo no progresan a cáncer de cuello uterino; las citoquinas son moléculas que actúan como defensa del organismo contra las infecciones virales, estudios genéticos han intentado relacionar polimorfismos de citoquinas con el cáncer, el IL10 polimorfismo tiene propiedades antiangiogénicas e inmunosupresoras (Chagas et al., 2013).

La infección de HPV establece un periodo de incubación que varía entre 6 meses a 2 años, este aspecto no está totalmente claro sigue en investigaciones. La célula diana es el queratinocito, situado en la lámina basal, las cuales son las únicas células capaces de dividirse, produciendo la transcripción temprana de los genes.

En las lesiones benignas se localiza el ADN en posición extracromosómica del núcleo celular, mientras que en las lesiones graves y en los cánceres el ADN se localiza integrado en el cromosoma celular, la que se produce rompiendo la región E2. Este proceso puede explicar la magnitud de la lesión dando la expresión de la proteína E2 regula la expresión de las proteínas E6 y E7 los cuales interfieren con las proteínas supresoras del tumor, la p53 y el oncogén del retinoblastoma situadas en la región E6 y E7 debido a su actividad transformadora es mayor en los genotipos de HPV considerados de alto riesgo (16 y 18).

Cuando existe proliferación epitelial condiciona al condiloma con sus diferentes expresiones morfológicas como acunamiento, papuloso, micropapilar; en ocasiones no se identifican lesiones porque la infección está presente en la epidermis. El blanqueamiento del cuello del útero por la aplicación del ácido acético mediante un estudio colposcópico permite acceder a otra morfología de la lesión o a su vez la infección puede permanecer en estado de latencia sin poder observarse clínica ni subclínicamente ya que se encuentra en el epitelio.

Tradicionalmente, los métodos de detección precoz del cáncer cévicouterinose han fundamentado en citología cervical a través de la técnica de Papanicolaou (PAP) y la exploración colposcopia, estas pruebas determinan la presencia del virus en lesiones sospechosas, se realizan estudios histopatológicos a partir de biopsias, para un diagnóstico definitivo.

La utilización de técnicas moleculares nos permite acceder a la identificación del ADN viral en periodo de latencia.

Los métodos de detección del cáncer cervical se realiza en mujeres que no tienen sintomatología con el fin de detectar lesiones precancerosas o cancerosas para evitar el desarrollo del cáncer; puesto que las lesiones precancerosas tardan en aparecer y se recomienda que todas las mujeres mayores de 30 años se sometan a las pruebas de detección para reducir la mortalidad; actualmente se han fundamentado en tres tipos diferentes de detección:

- Citología cervical a través de la técnica de Papanicolaou (PAP) y citología líquida la que consiste en realizar un frotis de las células cervicales con un control visual después de introducir un espéculo vaginal.
- Colposcopia mediante la exploración visual; a través de lentes de aumento (colposcopio), se realiza un estudio histopatológico que

determina la existencia de lesiones sospechosas que se deben realizar tinciones específicas para un diagnóstico definitivo de muestras sospechosas de lesiones premalignas o malignas por medio de biopsias, las que se realizan mediante un cultivo especial a nivel del cuello uterino para diagnosticar la infección por este virus permitiendo saber si el paciente es portador del virus.

- Pruebas moleculares de detección de HPV, se fundamenta en la detección de secuencias específicas del ácido nucleico del virus, en tejidos permitiendo la identificación del virus o del genotipo particular del virus asociado a la lesión, para ello se enfrenta la preparación de la muestra en estudio con un fragmento conocido del ácido nucleico viral (sonda) cuya secuencia debe ser complementaria a la posible secuencia del ADN viral que se investiga (hibridación).

Si bien, el Papanicolaou consiste en estudiar las células que se localizan en la superficie y en el cuello uterino para la detección de cambios celulares, alteraciones hormonales e infecciones; esta prueba ha reducido la mortalidad causada por cáncer cervical cuando se ha usado para programas de monitoreo continuo, en cuanto a las lesiones de alto grado y de cáncer tiene una sensibilidad baja a moderada, solo alrededor 50% de los casos son detectados lo que represente un alto porcentaje de falsos negativos, obligando a la realización de un estudio colposcópico y cuando amerita estudio de biopsias.

Los riesgos de los resultados incorrectos en la prueba de PAP:

- Falsos negativos podrían ocultar la presencia de alto grado
- Falsos positivos pueden crear ansiedad al paciente
- La enfermedad progresa hasta esperar el tiempo indicado para realiza la nueva toma.
- Llevan a procedimientos de diagnósticos innecesarios e invasivos.

El diagnóstico histopatológico de la biopsia es una forma de confirmar el diagnóstico respecto al grado de la lesión que se investiga, ya sea como una lesión precursora o maligna.

La mayoría de las infecciones por HPV, son infecciones latentes, las cuales son referidas por bajo número de copias virales, quienes después de un cierto tiempo se convierten en HPV negativo.

En la actualidad es complicado distinguir entre la reactivación de una infección de HPV latente y la adquirida recientemente, también se debe resaltar que el riesgo de desarrollar cáncer o neoplasias intraepiteliales (NIC 2-3) después de la reactivación de una infección latente es relativamente baja (Vargas-Hernández, Vargas-Aguilar, & Tovar-Rodríguez, 2015).

Con las pruebas moleculares, no solo se pueden predecir los casos que están en riesgo de desarrollar cáncer cervical, sino realizar un seguimiento médico de manera temprana a los pacientes que resultan infectados con genotipos de alto riesgo, lo que traería como consecuencia, mejores y más eficaces programas de tamizaje y control para el cáncer cervical.

Se ha comprobado que los genotipos de alto riesgo pueden también estar presentes en pacientes con citología normal.

A pesar de las pruebas utilizadas para la detección del virus de HPV el cáncer de cuello uterino sigue siendo un problema de salud pública en Ecuador, para el desarrollo de lesiones premalignas y el cáncer de cuello uterino, sin embargo la infección del virus no es el único factor para el desarrollo del cáncer, hay varias alteraciones genéticas y epigenéticas por lo que se ha sugerido el seguimiento con biomarcadores para el

pronóstico, pudiendo presentar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer cervical.

2.1.6 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS LESIONES CERVICALES Y URETRALES.

Actualmente no existe cura para las infecciones de HPV, aunque se puede proporcionar tratamiento a los condilomas y lesiones ocasionadas por el virus. El criterio médico más común es aplicar tratamiento a las lesiones cervicales precancerosas de alto grado, es decir NIC II y NICIII, por lo que las lesiones de bajo grado NIC 1 se ha encasillado a la vigilancia periódica.

El tratamiento consiste en remover la lesión por medio de láser, asa electroquirúrgica o por cirugía tradicional con un bisturí. Este tratamiento puede utilizarse para verrugas genitales externas, utilizando terapias inmunomoduladora como imiquimod con actividad antiviral y antitumoral, interferón sistémico y terapia coadyuvante haciendo referencia al uso de antimicóticos como podofilina, podofiotoxina y ácido tricloroacético. En lesiones gigantes se utiliza electrosección intervención quirúrgica o láser de CO₂ con nitrógeno líquido destruyendo las lesiones virales por necrosis de la célula huésped infectada, luego de la aplicación del tratamiento es recomendable repetir la prueba de ADN viral, citología y colposcopia para asegurar que los tejidos lesionados fueron destruidos (Mex, 2014).

A la hora de decidir sobre el tratamiento más adecuado para cada paciente se debe tener presente dos aspectos fundamentales: la historia o evolución natural de la infección y la multifocalidad de la infección para demostrar que la infección no se encuentra circunscrita en un solo segmento sino generalmente a todo el tracto genital.

Actualmente la detección temprana y el tratamiento precanceroso siguen siendo las formas más efectivas de prevenir el cáncer, aplicando la

metodología empleada para la identificación del genoma, incluyendo tecnología de la PCR en las mismas condiciones permitirá un mejor conocimiento acerca de las asociaciones entre tipo específico y cáncer. En particular resultan interesantes las conclusiones que se observan con los tipos de virus identificados recientemente.

Al identificar los tipos de virus involucrados en lesiones intraepiteliales escamosas en tejido cervical, se conoce el riesgo de progresar carcinoma invasor; por lo que se puede establecer una estrategia del caso, un seguimiento del caso.

Se considera que un 10 % del cáncer en el mundo se atribuye a la infección del virus, principalmente cáncer de cuello uterino, tumores de vulva, pene y región perianal.

Los precánceres y los cánceres del cuello uterino no presentan sintomatología, por lo que es importante que en el caso de las mujeres se realicen la prueba de Papanicolaou y el test molecular para la detección de HPV a fin de detectar cambios celulares atípicos en etapas tempranas, antes que estos puedan convertirse en lesiones de premalignidad con consecuencias graves; en el caso de los hombres es recomendable realizarse el test molecular como examen de rutina.

Aunque las pruebas de detección temprana y el tratamiento de las lesiones reducen el riesgo de cáncer cervical, no previene la infección por HPV como ocurre en la mayoría de las enfermedades de transmisión sexual, el uso de preservativos durante las relaciones sexuales ayuda a prevenir la infección del virus, pero como el contacto de la piel ocurre aun con el preservativo, no asegura la protección total. Las pruebas moleculares para la detección del HPV representa una oportunidad debido al periodo de evolución que existe entre la lesión primaria y la etapa invasiva reafirman el valor predictivo de las pruebas moleculares, ayudando a tomar medidas de prevención con un diagnóstico temprano

permitiendo proporcionar un mejor estilo de vida (Ochoa Carrillo et al., 2015).

2.1.7 INMUNIZACIÓN

Actualmente se encuentran disponibles dos vacunas que proporcionan protección contra el HPV 16 y HPV 18, los que son causantes del 70% de los casos de cáncer cervical, además existe una vacuna bivalente que protege contra el HPV 6 y el HPV 11 causantes del 90% de los condilomas, las cuales funcionan mejor si se administran previamente a una exposición del virus y se recomienda aplicarlas antes del inicio de la vida sexual. El estado de inmunidad en cuanto a la aplicación de la vacuna aún continúa en estudios, se ha confirmado que durante diez años posteriores a la aplicación de la vacuna no se han registrado disminución en la inmunidad. En Estados Unidos se han realizado estudios y seguimientos tras su comercialización de agencias federales y de los distintos laboratorios que la producen, desde junio del 2006 hasta marzo 2014 se aplicó 67 millones de dosis de vacunas tetravalente y bivalente 719,000 dosis desde el mes de octubre del 2009 hasta marzo, indicando que las vacunas de HPV son muy seguras indicando el número de pacientes con efectos adversos fue de 25,176(Ochoa Carrillo et al., 2015).

Las vacunas profilácticas más eficaces contra la infección de HPV, mientras que para las lesiones neoplásicas de alto grado, las vacunas son basadas en vectores virales, péptidos, ADN o proteínas E6 y E7 como antígenos, han tenido una eficacia limitada, capaces de inducir la activación de linfocitos T citotóxico, existen alternativas para proporcionar acción profiláctica y terapéutica contra la infección de y el cáncer del cuello del útero.

Se han realizado ensayos de las vacunas bivalente HPVs 16, 18, cuadrivalente HPVs 6, 11, 16, 18 y la vacuna 9-valente HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 con la finalidad de mostrar la seguridad, la inmunogenicidad y la elevada eficacia especialmente cuando se

administra en edades jóvenes antes de la exposición al virus, su potencial para aumentar la prevención general y para evitar la incidencia de verrugas genitales.

Tabla 2.1. Características de las vacunas contra el HPV y otros aspectos.

