



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**“Tesis de grado presentada como requisito para la  
obtención del título de BIÓLOGO”**

**Detección del Genoma del *Papilomavirus*  
*humano* aplicando la técnica Reacción en  
Cadena de la Polimerasa en tiempo real.**

**LINDSAY KAREN GARCÍA RODRÍGUEZ**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**2008**

**Director de Tesis**

---

Blga. Mónica Armas

**Co-Director de Tesis**

---

Blgo. Ramiro Burgos Galárraga

# INFORME SOBRE SUSTENTACION Y DEFENSA DE TESIS

**Detección del Genoma del *Papilomavirus humano* aplicando la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real.**

**Lindsay Karen García Rodríguez**

Presidente del Tribunal .....

Miembro del Tribunal .....

Miembro del Tribunal .....

Secretario de la Facultad .....

Guayaquil, ..... del 200...

## **DEDICATORIA**

A mi madre Mercedes Rodríguez por su amor y ayuda incondicional que me ha brindado cada día de mi vida y que con sus enseñanzas y sacrificio me ha llevado por el camino del bien

A mi hermana Evelyn García R. por su apoyo y ejemplo de superación que en cada momento me recuerda la bondad infinita del ser humano creado por Dios.

A mi padre Miguel García y a mi hermana Kelly García quienes siempre ocuparan un lugar en mi corazón.

A mis compañeros del primer semestre de clases en Biología a quienes les estaré siempre agradecida por ayudarme en los momentos en que más lo necesitaba.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Guayaquil y en especial a todos los docentes de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales por la formación profesional que me han brindado en estos años.

A la Bióloga Mónica Armas, Directora de este trabajo de Tesis

Al Blgo. Ramiro Burgos Galárraga, Codirector de tesis y amigo.

A las Biólogas Ruth Chóez de Quezada, Elba Mora de Baños, Edith Herrera y Matilde Cornejo, por su colaboración en la revisión del anteproyecto y tesis final.

Al Ingeniero Guillermo Baños por su colaboración en la revisión de este trabajo en el análisis estadístico.

Al Dr. Juan Carlos Ruiz, jefe del Laboratorio Clínico del ION SOLCA Guayaquil por brindarme todas las posibilidades y mano amiga en el desarrollo de esta tesis.

Al Equipo humano del