Características	Tetravalente	Bivalente
Nombre comercial	GardasilSilgard (Merck)	Cervarix (GlaxoSmithKline)
Tipos de VPH	6, 11, 16 y 18	16 y 18
Número de dosis	dosis, la segunda dosis seis meses después de la primera	dosis, la segunda dosis seis meses después de la primera
Duración de la protección	No se ha observado disminución en la protección durante el periodo de observación	No se ha observado disminución en la protección durante el periodo de observación
Presentación	Una dosis por vial	Una y dos dosis por vial
Método de administración	Inyección intramuscular de 0.5 ml de solución	Inyección intramuscular de 0.5 ml de solución

Contraindicaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Reacción alérgica severa a cualquier componente de la vacuna o posterior a su aplicación • Reacción febril severa • No recomendada durante el embarazo 	<ul style="list-style-type: none"> • Reacción alérgica severa a cualquier componente de la vacuna o posterior a su aplicación • Reacción febril severa • No recomendada durante el embarazo
La coadministración con otras vacunas en el adolescente ha sido estudiada y se ha encontrado que es efectiva	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatitis B • Difteria, tétanos/tosferina • Poliomielitis 	<ul style="list-style-type: none"> • Difteria/tétanos/tosferina • Poliomielitis
Duración	<ul style="list-style-type: none"> • 36 meses a 2-8 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • Vial con 1 dosis: 48 meses a 2-8 °C • Vial con 2 dosis: 36 meses a 2-8 °C

La aplicación de la vacuna requiere de mucha seguridad por la preocupación de los efectos secundarios negativos, según los profesionales de la salud indican que la administración de la vacuna recombinante (tipos 6, 11, 16, 18) puede ocasionar efectos controversiales adversos locales y sistémicos de riesgo. (Coelho, PLS, Calestini, GL da S., Alvo, FS, Freitas, JM de M., Castro, PMV, y Konstantyner, T, 2015).

Para evitar el reconocimiento de la respuesta inmune a través de la inactivación de las células de HPV E6 y E7 se utilizan unos interferones de tipo I, los que no producen muerte celular por la medida que no causan daño alguno e inflamación, lo que no brinda una señal de alerta al sistema

inmune. Las partículas similares al virus que están formadas por las proteínas L1 y L2, las que infectan principalmente al tracto genitourinario, son vacunas profilácticas muy eficaces que protegen de los genotipos de alto riesgo, mientras que para las lesiones neoplásicas de alto grado basadas en péptidos como E6 y E7 como antígenos han tenido una eficacia limitado que surgen como una alternativa importante para brindar una actividad profiláctica terapéutica contra la infección del virus y cáncer cervical.

2.1.8 INFECCIÓN POR HPV EN HOMBRES

La infección de HPV en hombres es considerada como un problema menor y de escasa relevancia considerándolo como un vector silencioso; sin embargo se estima que es el agente causal del 5% de los cánceres de pene y laringe. Se ha asociado la infección de HPV en hombre y condilomas genitales con papilomatosis respiratoria recurrente, neoplasia intraepitelial del pene y anal, cáncer de pene, cáncer anal, cáncer perianal, cáncer oral, cáncer de próstata y de uretra(Silva et al., 2013).

Aunque la infección por HPV en hombres es muy común y algunos tipos de HPV de alto riesgo causan cáncer de pene, es bajo. Sin embargo los hombres portadores del virus transmiten el virus a sus parejas sexuales, muchas veces sin saberlo, siendo las mujeres las que sufren las mayores consecuencias, dado que en ellos el desarrollar cáncer cervical es mucho más elevado.

Así mismo los hombres que tengan relaciones sexuales con una persona que tenga condilomas genitales, lesiones precancerosas o cáncer de cuello de útero pueden seguir transmitiéndolo a todas sus parejas sexuales.

La infección del virus está dado por un microtraumatismo en el epitelio, el que afecta primero a las células basales siendo identificados para luego migrar al núcleo que es el lugar donde va a iniciar la replicación del ADN

viral; una vez que han alcanzado la etapa de maduración celular son reemplazadas a la superficie por nuevos queratinocitos y se activa el ciclo celular, produciendo proliferaciones epidérmicas conocidas como condilomas acuminados que se observan como lesiones papilomatosas, blandas con digitaciones distales, tienen color rosado o rojo, son secas desprendiendo un olor fétido, la mayor parte son asintomáticas pero ocasionan problemas cosmetológicos, psicológico incluyendo inflamación, sangrado, prurito, fisuras (Mex, 2014).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades y el Comité Asesor de las Prácticas de Vacunación (ACIP) recomiendan la aplicación de la vacuna cuadrivalente del HPV a todos los hombres en las edades de 11 a 21 años con el fin de disminuir la incidencia y prevalencia de verrugas anogenitales en hombres (Mex, 2014).

El cáncer de pene es una enfermedad poco frecuente y puede desarrollarse de forma independiente por la infección del virus, las células escamosas son más frecuentes cuando se asocian a la infección del HPV incluyendo el cáncer anal, cáncer orofaríngeo y otros tumores malignos. En los hombres la infección del HPV puede causar una gama de patologías como verrugas genitales, neoplasia intraepitelial del pene y carcinomas del pene, pero en su mayoría las infecciones del virus permanecen asintomáticas y hasta el 70% de los virus son eliminados durante un año, cuando las infecciones no son eliminadas puede llegar a ser un problema comúnmente se manifiestan como verrugas genitales causando dolor, picazón y sangrado, provocando angustia al paciente, las verrugas pueden llegar a ser más grandes y extenderse en otras áreas del cuerpo; sin embargo las verrugas que son altamente infecciosas son las localizadas en los genitales pudiendo contagiar a sus parejas sexuales; se han identificado varios factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de pene entre ellas la falta de higiene, fimosis, tabaquismo, falta de circuncisión, aumento del número de parejas sexuales, falta de uso del

preservativo, presencia de balanitis o liquen escleroso (Stratton & Culkin, 2016).

La ventaja que tiene el hombre es el tipo de órgano sexual y su anatomía es diferente a la vagina donde se crea un ambiente adecuado para el virus lo que puede relacionarse a la baja incidencia de cáncer de pene.

Es necesario que se realice exámenes de penescopía acompañado de detección del HPV mediante diagnóstico molecular

Para la prevención y tratamiento de los hombres es necesario que adopten comportamientos más saludables como:

- Evitar el tabaquismo
- Tener una vida sana con dieta rica en nutrientes, consumir frutas y vegetales.
- Realizar ejercicios.
- Acudir a controles médicos.
- Cumplir con los tratamientos y diagnóstico en pareja.
- Evitar infecciones con otras infecciones de transmisión sexual.
- Fidelidad mutua.

2.1.8 PRUEBA DE HPV

La prueba de HPV (mediante PCR) solo o en combinación con el Papanicolaou, se ha demostrado ser más sensible que la citología cervical en la detección de lesiones histológicas de bajo grado ya que tiene baja sensibilidad y un valor predictivo positivo.

Se describió a las pruebas de HPV como positivas y negativas para los distintos genotipos tanto alto como bajo riesgo, la medición de la carga viral no puede predecir las lesiones de alto grado. (Sirovich, Feldman & Goodman, 2014).

La prueba molecular para el diagnóstico molecular requiere una alta sensibilidad y especificidad para la detección temprana y mayor periodo

de intervalo cuando los resultados son negativos, la reproductividad óptima especialmente cuando se relaciona con citología líquida o biomarcadores con carga viral capaz de reducir falsos positivos para la detección de neoplasias futuras y la infección del virus.

Según estudios se ha comprobado que la prueba de HPV y el cribado citológico son:

- Prueba de screening primario en mujeres mayores de 30 años, ya que si se realiza el test, será un gasto innecesario tomando en cuenta que las infecciones por HPV son transitorias.
- La realización de la prueba de HPV y el PAP habitual.
- Se ha evidenciado una disminución de la incidencia global de cáncer con la prueba de HPV.
- Cualquier metodología utilizada que incluya el HPV con o sin prueba de Papanicolaou aumenta el número de resultados tanto para la detección y el número de colposcopias
- Para un mejor diagnóstico de HPV se puede realizar con la prueba de HPV en conjunto con la prueba de Papanicolaou, puede identificar con mayor riesgo de cáncer cervical (Sirovich, Feldman & Goodman, 2014).
- La prueba de cobas HPV es la única prueba aprobada por la FDA y la comunidad Europea (CE-IVD) que además de brindar resultados individuales para los genotipos de mayor riesgo, HPV 16 y HPV 18 nos indica resultados combinados de 12 genotipos de alto riesgo.
- La prueba Cobas HPV, mejora significativamente la estratificación de riesgo, permite enfocarse en los pacientes que necesitan un

diagnóstico más cercano y un tratamiento más agresivo e identificar a los paciente con un riesgo menor; además cave recalcar que fue validad clínicamente en el estudio ATHENA en múltiples situaciones clínicas incluyendo el ASC-US.

- El tamizaje de alto riesgo ofrece mayor seguridad en el diagnóstico de cáncer cervical comparado con el tamizaje por citología.
- Existe un algoritmo propuesto para la estratificación del riesgo y diagnóstico del cáncer cervical (Anexo 6)

La detección de HPV es un avance significativo, pero se necesitan más detalles que definan el riesgo, las mujeres con HPV 16 y 18 poseen un mayor riesgo de cáncer cervical, en comparación con los otros genotipos de alto riesgo.

Las recomendaciones en las guías clínicas de la Sociedad de Colposcopia y Patología cervical de los Estados Unidos de América (ASCCP) recomienda la colposcopia inmediata para las mujeres que presenten el HPV16 o HPV18 con citología normal.

2.1.9 MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL HPV

La detección de la infección por HPV puede realizarse mediante distintos métodos:

1. Diagnóstico morfológico.
2. Detección de proteínas del HPV (método inmunohistoquímico).
3. Detección de secuencias genómicas del HPV (técnicas moleculares).

2.1.9.1. DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO

Se realiza mediante observaciones de cambios morfológicos producidos por el virus pudiéndose observar en examen citológico como histológico; se caracteriza por el aumento del tamaño del núcleo, hiper cromasia e

irregularidad del contorno de la membrana considerado como coilocitosis o atipia coilocítica.

Los cambios coilocíticos pueden detectarse en todas las lesiones premalignas del cuello uterino, siendo más frecuentes en lesiones de bajo grado, las que pueden ser detectados por tinción de Papanicolaou.

El 90% de las neoplasias malignas son producidas por las células escamosas de cabeza y cuello, se sospecha que los factores que lo producen son el consumo de tabaco, alcohol, factores hormonales, también influye la genética como posibles factores causales (Khot, Deshmane, & Choudhari, 2016).

La alteración estructural de un gen produce alteración en su expresión funcionando distinto, este tipo de trastorno será irreversible mientras exista el desarreglo estructural y esto incluye a la mayor parte de los errores del metabolismo. Estos cambios pueden ser tratados con ingeniería genética, como la terapia genética o la farmacología molecular con el fin de arreglar la estructura del gen alterado y a reestablecer su función.

La alteración estructural del gen puede ir desde una mutación puntual hasta la delección o pérdida del material genético de varios nucleótidos, ocasionando delecciones o translocaciones. La ubicación de la estructura molecular no es menos importante.

Los desarreglos de los genes que codifican la hemoglobina y los factores de coagulación son ejemplos fehacientes de esto. Si la alteración consiste en la sustitución de una base y se localiza en una región del gen que codifica a una proteína no afecta su funcionamiento, provocando un cambio mínimo en el individuo.

Los polimorfismos genéticos están dados por cualquier cambio genético estructural de un alelo, debe existir por lo menos 1 % de la población con este desorden genético los cuales están asociados a una patología o ya

sea un factor importante de la misma, la mayor parte de los cambios consiste en la sustitución de una base.

Si se sospecha de un desorden estructural conocido basta con comprobar su factor de riesgo, por lo contrario si se trata de una alteración estructural no informada las estrategias de investigación serán diferentes, para ser confirmadas luego por secuenciación.

2.1.9.2. DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO: DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DEL HPV.

El diagnóstico puede darse por la detección inmunohistoquímica de las proteínas de la cápside del virus mediante la detección del antígeno que se correlaciona con la presencia de coilocitosis.

En citología las indicaciones de la inmunohistoquímica pueden aplicarse en el diagnóstico y tipificación de tumores pocos diferenciados, identificación de tumor primario en lesiones metastásicas mediante la técnica ABC (avidina-biotina) logrando que interactúen el antígeno interno de la cápside viral con el antígeno de las células infectadas demostrando la información del tipo de virus infectante, la progresión de las lesiones intraepiteliales cervicales presenta transformación celular por oncoproteínas virales de cepas oncogénicas del HPV y factores genético-inmunológicos del huésped; la oncoproteína E7 acelera la actividad del ciclo celular sobre expresándose p16INK4a que en condiciones normales inhibe CDK4/6, por lo cual su sobreexpresión debe ser detectada mediante inmunohistoquímica permitiendo diferenciar NIC1 por infección productiva autolimitada por HPV o riesgo real de progresión, sin embargo las técnicas de inmunohistoquímica, no son ampliamente aceptadas porque el método es laborioso y debe ser realizado por un personal altamente clasificado, carece de métodos estándar y ofrece resultados dispares (Maestri Pardo, 2014).

2.1.9.3. ADN RECOMBINANTE SONDAS Y TÉCNICAS UTILIZADAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

El ADN se puede recombinar con fragmentos de una misma especie o una distinta, con una secuencia determinada de ADN la que se puede hibridar con otra cadena de ADN o ARN, las que surgieron inicialmente con las técnicas Northern y Southern como método de hibridación. La que permite identificar fragmentos de ADN y la segunda fragmentos de ARN, después de un tiempo se creó la técnica de hibridación *in situ*, que permite identificar secuencias específicas en una laminilla. Para la identificación de secuencias específicas se requiere de sondas específicas.

ADN RECOMBINANTE

Consiste en crear moléculas de ADN provenientes de diversas fuentes. Para llevar a cabo este método es necesario cortar y unir específicamente el ADN; esta manipulación genética se utiliza enzimas que actúan simultáneamente en el ADN, las que están presentes las endonucleasas, polimerasas, ligasas.

La cuantificación de secuencias específicas de ARN mediante RT-PCR, esta técnica ofrece mayores ventajas en la determinación de cambios en la expresión de genes a nivel de ARN así como el número de copias de ARN viral en algunas células o en una pequeña cantidad de muestras biológicas, la retrotranscriptasa es mucho más rápida que las técnicas Northern y Dot Blot, se considera un método fácil por personal experimentado.

Al comprar los dos productos de amplificación del producto inicial con el producto final de la PCR, en la medida que aumenta el número de ciclos en la amplificación del ADN el producto de la reacción se incrementa en forma exponencial; y los últimos ciclos de la PCR la reacción se satura y

la velocidad de amplificación de la PCR tiende a ser exponencial, ya que al aumentar la concentración del producto de amplificación, disminuye la eficiencia de unión de los indicadores. Las determinaciones cuantitativas o semicuantitativas deben realizarse con el producto de la PCR que se obtiene de la fase exponencial.

La eficiencia de la reacción de la transcriptasa inversa debe ser la misma en ambas muestras, ya que las variaciones del producto inicial de los ADNc se van a incrementar durante el proceso de la amplificación en un ciclo subsecuente de la PCR. Lo que conduce a ampliar un estándar interno con lo que se puede comparar con un ARNm específico.

Un estándar interno es una molécula de ADN o ARN de tamaño conocido y se utiliza en una misma mezcla de reacción de la PCR en donde se amplifica el ADNc del ARN que se pretende cuantificar. El estándar interno puede ser un ARNm diferente del que se pretende analizar pero se expresa bajo las mismas circunstancias, o bien ARN o ADN sistémicos de tamaño o secuencia conocidas. Según el estándar interno que se utilice, la técnica de PCR se clasifica en semicuantitativa o cuantitativa.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas rompen la doble hebra de ADN al reconocer una secuencia específica de bases. El rompimiento es específico y reproducible y consiste en romper la unión que forma el grupo fosfato entre la molécula de ADN.

Las enzimas de restricción se obtienen de las bacterias y pueden reconocer secuencias específicas de ADN de cualquier especie, la que presenta miles de secuencias en el genoma humano las que serán reconocidas las que tienen miles de sitios de restricción para muchas enzimas las que en la actualidad existen más de 100. El nombre de cada enzima corresponde de la sigla de cada microorganismo de cada organismo.

La introducción artificial de sitios de restricción, involucra la introducción artificial en el ADN y la detección subsecuente con la PCR en este método se diseña y se sintetizan indicadores con una base los que se añaden en una PCR en donde se amplifica una región que carece de sitio de restricción para la enzima. Tales indicadores se alinean con la secuencia complementaria del ADN molde incluso en el sitio donde se amplifica la mutación, lo que se logra con temperaturas por debajo del alineamiento para conseguir una hibridación inespecífica de la base que se cambió, produciendo un sitio de restricción artificial. Los productos amplificados y con la base mutada se dirigen con la enzima de restricción específica como en el método anterior.

Este procedimiento es sencillo aunque no siempre se obtienen resultados reproducibles en el patrón de corte de las endonucleasas, las que se aplican para generar sitios de restricción, para luego digerir y obtener diversos fragmentos con enzimas restrictivas. Son muy utilizadas en ingeniería genética y en la producción de moléculas recombinantes.

ADN COMPLEMENTARIO (SONDA)

Conocer una secuencia de ADN y poder complementarlas con estas enzimas permite combinar secuencia de ADN con secuencias distintas, la ventaja es que la secuencia específica de ADN se combina con una de origen bacteriano se puede obtener secuencias específicas de ADN o de productos genéticos.

El rompimiento químico de bases no complementarias se basa en la separación química de pares de bases no complementarias en una cadena doble de ADN heteróloga generada a partir de la PCR.

CLONACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN, TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Y AMPLIFICACIÓN DE VECTORES RECOMBINANTES

Una vez que se obtiene un ADNc se clona un plásmido que es un vector de expresión, este ADN circular tiene como característica principal es que se puede reproducir dentro de la bacteria de forma independiente, el que se introduce en una cepa específica tratada inicialmente con cloruro de calcio para facilitar su entrada a través de la membrana de la bacteria.

Los plásmidos recombinantes o vectores de expresión están diseñados para mantener resistencia a los antibióticos como por ejemplo a la ampicilina y tetraciclina. Los dos genes de resistencia a los antibióticos poseen sitios clonación únicos para la inserción de fragmentos de ADN que dan origen al ADN recombinante.

En el caso de que un plásmido no se combine con el ADNc y solo se cierre para producir nuevamente un plásmido circular, logrando mantener resistencia a ambos antibióticos.

En la actualidad se utilizan otras modalidades para identificar plásmidos y vectores de expresión, los genes que contienen galactosidasa beta como indicador de clonación exitosa, produce colonias de coloración azul. Si se ha clonado un ADN recombinante en el sitio de la galactosidasa beta no se va a expresar porque no actúa sobre el sustrato y las colonias son blancas.

La identificación de secuencias específicas está dada por la hibridación de ácidos nucleicos mediante la formación de una doble hebra entre dos secuencias complementarias.

2.1.9.4. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

En la actualidad el diagnóstico del HPV se fundamenta en los métodos moleculares brindando un gran impacto con el propósito de integrar de una manera práctica su amplia aplicabilidad en la clínica con fundamentos de las técnicas del ADN recombinante, entre ellos los principios de hibridación de los ácidos nucleicos y de la detección de secuencias específicas; Existen algunas técnicas que permiten el análisis cualitativo

del ADN y se diferencian entre sí, por su sensibilidad, complejidad y reproductividad. Entre las más utilizadas se encuentran:

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Dot Blot Reverso.

Hibridación in situ.

Secuenciación.

2.1.9.4.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es una prueba cualitativa de replicación in vitro, concebida inicialmente por Kary Mullis en 1985, se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como matriz.

El procedimiento para efectuar la PCR, se realiza mediante secuencias específicas de ADN consiste en obtener el material genético de cualquier tipo de tejido o muestra biológica, es necesario asegurarse de la secuencia correcta de nucleótidos del gen con el fin de diseñar los iniciadores que servirán de señal para que la enzima ADN polimerasa actúe y comience a copiar dicha secuencia específica acompañada de los desoxirribonucleótidos trifosfatados dATP, dCTP, dTTP, dGTP, así como los iones Mg^{2+} y K^+ en un amortiguador con un pH apropiado.

Para el diseño de los indicadores y la obtención de ADN, consiste en conocer la secuencia de nucleótidos del gen con el objeto de diseñar los iniciadores de oligonucleótidos que son de 18 a 30 pares de bases con una secuencia complementaria en los extremos.

La magnitud del fragmento amplificado se determina al sumar el tamaño de los indicadores con la magnitud de la secuencia específica que va a ser amplificada, la que varía en cada PCR pero de ordinario es de 200 a 500 pares de bases.

La cantidad de ADN que se utiliza para la reacción de la PCR también es variable, por lo general es de 100 a 100 000 copias de la secuencia específica. Es necesario indicar que no siempre es necesario realizar la extracción de los ácidos nucleicos para la realización de la PCR.

Con esta metodología se puede identificar hasta una copia de la secuencia o gen a estudiar.

Los desoxirribonucleotidos se encuentran en concentraciones equilibradas de cada uno de 50 a 200 μM , lo que asegura la presencia de suficientes precursores para sintetizar las copias de ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo mediante tres temperaturas diferentes que corresponden a las etapas de desnaturalización, hibridación y elongación o extensión; en el ciclo de la desnaturalización se realiza un calentamiento breve a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, es necesario indicar que cuando la desnaturalización es incompleta conducen al fracaso de la reacción del ADN, es importante que alcance temperaturas altas para que la separación de la doble cadena sea completa.

La etapa de la alineación es determinante en la especificidad de la reacción, el intervalo de la temperatura varía de 50 a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y depende del número de bases G-C y el tamaño de los iniciadores, la temperatura se puede calcular de forma empírica y siempre se recomienda utilizar de 55°C , la extensión del ADN se produce a 70 a 75°C .

La etapa de elongación se sugiere dejar la reacción a 72°C de 5 a 10 minutos para permitir la elongación total de las cadenas que han quedado incompletas.

El proceso de amplificación es obtenido por el número de ciclos que se realicen (25 - 40) tras esta reacción dependerán los números de copias, los pasos del ciclado son:

Paso de Desnaturalización: este paso se efectúa por la separación de la cadena de ADN, mediante temperaturas elevadas 94 a 96°C en un tiempo

muy corto de (30 a 60 segundos) para lograr romper los puentes de hidrógeno, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria.

Paso de Hibridación: en este paso los cebadores o primers hibridan la cadena desnaturalizada en un tiempo de 30 a 60 segundos a temperaturas de 50 a 55°C dependiendo del contenido de CG.

Paso de Elongación: En esta paso el AND polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN extendiéndose desde el terminal 3' del cebador alineado, la Taq polimerasa es capaz de añadir entre 60 a 100 bases nitrogenadas por segundo, la temperatura de amplificación está estimada en 72°C.

Los componentes se describen a continuación:

1. **Enzima ADN Polimerasa:** es una enzima formada por nucleótidos en sentido 5' - 3', permite la elongación de la cadena complementaria a la cadena molde, la temperatura que requiere esta enzima para su máxima actividad es de 75 a 80°C, el uso excesivo o en concentraciones erróneas pueden causar amplificación de productos inespecíficos.
2. **Cebadores, iniciadores o primers:** Para que los iniciadores logren hibridarse deben estar localizados a los extremos de la región de interés, seleccionados inicialmente dos iniciadores que hibriden el ADN molde con una longitud de 15 a 30 nucleótidos y un contenido de 40 a 60% de guaninas y citosinas.
3. **Sustrato:** La concentración de cada desoxirribonucleico (dNTP) en la PCR debe ser equitativa y no exceder de 200uM ya que puede inhibir la actividad enzimática y puede dar como resultado la amplificación de falsos productos.

4. **Cloruro de Magnesio:** Actúa como co-factor utilizado para la reacción enzimática, la concentración de ion magnesio puede afectar el alineamiento de los primers ocasionando formación de dímeros y amplificación inespecíficas que influyen sobre la actividad de la ADN polimerasa.

5. **Solución Tamponada:** La solución buffer contiene Tris-HCl en concentraciones de 10 a 50mM, sirve para brindar un correcto alineamiento de los cebadores, pH óptimo se encuentra entre 8 a 9.

Las pequeñas modificaciones que se dan en la reacción como por ejemplo las temperaturas bajas, tiempos más cortos de hibridación a mayor temperatura, baja concentración de los dNTP de enzima y de $MgCl_2$ permiten brindar una inespecificidad de la reacción, uno de los criterios utilizados para generar una buena especificidad es la utilización de la enzima Taq polimerasa. Lo que puede originar que durante el tiempo que se prepara la reacción se inicien los ciclos de la PCR y se origine hibridación y elongación inespecíficas de los iniciadores, para corregirlo se creó la técnica de inicio caliente que consiste en excluir de la reacción inicial a la polimerasa de ADN de los demás ingredientes y se eleva a temperaturas de 70 °C y luego se añade la enzima, sin embargo en la actualidad se pueden utilizar enzimas modificadas genéticamente para omitir el inicio caliente lo que genera la especificidad de la reacción.

Para el análisis de producto amplificado, la secuencia específica con la PCR es muy importante ya que se visualiza como una sola banda ya sea en gel de agarosa o acrilamida teñida con bromuro de etidio. Sin embargo en ocasiones es necesario la transferencia de membranas e hibridación de la sonda específica para estar seguro de la especificidad del producto.

La segunda amplificación de una secuencia interna del producto original de la PCR, para descartar que los iniciadores se unan a secuencias

homólogas y brindar secuencias inespecíficas, se utiliza la segunda PCR con el objeto de amplificar el producto principal de la segunda PCR.

Los iniciadores externos son los que se señalaron inicialmente para la primera PCR delimitando el fragmento del gen a estudiar, la amplificación se da dos veces de forma consecutiva y se obtiene un producto de menor tamaño.

La identificación de secuencias específicas de ARN se lleva a cabo con la técnica de RT-PCR con el fin de obtener copias específicas a una secuencia complementaria de ADN (ADNc) para obtenerlo se utiliza la polimerasa transcriptasa inversa (RT) lo que consiste en transcribir la secuencia de ARN en ADNc.

La característica que hace que esta técnica sea extraordinariamente sensible se considera teóricamente por la presencia de una sola partícula viral o de un microorganismo, siendo suficiente para que la prueba resulte positiva.

Constituyen un método no invasivo para determinar la presencia de una infección cervical, capaces de amplificar regiones muy conservadas del genoma del virus, mediante el uso de primers y sondas específicas para la detección de HPV. Identifica específicamente los genotipos HPV16 y HPV18, además de detectar simultáneamente el resto de los tipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

Esta técnica se utiliza en pacientes que se hayan detectado ASCUS en resultados de citología cervical detectando la presencia de los genotipos de alto riesgo, HPV 16 y 18 y determinar si es necesario realizar colposcopia, también se utiliza como una prueba de cribado primario de primera línea para identificar mujeres con alto riesgo que ya presentan la enfermedad de alto grado.

Las técnicas basadas en la PCR son muy confiables y se pueden realizar con el mismo material recogido en el momento de la toma citológica, por lo que no se presentan molestias adicionales para el paciente.

La PCR múltiple denominada también PCR multiplex fue descrita por Chamberlain y colaboradores en 1988 quienes fueron los primeros en publicar la amplificación de nueva regiones del gen de la distrofina. Lo que consiste en colocar varios pares de iniciadores en una misma PCR para amplificar y detectar en forma simultánea varias de las regiones del mismo gen. Luego de obtener los productos generados se detectan mediante PCR en tiempo real así pueden apreciarse un mismo segmento de ADN en un mismo carril, partiendo de un mismo molde y una misma PCR. Con esta técnica no solo se puede detectar diferentes regiones de un mismo gen sino también de diferentes patógenos virales e incluso bacterianas, lo que proporciona esta técnica una amplia aplicabilidad.

La amplificación electiva por PCR permite amplificar en forma selectiva varias copias de un mismo gen; es decir aumentar un número de gen de una secuencia normal a una secuencia mutada de un mismo gen. Al amplificar una secuencia normal se introduce una secuencia estándar en la PCR, en cambio al amplificar una secuencia mutada se introduce el mismo indicador pero con una secuencia que incluye una mutación complementaria de la situación buscada.

Estos indicadores solo podrán amplificar AND silvestre o mutado según sea el caso, los productos de PCR se identifican de ordinarios mediante agarasosa y poliacrilamida con bromuro de etidio.

2.1.9.4.2. DOTBLOT REVERSO

Es una técnica de biología molecular combinada con PCR, que permite la detección de 23 tipos de HPV, confirmando la presencia o ausencia de biomoléculas que son detectadas por sondas de ADN y la β -actina funciona como control interno, facilitan la aplicación de las proteínas directamente a la membrana en forma de una gota circular.

Aquí se debe hacer notar que las secuencias específicas de ADN no tienen que ser necesariamente superior como el ser humano, sino que también pueden ser de bacterias, hongos u otros microorganismo, el ADN como ARN se pueden mezclar directamente en el filtro de nitrocelulosas sin necesidad de ser sometido a electroforesis.

Se denomina Dot si el ácido nucleico se coloca sobre la membrana en forma de punto, para que el material genético se fije a la membrana se somete a una temperatura elevada de aproximadamente 85 °C, antes de hibridar se incuba con la mezcla de hibridación pero sin el ADNc marcado.

La ventaja de las técnicas moleculares de alta sensibilidad es que son capaces de evidenciar algunas lesiones no detectadas por citología.

El kit comercial dispone de dos sondas, una para el virus de bajo riesgo y otra para alto riesgo, la estrategia del diagnóstico se fundamenta en la identificación del HPV mediante la selección de genes virales altamente conservados que permitan la detección de la mayoría de los genotipos de bajo riesgo 6, 11, 42, 43 y de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 72, 82 y 83.

Las técnicas de biología molecular cada vez más sencillas y específicas sin duda mejoran los sistemas de tamizaje fundamentados en la citología y colposcopia.

2.1.9.4.3. HIBRIDACIÓN IN SITU

Además de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el método de hibridación *in situ* utilizada con mayor frecuencia con ventajas extraordinarias, consiste en identificar un ARNm o una secuencia específica de ADN directamente en las células de un tejido determinado, y a su vez utilizar los microorganismos difíciles de estudiar o imposibles de cultivar como en el caso de las bacterias que requieren exigencias nutricionales y ambientales que los medios de cultivos no le proporcionan detectando secuencias de ácidos nucleicos mediante sondas marcadas

con un fluorocromo que se dirige a un lugar específico del cromosoma y emite fluorescencia siendo observada por medio de un microscopio.

No existe un método único y preciso de hibridación *in situ* que se pueda utilizar para la identificación de secuencias específicas en muestras de tejidos para la obtención de ADN o ARN.

Este procedimiento implica leves diferencias pero muy importantes, lo que depende principalmente del tipo de muestra a estudiar y si la secuencia específica a identificar es ADN o ARN. Si lo que se quiere estudiar es ARN, se debe tomar en cuenta que la muestra de tejido debe estar totalmente fresca y tomar precauciones para que el ARN no se degrade y no obtener resultados falsos positivos, lo que sucede con extracciones de ADN es totalmente distinto ya que se pueden tomar las laminillas con cortes histopatológicos del servicio de patología.

Existen varias clases de pruebas que pueden ser utilizadas para tamizaje incluyendo sondas para la ubicación de un amplio grupo de genotipos, sin diferenciarlos.

Para la identificación del agente viral se puede obtener un diagnóstico directo de la mayor parte de los casos, pudiendo identificarse en poblaciones celulares específicas, la aplicación en el diagnóstico ha dejado de ser un obstáculo.

Esta técnica se fundamenta en la capacidad que tienen los ácidos nucleicos en hibridarse entre sí, con la región complementaria a través de puentes de hidrógeno formado entre bases adenina y timina (ADN) o urácilo (ARN) y citosina y guanina (ADN y ARN). (Martínez & Otero, 2013).

La ventaja de este método es su especificidad y la positividad por esta técnica se asocia a la presencia de lesiones citológicas e histológicas. Las infecciones latentes (con epitelio normal) son casi constantemente negativas por esta técnica. La sensibilidad para detectar una secuencia específica de ADN en una cuantas copias puede ocasionar una

contaminación mínima con productos previamente amplificados lo que producirá falsos positivos, lo que se puede evitar al actuar de manera rigurosa, utilizando determinadas recomendaciones moleculares como separación de las áreas donde se realizan los procesos de extracción y amplificación de la PCR, además deben destinarse materiales y equipos para cada área.

Este es el único método que permite la visualización morfológica de las células que se encuentran en las que se encuentran el HPV, otros métodos detectan en extractos de ADN. La hibridación in situ presenta una baja sensibilidad necesitando un número elevado de copias de ADN viral para que la reacción sea positiva. Este método detecta y tipifica el virus solo en un 40 a 70% de LIEs (lesiones intraepiteliales escamosas).

Por la desventaja señalada, algunos de los métodos combinan la hibridación in situ con una amplificación previa por PCR.

2.1.9.4.4. SECUENCIACIÓN DE GENES

El análisis de las secuencias representa el primer paso en el estudio de un gen de interés; con la ayuda de programas informáticos analizadores de secuencias de ADN se pueden utilizar para:

Predecir la función del gen.

Inferir relaciones filogenéticas.

Predecir el producto proteico que codifica.

Identificar dentro del gen sitios de restricción.

Comprender los mecanismos de control de la expresión del gen.

Proveer información acerca de posibles localizaciones de intrones en el ADN genómico.

Se fundamenta por la utilización de fragmentos de ADN genómico cortado con enzimas e restricción y el marcaje e ADN con fluorocromos y el

empleo de métodos electroforéticos para separar los fragmentos generados. Se sugirieron dos protocolos de secuencias que se siguen utilizando pequeñas modificaciones: método enzimático y el método de degradación química publicad por primera vez por Maxam y Gilbert ambos pueden distinguir moléculas de ADN y el tamaño difiere de tan solo una base a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida.

La secuenciación por ciclos se dio un avance por las enzimas termoestables porque no solo favorecen a la técnica PCR sino que también a la técnica de secuenciación brindando la formación de un producto de extensión para obtener cantidades suficientes de ADN, en cambio en la secuenciación por ciclos con la polimerasa de ADN.

Las muestras se amplifican por PCR para obtener mayor cantidad de material, la digestión es controlada por enzimas de restricción ya sea de un genoma, cromosoma o fragmento de ADN; antes de la secuenciación se recomienda realizar purificación para eliminar ADNsa contaminantes.

La identificación de los nucleótidos que conforman una determinada región del ADN constituye un patrón de referencia, mediante este método se puede identificar el origen de cualquier fragmento de ADN. Una vez establecida la composición nucleotídica, esta se puede confrontar con todas las secuencias conocidas de HPV contenidas en una base de datos y determinar el tipo, subtipo o variante que pertenece.

La ventaja es que permite distinguir variantes y polimorfismos virales de alto riesgo de transformación neoplásica.

2.1.9.4.5. SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA

El método enzimático de secuenciación diseñado por Sanger, Nicklen y Coulson a fines de los años 70 se ha convertido en el factor fundamental para el desarrollo de la secuenciación del ADN a gran escala, se basa en analizar secuencias nucleotídica de ADN, utilizando fluorocromos diferentes para cada una de las reacciones asegurando el marcaje de

cada uno de los cuatro ddNTPs necesarios para la reacción, utilizando equipos sofisticados llamados secuenciadores.

En la actualidad los secuenciadores automáticos están diseñados para reacciones enzimáticas, la detección del patrón de la electroforesis en gel y de las bandas de ADN y el análisis de las mismas.

La secuenciación automática se basa en la detección de fluorescencia de cuatro marcadores fluorescentes que se usan para identificar las bases nitrogenadas correspondientes de A, G, C, T cada colorante unido a cada base produce luz de diferente longitud de onda al excitarse en presencia de rayos laser, lo que permite que un carril único se pueda identificar los cuatro colorantes a diferencia de la marcación radiactiva que se utiliza en la secuenciación manual, en la que cada reacción se coloca en un carril distinto, los que se incorporan mediante dos formas: marcación terminal y ddNTP marcado con un colorante se une en 3' cada uno se identifica con distintos colorantes: R110 (6- carboxirodamina) R610 (N'N'dietil-2'-7'-dimetil-6-carboxirodamina) y ROX y TAMRA y marcación del iniciador que se realiza en el extremo 5' con los marcadores fluorescentes FAM, JOE, TAMRA y ROX.

Los secuenciadores de última generación utilizan la electroforesis capilar en lugar de los geles de poliacrilamida para la separación de las moléculas. Debido al empleo de los cuatro fluorocromos se puede combinar el resultado de las cuatro reacciones de síntesis y aplicarlo a un solo dispositivo ya sea un gel o tubo capilar de electroforesis.

El cromatograma se puede observar mediante picos con los cuatro perfiles de color originados por la fluorescencia causada por la excitación de los fluorocromos donde cada color corresponde a un didesoxinucleotido (ddNTP), los fragmentos que determinan en una citosina, adenina, guanina y una timina emiten una coloración respectiva azul, verde, negra y roja; los cuatro perfiles e color combinados se interpretan como una secuencia.

Los componentes de la reacción se detallan a continuación:

ADN molde clonado.

Enzima de ADN polimerasa, la cual es capaz de añadir nucleótidos a partir de cebadores o primers.

Cebador o primers que por lo general es un oligonucleótido corto de 20 pares de bases.

Los cuatro nucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Los nucleótidos didesoxi (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP) son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la región 3' de la desoxirribosa.

2.1.9.5. PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS DE ANÁLISIS

A mitad del siglo XX se diseñaron estrategias y tecnologías para la caracterización molecular del ADN, lo que permitió la elaboración de los mapas genéticos y físicos del genoma.

La bioinformática que apareció en la década de los ochenta con los primeros bancos de biomoléculas como el EMBL en Europa y el Genbank en USA, permite el manejo automatizado de la información biológica a través de datos de secuencias genéticas y estructuras proteicas.

Actualmente las redes de datos biológicos de mayor importancia son: el Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI) de los Estados Unidos, el Genbank de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) Bethesda, Maryland y la red Europea de Biología Molecular (EMBL) ubicada en Heidelberg, Alemania.

La comparación y el análisis de secuencias se realizan para la búsqueda e homologías entre la secuencia problema y la almacenada en la base de datos, para lo cual se utilizan programas bioinformáticos altamente

especializados que se presentan con una gran variedad de algoritmos, como métodos optimizadores de una propagación dinámica.

Uno de los programas más populares de este tipo, es el BLAST (Herramienta Básica para la búsqueda de alineamientos localizados) creado por el Instituto Nacional de Salud del Gobierno de los Estados Unidos de América; puede utilizarse desde el servidor público NCBI, ya que conduce investigaciones en Biología computacional, facilita el análisis de genomas y brinda abundante información biomédica con el propósito de brindar un mejor entendimiento de los procesos moleculares.

2.1.9.6. EL HPV Y EL SISTEMA INMUNE

La respuesta inmunitaria varía según la persona y el tipo de virus de HPV, estos virus se condicionan a la capa intraepitelial de la mucosa. Los anticuerpos anti – HPV son los que se dirigen contra la proteína L1 del virus. La seroconversión a la producción de anticuerpos es lenta y los anticuerpos producen títulos bajos, al parecer la infección natural de HPV incita un menor riesgo de reinfección por HPV del mismo tipo pero la infección no parece conferir protección inmunitaria, general o específica de un grupo, contra la reinfección por otro PVH (Insinga, Dasbach, Elbasha, Liaw, & Barr, 2012).

Las infecciones producidas por el HPV se van a eliminar después de un tiempo (8 a 12 meses) sin embargo algunas de estas infecciones no son eliminadas, lo que puede persistir después de un largo tiempo provocando mayor riesgo de cáncer cervical, el aumento de la propagación y la incidencia de la infección demuestra una gran importancia de la respuesta inmune mediadas por las células y el control de infecciones por HPV, las mujeres con infecciones múltiples recurrencias de neoplasias intraepiteliales de alto grado.

Las infecciones programadas de HPV están asociadas a una evasión efectiva hacia la inmunidad innata; el ciclo de replicación viral es un mecanismo de evasión y su liberación no causa muerte celular, por lo que

no se disparan señales de peligro hacia el sistema inmune, por lo que el virus es invisible al huésped, las regulaciones del ciclo celular y de otros genes involucrados en la resistencia del huésped a la infección, lo cual demora la activación de la respuesta inmune adaptativa.

No existe un método estandarizado para medir la respuesta inmune de las vacunas, pero en la actualidad se utilizan tres técnicas diferentes:

(cLIA) Método de medición de inmunoensayo competitivo, por lo general es un método utilizado en los ensayos de la vacuna tetravalente, el cual mide anticuerpos monoclonales anti-HPV, la vacuna bivalente ha sido utilizada para medir la respuesta inmune mediante técnicas de ELISA que mide el total de los anticuerpos IgG, para los anticuerpos neutralizantes in vitro basada en pseudoviriones (PBNA) están relacionados con sensibilidades y tienen *una buena* correlación de estas dos técnicas con cLIA (Hariri & Markowitz, 2012).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. MANEJO Y EJECUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En la presente investigación se utilizaron dos metodologías distintas, que tienen en común iniciar con un paso de PCR, para la detección e identificación de genotipos del HPV. El estudio en mujeres se realizó por la técnica de PCR en Tiempo Real a partir de muestra cervicales y en hombres mediante la técnica de Dot Blot Reverso que permite identificar los genotipos de alto y bajo riesgo de HPV en muestras uretrales.

3.1.2. LOCALIZACIÓN SOCIO-GEOGRÁFICA

La institución involucrada en la presente investigación, se encuentra ubicada en la ciudad de Guayaquil – Ecuador. La ciudad de Guayaquil está localizada en la región costera del país, tiene cerca de 3.113.725 habitantes y su población es muy heterogénea, tiene zonas resistentes muy modernas, pero también existen áreas marginales, tiene serios problemas de higiene y saneamiento, en donde vive un conjunto poblacional susceptible de adquirir infecciones de todo tipo.

3.1.3. RECURSOS EMPLEADOS

3.1.3.1. RECURSOS HUMANOS

La investigación fue desarrollada con la participación del personal profesional y técnico del área de Biología Molecular del Hospital General Luis Vernaza.

3.1.3.2. RECURSOS DE LABORATORIO Y OFICINA

Los equipos utilizados constan en el Anexo2

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio de corte transversal.

3.2.1.1. TIPO DE LA INVESTIGACIÓN

Descriptivo

3.2.1.2. ENFOQUE DEL ESTUDIO

Cualitativo.

3.2.1.3. UNIVERSO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

3.2.1.3.1. UNIVERSO

El universo lo constituyeron 4237 pacientes de 18 a 75 años, que acudieron por consulta externa a las áreas de ginecología y urología del Hospital General Luis Vernaza, entre abril 2015 a marzo 2016.

3.2.1.4. MUESTRA

El tamaño de la muestra en la presente investigación, responde a 1771 pacientes entre ellos 1602 mujeres y 169 hombres, obtenida según los criterios de inclusión y exclusión definidos para este estudio.

3.2.1.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1.- Ser pacientes de las áreas de Ginecología y Urología del hospital Luis General Vernaza, entre abril 2015 y marzo 2016.
- 2.- Tener criterio médico de sospecha o lesiones de cérvix o uretrales
- 3.- Calidad de la muestra requerida para realizar la investigación del HPV.

3.2.1.6. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del presente trabajo:

- 1.- Pacientes que se atendieron fuera del período de investigación.
- 2.- Pacientes embarazadas

3.2.1.7. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

Para el estudio se obtuvo un consentimiento informado para los pacientes participantes según lo estipulado en el documento Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos por la declaración de Helsinki (1964), lo que garantiza confidencialidad y beneficio a los participantes.

Se obtuvo la aprobación y cooperación de las autoridades de la Institución, para el desarrollo de la presente investigación. **(Anexo3)**

3.2.2. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se elaboró un modelo de recolección de datos en Microsoft Excel mediante un programa utilizado en laboratorio de genética molecular llamado Datalab, el que permitió la recolección de información de los pacientes que acudieron al hospital General Luis Vernaza, se tomó en cuenta:

- Nombres y apellidos
- Historia clínica
- Edad
- Motivo de indicación del estudio.

3.2.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO

3.2.3.1. PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA DE LA MUESTRA

3.2.3.1.1. TOMA DE MUESTRA EN MUJERES

La toma de muestra se realizó en la consulta externa (áreas de ginecología y urología), luego fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular para su procesamiento y detección del HPV. **(Anexo1)**.

Las muestrascervicales fueron recogidas en el vial de solución conservante PreservCyt con un dispositivo similar a un escobillón o con una combinación de cepillo. La toma de muestra se realizó introduciendo el cepillo en el endocervix con la profundidad suficiente para permitir que las cerdas más cortas entraran en contacto, girando el cepillo en dirección contrario a las manecillas del reloj 5 veces. Terminando el procedimiento se retiró el cepillo del canal cervical, se colocó el vial de solución conservante, en el cual fue agitado vigorosamente para liberar el material. El escobillón fue retirado sin dejar la cabeza en el vial y finalmente se cerró el frasco con la solución conservante.

3.2.3.2. EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL

Para la extracción de ADN del HPV a partir de muestras cervicales se siguieron los pasos recomendados por el fabricante del juego diagnóstico comercial *Molecular System, Inc.*, de la firma comercial Roche.

Las muestras cervicales fueron extraídas de forma automatizada; la digestión se realizó en condiciones de desnaturalización a temperaturas elevadas, se procedió al lisado con un reactivo caotrópico, logrando la purificación de los ácidos nucleicos de HPV liberados, junto con el ADN de la β -globina que actúo como control interno, mediante la absorción de las partículas magnéticas y finalmente quedan listos para la amplificación mediante PCR y la detección, se selló la placa con el ADN extraído y colocada en el termociclador.

3.2.3.3 REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA EXTRACCIÓN Y APLIFICACIÓN DEL ADN VIRAL

El juego de diagnóstico comercial empleado contiene dos reactivos: Reactivo A (preparación citológica del sistema líquido) para la extracción del ADN a partir de las muestras cervicales y Reactivo B para la preparación de sistema de muestras (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Reactivos empleados en la extracción y amplificación del ADN viral a partir de muestras cervicales mediante PCR en Tiempo Real.

REACTIVOS	COMPONENTES
MACROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	<ul style="list-style-type: none"> • 93% de isopropanol
TAMPÓN DE ELUCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> • Tampón Tris-HCl 0,09% azida sódica
TAMPÓN DE LAVADO	<ul style="list-style-type: none"> • Citrato de sodio dihidratado 0,05% de N-metilisotiazolonaHCl
PROTEÍNASA K	<ul style="list-style-type: none"> • Tampón Tris-HCl < 0,05% EDTA • Glicerol • Cloruro de calcio • Acetato de calcio < 2% de proteínasa K

REACTIVO SDS	<ul style="list-style-type: none"> • Tris-HCl 0,2% de SDS 0,09% de azida sódica •
TAMPÓN DE LISIS	<ul style="list-style-type: none"> • Tampón Tris-HCl 37% de guanidinaHCl < 5 % de polidocanol
KIT DE AMPLIFICACIÓN/DETECCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> • Tampón tricina • Acetato de potasio • Hidróxido potásico • Glicerol < 0,13% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% de cebadores para HPV ascendentes y descendentes • < 0,01% de cebadores para -globina ascendentes y descendentes • < 0,01% de sondas para HPV con marcadores fluorescentes • < 0,01% de sondas para -globina con marcadores fluorescentes • < 0,10% de ADN polimerasa EagleZ05 (microbiana) • < 0,10% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) microbiana 0,09% de azida sódica
SOLUCIÓN MG/MN	<ul style="list-style-type: none"> • Acetato de magnesio • Acetato de manganeso • < 0,02% de ácido acético glacial • 0,09% de azida sódica

3.2.3.3. DETECCIÓN DEL HPV

La detección del virus se realizó mediante los ciclos térmicos con ayuda de sondas de oligonucleótidos con cuatro marcadores fluorescentes que actúan como emisor (reporter) y un enmascarador (quencher). Conforme avanza la amplificación, las sondas complementarias del amplicón se unieron a las secuencias de ADN bicatenario específicas y luego se escinden por la actividad de las nucleasas 5' a 3' de la ADN polimerasa *Thermusspecies* EagleZ05. Una vez que el marcador emisor se separa del enmascarador por la actividad de la nucleasa, emite una señal de fluorescencia con una longitud de onda característica cuando se excita con el espectro lumínico adecuado.

Primero se calentó la mezcla de reacción de la PCR para activar la ADN polimerasa EagleZ05 y desnaturalizar el ADN vírico y el ADN genómico logrando exponer las secuencias objetivo de los cebadores. A medida que se enfrió la mezcla tanto en sentido ascendente como descendente, los cebadores inician la fase de alineamiento con las secuencias del ADN objetivo.

La ADN polimerasa EagleZ05, en presencia de metal divalente y exceso de dNTP, prolonga los cebadores y genera la síntesis de la segunda cadena de ADN. Con ello se completa el primer ciclo de la PCR, que da lugar a una copia de ADN bicatenario del fragmento objetivo del genoma del HPV y del gen α -globina. La ADN polimerasa elonga los cebadores hibridados junto con las plantillas objetivo para producir una molécula de ADN bicatenario objetivo del HPV de aproximadamente 200 pares de base o una molécula de ADN de α -globina de 330 pares de base denominada amplicón. Este proceso se repite un número determinado de ciclos, en cada uno de los cuales se duplica el volumen de ADN amplicón. La amplificación se produce solamente en la región del genoma de HPV y en el gen de la α -globina. No se amplifica el genoma completo.

La señal amplificada de los doce genotipos de HPV de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) se detectó con el mismo marcador fluorescente, mientras que las señales del HPV16 y HPV18 y de la α -globina se detectó con marcadores fluorescentes específicos.

3.2.3.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS VIRALES

Para la identificación de los genotipos virales se utilizó cebadores para definir una secuencia de aproximadamente 200 nucleótidos de la región polimórfica L1 del genoma del HPV. La mezcla maestra incluye un conjunto de cebadores para el HPV diseñados para amplificar el ADN del HPV de los 14 tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). Las sondas de oligonucleótidos fluorescentes se unen a las regiones polimórficas de la secuencia definida por dichos cebadores. Un par de cebadores y una sonda adicionales son específicos para el gen humano de la α -globina (amplicón de 330 bp) y actúan como control del proceso.

3.3. TOMA DE MUESTRA EN HOMBRES

La toma de muestra se realizó con una torunda de dracón humedecida con ácido acético, introducida en el meato uretral frotando de manera vigorosa desde el glande hasta el surco balano-prepucial, identificando algún tipo de condiloma o lesión, terminando el procedimiento se retira la torunda de dracón y se introduce dentro del vial conservante.

3.3.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL

Los pasos a seguir corresponden al procedimiento indicado por el fabricante para el diagnóstico *in vitro* de la prueba *Human Papillomavirus Genotyping Kit for 23 Types*.

Para la extracción de ADN se utilizó un kit comercial validado *Nucleo Spin Tissue MACHEREY-NAGEL*, según el protocolo establecido para muestras de tejido. (Anexo)

3.3.1. REACTIVOS UTILIZADOS

Se utilizó reactivos específicos compuesto por dos sets de reactivos: el set A contiene la reacción de PCR Mix, control positivo y control negativo y el set B, contiene el Lisado, POD, TMB 30% H_2O_2 , tirillas, que actúan mediante reacciones químicas indicando que hay infección de HPV, por un kit comercial de *Yaneng Bioscience (shenzhen) Co., LTD.*

Tabla 3.2. Reactivos empleados en la utilización de extracción y amplificación de muestras uretrales, mediante técnica de Dot Blot Reverso, se anexa la fotografía. **(Anexo 5)**

	REACTIVO	VOLUMEN	DESCRIPCIÓN
KIT I	PCR Mix	25x20 ul	Contiene Taq DNA polimerasa, Mg ⁺² , UDG, buffer, primers para IC y HPV
	Control positivo (PC)	1x10 ul	HPV DNA
	Control Negativo (NC)	1x10 ul	Sin HPV DNA

KIT	TIRILLAS	5 PIEZAS	Contiene sondas de oligonucleótidos fijadas a la tirilla
	Lisado	1x1.5 ml	Mezcla de desnaturalizantes

II	POD	1x75 ul	Conjugado EstraptavidinaPeroxidasa
	TMB	1x10 ml	3.3',5.5' Tetrametilbenzidina
	30%H ₂ O ₂	1x75 ul	

EQUIPOS UTILIZADOS:

- Centrifuga
- Agitador
- Termobloque (Que almacene los 100°C)
- Termociclador y horno de hibridación capaces de mantener temperaturas de reacción apropiadas.

3.3.3.2. AMPLIFICACIÓN DE PCR

La técnica de Dot Blot Reverso es un método combinado con PCR que permite la detección de 23 tipos de HPV, confirmando la presencia o ausencia de biomoléculas que son detectadas por sondas de ADN y la - actin funciona como control interno.

La reacción del mix para la amplificación de ADN se utilizó el juego comercial *Yaneng BIOscienCE*, que se encuentra debidamente lista para usar, se procede a colocar 5ul de la muestra, seguidamente el control positivo (CP) y el control negativo (CN) y es llevado al termociclador.

3.3.3. PRESERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Las muestras cervicales fueron almacenadas a temperatura ambiente, durante un tiempo no mayor a 24 horas, hasta su traslado al laboratorio de Biología Molecular donde fueron conservadas a temperatura de 2 a 8 °C hasta su procesamiento, en un periodo que no excedió los 7 días.

3.4. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron tabulados para lo cual se elaboraron tablas y gráficos estadísticos relacionando el HPV y los genotipos encontrados, edad promedio y motivo de consulta, fueron guardados en una hoja de datos Microsoft Office Excel 2007.

También se han ordenado y analizado los resultados con respecto a las variables previamente establecidas para el desarrollo de la presente investigación, se utilizó una estadística descriptiva, lo que permitió realizar cálculos de porcentajes, promedios entre otros.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

1.1. INFECCIÓN DE HPV EN MUJERES

De los 1 602 casos analizados se detectó la infección por HPV en 249 pacientes, lo que representa un 16 % de positividad. (Tabla 4)

TABLA 4.- Frecuencia de infecciones de HPV, en mujeres que acudieron a controles ginecológicos.

IDENTIFICACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL	MUESTRAS CERVICALES	
	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
POSITIVAS	249	16
NEGATIVAS	1353	84
TOTAL	1602	100

De estos, en 206 pacientes se identificó la presencia de infecciones simples, es decir solo presentaron uno de los tres marcadores que se detectan con esta metodología (HPV 16, HPV 18 o HPV AR). El mayor porcentaje se encontró en los genotipos HPV-AR. (Tabla 4.1)

TABLA 4.1 - Frecuencia de infecciones simples de HPV en mujeres.

GENOTIPOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
HPV 16	51	20,5
HPV 18	17	6,8
HPV – AR	138	55,4
TOTAL	249	100

En 43 pacientes positivos (17.3 %) se identificaron infecciones múltiples, que se definen como la presencia en una misma muestra de más de uno de los genotipos detectados por el juego diagnóstico. Las coinfecciones más frecuentes fueron HPV AR y HPV 16, detectadas en el 62,8 % de los casos positivos con coinfecciones. La presencia de los genotipos oncogénicos combinados con otros genotipos de alto riesgo solo fue encontrada en tres pacientes, lo que representa el menor porcentaje. (Tabla 4.2)

TABLA 4.2.- Frecuencia de coinfecciones múltiples según genotipos detectados.

GENOTIPOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
HPV16 + HPV18	5	11,6
HPV16 + HPV AR	27	62,8
HPV18+ HPV AR	8	18,6
HPV16- HPV 18+ HPV AR	3	6,9
TOTAL	43	100

Al analizar el seguimiento del motivo de solicitud de estudio a las 1 602 mujeres, en edades comprendidas entre 18 y 75 años, con un promedio de edad de 41,5 años, nos indicó diferentes signos y síntomas, en las que se pretende conocer la relación que existe entre la positividad del virus de HPV con el motivo de consulta.

Tabla4.3.- Frecuencia de 1 602 mujeres que asistieron a consulta ginecológica.

MOTIVO DE CONSULTA	N°	POSITIVOS	PORCENTAJE (%)
INCONTINENCIA URINARIA	109	21	19
DISPLASIA VULVAR	110	10	9
TUMOR BENIGNO	61	1	2
AMENORREA	164	15	9
CANDIDIASIS	148	21	14
VAGINITIS	143	26	18
OVARIOS POLIQUISTICOS	105	19	18
EMBARAZO ABDOMINAL	67	10	15
MASTODINEA	99	16	16
DISURIA	133	31	23
MESTRUACIÓN IRREGUL	105	16	15
CONDILOMAS	107	15	14
INFERTILIDAD	62	3	5
INFECCIONES URINARIAS	139	45	32
SIN DIAGNÓSTICO	50	0	0
TOTAL	1602	249	16

Al relacionar la positividad de las mujeres estudiadas con el motivo de solicitud médica, se evidencio que el principal motivo de indicación fue la amenorrea en las edades de 33 a 37 años con un 26 %, seguido vaginitis en mujeres de 38 a 42 años con un 58 %, como se indica en las (Tabla4.4, Tabla4.5).

Tabla 4.4.-Signo más frecuente estudiado en mujeres.

EDAD	AMENORREA	POSITIVOS	PORCENTAJE (%)
18-22	8	0	0
23-27	9	0	0
28-32	16	0	0
33-37	23	6	26
38-42	25	1	4
43-47	20	2	10
48-52	18	3	17
53-57	21	0	0
58-62	14	2	14
63-68	4	0	0
69-75	6	1	17
1602	164	15	9

Tabla 4.5.-Segundo signo más frecuente estudiado en mujeres por motivo de consulta.

EDAD	VAGINITIS	POSITIVOS	PORCENTAJE (%)
18-22	27	5	19
23-27	30	4	13
28-32	31	4	13
33-37	9	2	22
38-42	12	7	58
43-47	15	1	7
48-52	8	1	13
53-57	6	1	17
58-62	5	1	20
63-68	0	0	0
69-75	0	0	0
1602	143	26	18

El mayor número de casos según porcentaje positivo, se encontró en mujeres cuyo motivo de indicación del estudio fue la presencia de infección de vías urinarias (Tabla 4.6).

Tabla 4.6.- Mayor número de casos según porcentaje.

EDAD	INFECCIÓN DE VIAS URINARIAS	POSITIVOS	PORCENTAJE (%)
18-22	23	1	4
23-27	19	7	37
28-32	23	6	26
33-37	19	11	58
38-42	11	7	64
43-47	14	5	36
48-52	13	1	8
53-57	9	3	33
58-62	5	4	80
63-68	3	0	0
69-75	0	0	0
1602	139	45	32

1.2. RESULTADOS DE INFECCIÓN DE HPV EN HOMBRES.

Se encontraron 30 casos positivos para HVP, lo que representó el 18 % (30/169), de estos 15 con infecciones de alto riesgo y 15 con infecciones de bajo riesgo. Los genotipos de alto riesgo que se detectan por la técnica utilizada son HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 y 83. Los de bajo riesgo son HPV 6, 11, 42, 43 y 81.

El genotipo de alto riesgo más identificado en el estudio fue el HPV 45, detectado en 4 muestras que corresponde al 13.3%. Los otros genotipos detectados fueron HPV 33, HPV 56, HPV 73, HPV 58, HPV 59 y HPV 68

estos dos últimos detectados en menor porcentaje respecto al total de positivos de alto riesgo. (Tabla 4.7)

TABLA 4.7.- Frecuencia de genotipo de alto riesgo

ALTO RIESGO	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
HPV 45	4	13,3
HPV 33	2	6,7
HPV 56	2	6,7
HPV 58	3	10,0
HPV 59	1	3,3
HPV 68	1	3,3
HPV 73	2	6,7
TOTAL	15	100

Los genotipos de bajo riesgo detectados fueron HPV 6 en el 16.7 % y HPV 11, HPV 42, HPV 43 y HPV 81 en menor grado. (Tabla 4.8)

TABLA 4.8.-- Frecuencia de genotipos de bajo riesgo

BAJO RIESGO	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
HPV 6	5	16,7
HPV 11	3	10,0
HPV42	3	10,0
HPV 43	3	10,0
HPV 81	1	3,3
TOTAL	15	100

En lo que respecta a las infecciones de alto y bajo riesgo de HPV dependiendo de la edad los resultados fueron los siguientes:

El rango de edad de este universo fue de 18 a 62 años. El promedio de edad fue de 36,5. La mayor frecuencia de la infección para todos los genotipos de HPV estudiados.

Los valores más altos de la infección se ubicaron en los rangos de 23 a 27 años con 9 personas que representan una positividad de 30%, el siguiente grupo se dio entre 18 a 22 y 38 a 42 años, la infección se redujo hasta 13.3% respectivamente, pero se incrementó, una vez más en el rango de 33 a 37 años con 20%, en los hombres de 38 a 42 años la infección se redujo a un 13.3% y por último el rango de edad con menor frecuencia se dio de 58 a 62 años con un 3.3%. (Tabla 4.9).

TABLA 4.9.- Detección de HPV de acuerdo a edad cronológica

EDAD	POSITIVOS	PORCENTAJE (%)
18-22	4	13,3
23-27	9	30,0
28-32	5	16,7
33-37	6	20,0
38-42	4	13,3
43-47	0	0
48-52	0	0
53-57	0	0
58-62	1	3,3

Al analizar el seguimiento del motivo de solicitud de estudio a los 169 hombres, nos indicó diferentes signos y síntomas, en las que se pretende conocer la relación que existe entre la positividad del virus de HPV con el motivo de consulta (**Tabla 4.10**).

Tabla 4.10.- Frecuencia de 169 hombres que asistieron a consulta con el urólogo.

MOTIVO DE CONSULTA	N°	POSITIVOS	PORCENTAJE (%)
CONDILOMAS	50	11	22
CISTITIS	29	4	14
TUMOR BENIGNO	8	0	0
SIFILIS	21	4	20
INFECCIÓN BACTERIANA	18	4	21
ESTERILIDAD	2	0	0
VARICES ESCROTALES	9	1	11
HIV	10	2	19
VIRUS DEL HERPES	16	3	19
TRASTORNOS DEL PENE	6	1	17
TOTAL	169	30	18

Al relacionar la positividad de los hombres estudiadas por el motivo de solicitud médica, se evidencio que el principal motivo de indicación fueron condilomas en las edades de 23 a 37 años con un 66%, seguidode infección bacteriana con un 67 % de 23a 27 años, como se indica en las (**Tabla 4.11, Tabla 4.12**).

Tabla 4.11.- Signo más frecuente estudiado en hombres.

EDAD	CONDILOMAS	POSITIVOS	PORCENTAJE (%)
18-22	5	1	20
23-27	13	3	23
28-32	10	2	20
33-37	13	3	23
38-42	9	2	22
43-47	0	0	0
48-52	0	0	0
53-57	0	0	0
58-62	0	0	0
169	50	11	22

Tabla 4.12.- Segundo signo más frecuente estudiado en hombres por motivo de consulta.

EDAD	INFCCION BACTERIANA	POSITIVOS	PORCENTAJE (%)
18-22	5	0	0
23-27	3	2	67
28-32	2	1	50
33-37	3	1	33
38-42	0	0	0
43-47	2	0	0
48-52	1	0	0
53-57	2	0	0
58-62	0	0	0
	18	4	21

1.3. DISCUSIÓN

1.3.1. HPV EN MUJERES

En este estudio se evidenció la presencia de HPV en el 16 % de las 1 602 mujeres atendidas. Este valor de positividad guarda relación con las características de la muestra estudiada y los criterios de inclusión del estudio, dado que se analizaron pacientes que acudieron a la consulta para un chequeo de rutina. Otros autores como (Paz Zulueta M, Fernandez Feito A, Amparan Ruiz M, Otero García 2015) reportan resultados un poco más elevados en estudios realizados bajo estas condiciones indican que la prevalencia de alto riesgo fue de 28 %. La frecuencia de la infección por HPV en los diversos estudios puede variar en función de la sensibilidad de los métodos utilizados para la detección y tipificación del virus, la procedencia geográfica de los pacientes estudiados y las características del estudio.

Dentro de los casos positivos resulta de importancia la presencia de los genotipos oncogénicos HPV 16 y HPV 18 en el 20.5% y el 6.8 % de las muestras respectivamente. Estos genotipos están asociados al riesgo de cáncer uterino y han sido reportados por otros autores. En un estudio realizado en México por (Hernández, Smith, Lorincz & Lazcano, 2005), se reportó la detección de HPV de alto riesgo (genotipos 16 -18) por técnicas moleculares en el 14.2 % de mujeres no embarazadas.

De acuerdo a nuestros resultados el HPV 18, con un 6.8% de frecuencia en infecciones simples, no aparece como el segundo genotipo más frecuente en las infecciones por este virus, como es la tendencia a nivel mundial como indica un estudio realizado en China, por Liuzhou la prevalencia en mujeres es de 9.4%. (Wei F, Yin K, Wu X, Lan J, Huapg S, Sheng W, Zhao J, 2014) Esto confirma que existe una gran diversidad en la distribución de los tipos de HPV entre las poblaciones.

En este estudio el 17,3 % de los casos positivos presentaron coinfecciones múltiples. La presencia de combinación de genotipos de alto riesgo en las pacientes aumenta el riesgo de cáncer de cuello uterino, lo que ha sido reportado en la literatura por un estudio reportado por AsiKa, Hong JH y Lee, realizado en Korea, donde se estudiaron 968 mujeres, la prevalencia basada en el ensayo fue de 33.7%; 225 mujeres tenían infección individual y 101 infección múltiple. (So, Hong, & Lee, 2016).

Los datos obtenidos por seguimiento de motivo de consulta con la positividad del virus se relacionaron directamente con amenorrea y vaginitis lo que nos muestra que en nuestra población estudiada es más susceptible a la infección del virus por estos signos estudiados que el resto de signos y síntomas establecidos por los ginecólogos como indicación de motivo de consulta.

Estos resultados son de importante consideración para definir estrategias del uso de las vacunas en pacientes menores de 14 años, sin relaciones sexuales. En la actualidad se dispone de tres vacunas comerciales contra el HPV, una bivalente contra los genotipos oncogénicos 16 y 18 y otra cuadrivalente contra los virus 16, 18, 6 y 11 y por último 9-valente para los genotipos HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58. Se ha demostrado su capacidad contra la infección de HPV y prevención, logrando evitar infecciones persistentes y a su vez la integración del virus al genoma celular y desencadenar una gama de lesiones que conducen al cáncer. El Ministerio de Salud Pública del Ecuador ha iniciado desde el año 2014 la aplicación de vacunas en niñas de 9 a 11 años con la vacuna bivalente; los resultados de este estudio respaldan esta estrategia de salud.

Aunque algunos autores como (Cardona J, Puerta J, Flores J, 2011) indican que el cáncer de cuello uterino a nivel de Latinoamérica sigue siendo un problema de salud pública. El uso de citología para la detección del virus no tiene mayor impacto en las tasas de incidencia y mortalidad, utilizar un solo método de detección del HPV puede subestimar la verdadera prevalencia de la infección por este virus en muestras

cervicales y recomiendan trabajar en forma secuencial con varios sistemas, utilizando primers dirigidos hacia otras regiones del genoma viral o con varias técnicas moleculares, la prueba utilizada en este estudio es la única clínicamente validada por aprobación de la FDA y la Comunidad Europea (CE-IVD). Presenta alta sensibilidad en la detección de infección por HPV, por lo que se sugiere como prueba primaria para la detección temprana del virus con vistas a la prevención de cáncer de cérvix.

DISCUSION EN HOMBRES

El HPV en mujeres ha sido ampliamente estudiado por el desarrollo del cáncer de cuello del útero pero su asociación con el cáncer de pene no está totalmente definido, los genotipos más frecuentemente encontrados en este estudio tienen una alta relevancia en nuestro medio; se evidencio que el 18 % de 169 hombres atendidos presentaron la presencia del virus, los datos presentados por la revista de urología por la revista médica de Costa Rica indico que de 119 pacientes el 19% resultaron positivos (Wendy L Mora Mora, 2014). Tomando en cuenta que ha sido catalogado como un vector silencioso de este microorganismo por lo que juega un papel muy importante en la transmisión si le confiere un HPV de alto riesgo a su pareja puede contraer cáncer de útero.

La prevalencia de la infección por el HPV en hombres puede variar de un estudio a otro debido a la metodología utilizada para la detección e identificación del virus, tomando en cuenta la población, tipo de muestra y zona anatómica, debido a que existe una gran variabilidad de incidencia de este virus dependiendo del lugar donde se obtiene la muestra; el genotipo de alto riesgo más identificado fue el HPV 45 con 13.3% y en menor frecuencia HPV 33, HPV 56, HPV 73, HPV 58, HPV 59 y HPV 68, otros autores nos muestran que la prevalencia de los genotipos de alto y bajo riesgo fueron HPV 6 en el 16.7 % y HPV 11 en menor grado y HPV 6 y HPV 52 fueron detectados con un 43 % estos genotipos están

asociados a los condilomas. (Ramón Silva, Daniela León, Priscila Brebi, Carmen Ili, Juan C. Roa y Raúl Sánchez, 2013).

Al analizar el seguimiento del motivo de solicitud de estudio a los 169 hombres, nos indicó diferentes signos y síntomas, se evidencio que el principal motivo de indicación fueron condilomas seguido por infección bacteriana, Aunque la frecuencia de la infección no es muy diferente a los grupos señalados, el mayor porcentaje se encontró en la edades de 23 a 27 años, la explicación que se ha dado al comportamiento de la infección en relación con la edad, es que está vinculado al comportamiento sexual a edades muy tempranas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados en esta investigación mediante la exposición de los resultados se concluye:

1. La prevalencia de infección por HPV en mujeres fue de un 16 % (249 casos) y en hombres el 18% (169 casos), lo que permite concluir que los métodos diagnóstico de ADN para la detección de HPV deben sustentarse en protocolos, los que por obligación deben conocerse.
2. Las infecciones simples y múltiples detectadas en mujeres, nos indica que deberán llevar un control obligatorio de los programas de tamizaje para afrontar posibles cáncer de útero, haciendo uso del algoritmo propuesto.
3. El genotipo de alto riesgo más identificado en el estudio de hombres fue el HPV 45 y de bajo riesgo el genotipo HPV 6, lo que nos muestra que el hombre va a infectar a su pareja pudiendo contraer cáncer de útero y condilomas si el virus no es detectado a tiempo.
4. En mujeres se identificó la presencia del virus en las edades de 33 a 37 años, lo que revela un índice elevado de transmisión del virus en edades reproductivas al feto durante el parto y a sus parejas sexuales, contribuyendo con esto a la propagación de la infección.
5. De manera particular la utilización de técnicas moleculares de alta sensibilidad y especificidad como la empleada en este estudio, permite la detección temprana del HPV y el seguimiento médico, con vistas a detectar lesiones cervicales de alto grado, condilomas y cáncer.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Tras la presentación de los resultados de esta investigación se conoce la verdadera prevalencia a nivel hospitalario, se sugiere elaborar protocolos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de este virus dentro de la institución para que los médicos impartan los conocimientos adquiridos a sus pacientes.
2. Considerar la prevalencia de este estudio para realizar estudios moleculares, con el fin de disminuir el número de casos de cánceres a futuro.
3. Estimular la vacunación de mujeres jóvenes entre 14 a 26 años, mantener alimentación saludable con presencia de antioxidantes que ayudan a mejorar el sistema inmune y disminuye el riesgo de contagio.
4. Continuar con investigaciones sobre el virus del papiloma.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aranda Flores, C. E. (2016). Infección por virus del papiloma humano: historia natural del cáncer de pene. *Gaceta Mexicana de Oncología*, (xx), 10–13. <http://doi.org/10.1016/j.gamo.2015.12.011>
- Burks, H. R., Smith, K. M., Wentzensen, N., Tenney, M., Dunn, S. T., Wang, S. S., & Gold, M. A. (2012). Previous Treatment for Cervical Intraepithelial, *15*(1), 11–14. <http://doi.org/10.1097/LGT.0b013e3181ed3d6d.RISK>
- Cardona J, Puerta J, Flores J, Prevalencia del virus papiloma humano y sus factores de riesgo en hombres: revisión sistemática. Artículo de revisión *Infectio*. 2011; 15 (4): 268-276.
- Coelho, PLS, Calestini, GL da S., Alvo, FS, Freitas, JM de M., Castro, PMV, y Konstantyner, T. (2015). Seguridad del virus del papiloma humano tipo 6, 11, 16 y 18 (recombinante):. Revisión sistemática y meta-análisis de *la Revista Paulista de Pediatría*, 33 (4), 474-482. <http://doi.org/10.1016/j.rpped.2015.02.006>
- Chagas, B. S., Gurgel, A. P. A. D., da Cruz, H. L. A., Amaral, C. M. M., Cardoso, M. V., Neto, J. da C. S., ... Freitas, A. C. de. (2013). An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 32–37. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.016>
- Hariri, S., & Markowitz, L. (2012). Monitoring HPV vaccine impact: Early results and ongoing challenges. *Journal of Infectious Diseases*, 206(11), 1633–1635. <http://doi.org/10.1093/infdis/jis593>

- Herrera Ya, Piña, P, Sánchez Historia del desarrollo de las pruebas de detección para el cáncer de cuello útero. Revista médica Registro de cáncer, la unidad de investigación, Mérida, Yucatán, México 2015
- Insinga, R. P., Dasbach, E. J., Elbasha, E. H., Liaw, K.-L., & Barr, E. (2007). Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women. *Infectious Agents and Cancer*, 2(43), 15. <http://doi.org/10.1186/1750-9378-2-15>
- José A. Cabrera V., Oswaldo J, Cárdena H, Manuel A, Campoverde C, José I & Ortiz S, prevalencia de genotipos del papiloma humano en mujeres de la provincia de Azuay, Ecuador. 2015.
- Khot, K. P., Deshmane, S., & Choudhari, S. (2016). Human Papilloma Virus in Oral Squamous Cell Carcinoma - The Enigma Unravelling. *The Chinese Journal of Dental Research : The Official Journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA)*, 19(1), 17–23. <http://doi.org/10.3290/j.cjdr.a3569>
- Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders P J F & Clifford GM, Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011; 128:927-935. doi: 10.1002/ijc.25396.
- Maestri Pardo, I. F. (2014). Métodos actuales de diagnóstico del cancer de cuello uterino. *Revista de Ciencias Médicas. La Habana*, 21(1), 130–140. Retrieved from http://revcmhabana.sld.cu/index.php/rcmh/article/view/715/pdf_34
- Martinez, G. G., & Troconis, J. N. (2014). Natural history of the infection for human papillomavirus: an actualization. *Investigacion Clinica*, 55(1), 82–91.

Martínez, R. R., & Otero, G. S. (2013). Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Applications and inconvenient of Fluorescence in situ hybridization technique (FISH) in the identification of microorganism. *Salud Uninorte. Barranquilla*, 29(2), 327–340.

Mex, D. R. (2014). Genotipificación del virus del papiloma humano en hombres con condilomas acuminados del Centro Dermatológico Dr . Pascua Genotyping of Human Papillomavirus in Men with Condyloma Acuminata from Dermatological Center, 10–17.

Negrin, L. G. C. (2015). Epidemiology of cervical cancer in Latin America. *Ecancermedicalscience*, 9, 1–14.
<http://doi.org/10.3332/ecancer.2015.577>

Ochoa Carrillo, F. J., Guarneros de Regil, D. B., & Velasco Jiménez, M. T. (2015). Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(3), 157–163.
<http://doi.org/10.1016/j.gamo.2015.08.002>

Resende, LS de A., Rabelo-Santos, SH, Sarian, DC, Alves, FRR, Ribeiro, AA, Zeferino, LC, y Derchain, S. (2014). Un retrato de las infecciones por VPH de tipo simples y múltiples en las mujeres brasileñas de diferentes estratos de edad con lesiones cervicales escamosas o glandulares. *BMC Infectious Diseases* , 14 , 214.
<http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-214>

Rivera Z., René, Aguilera T., Jorge, & Larraín H, Angelica.2002.Epidemiología del Virus del Papiloma Humano (HPV)Revista Chilena de Obstetricia y ginecología 67(6),501-506<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262002000600013>

Rodríguez González, D., Pérez Piñeiro, J., & Sarduy Nápoles, M. (2014). Infección por el virus del papiloma humano en mujeres de edad mediana y factores asociados. *Revista Cubana de Ginecología Y Obstetricia*, 40(2), 218–232. Retrieved from

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0138-600X2014000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Roura, E., Travier, N., Waterboer, T., de Sanjosé, S., Bosch, F. X., Pawlita, M., ... Castellsagué, X. (2016). The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PloS One*, *11*(1), e0147029. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0147029>
- Sanabria Negrín, J. G. (2009). Virus del Papiloma humano. *Revista de Ciencias Médicas: Pinar Del Río*, *3*(4), 168–187. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-11-182>
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *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>
- Sawaya, G. F., & Smith-Mccune, K. (2016). Cervical Cancer Screening. *Obstet Gynecol*, *127*, 459–67. <http://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001136>
- Silva, R., León, D., Brebi, P., Ili, C., Roa, J. C., & Sánchez, R. (2013). [Detection of human papilloma virus infection in men]. *Revista Chilena de Infectología : Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, *30*(2), 186–92. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182013000200009>
- So, K. A., Hong, J. H., & Lee, J. K. (2016). Human Papillomavirus Prevalence and Type Distribution Among 968 Women in South Korea, *21*(2), 104–109.
- Stratton, K., & Culkin, D. (2016). A Contemporary Review of HPV and

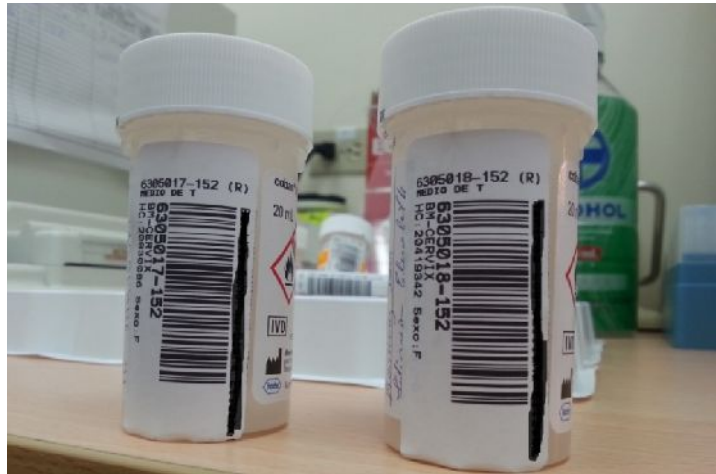
Penile Cancer. *Oncology*, 1–8. Retrieved from
<http://www.cancernetwork.com>

Vargas-Hernández, V. M., Vargas-Aguilar, V. M., & Tovar-Rodríguez, J. M.
(2015). [Primary cervical cancer screening]. *Cirugía Y Cirujanos*,
83(5), 448–53. <http://doi.org/10.1016/j.circir.2014.09.001>

ANEXOS

ANEXO 1

TRASLADO DE MUESTRAS AL LABORATORIO PARA PROCESAMIENTO Y DETECCIÓN DEL HPV



Vial de solución conservante (PreservCyt) con sus respectivos cepillo,
para toma de muestras cervicales.



Vial conservante de muestra con torunda de dracon, para toma de
muestras uretrales.

ANEXO 2

EQUIPOS UTILIZADOS PARA EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE HPV EN MUJERES



EXTRACTOR AUTOMÁTICO (COBAS 480)



TERMOCICLADOR (COBAS Z 480)

EQUIPOS UTILIZADOS PARA DETECCIÓN DE HPV EN HOMBRES



Baño maría (MEMMERT)



Horno (YANEG BIOCIENCE)



Termociclador convencional (GENEAMPPCR SYSTEM 9700)

ANEXO 3

DOCUMENTO DE APROBACIÓN Y COOPERACIÓN POR PARTE DE LAS AUTORIDADES DE LA INSTITUCIÓN, PARA EL DESARROLLO DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.



Guayaquil, 20 de julio del 2016

Señores

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

De mis consideraciones:

Por medio de la presente informo a ustedes que se ha procedido a la revisión del Proyecto de Investigación de la Lcda. Lissette Rivera Zavala, como requisito para la obtención del título de Magister en Biotecnología Molecular, con el tema:

"DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV) MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL Y DOT BLOT REVERSO". HOSPITAL LUIS VERNAZA.

Siendo un estudio tipo observacional descriptivo retrospectivo, se han realizado las correcciones pertinentes, por lo tanto pasa a su conocimiento para su evaluación y aprobación definitiva.

El investigador se compromete a presentar los respectivos avances de la investigación a este departamento.

Atte

Dr. Daniel Tettamanti M.
Jefe del Dpto. de Investigación Médica
dtettamanti@central.jbgye.org.ec
PBX: (593) 4 2560300 Ext. 2404

ANEXO 4

REACTIVOS EMPLEADOS PARA LA UTILIZACIÓN DE EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS CERVICALES



Proteínasa k, reactivo SDS, tampón de lisis, macropartículas magnéticas, tampón de elución, tampón de lavado, control positivo, control negativo, kit de amplificación/detección y solución MG/MN.

ANEXO 5

PROGRAMA DE PERFIL TÉRMICO

PROCEDIMIENTO	T°	TIEMPO	CICLOS	NOTAS
1	50°C	15 min	1	
2	95°C	10 min	1	
3	94°C	10seg	10	Velocidad de rampa 0.8°C/s
	42°C	90seg		
	72°C	30seg		
4	94°C	10seg	30	Velocidad de rampa 0.8°C/s
	46°C	60seg		
	72°C	20seg		
5	72°C	5min	1	

ANEXO 6

ALGORITMO PROPUESTO PARA EL TAMIZAJE DE CÁNCER CERVICAL.

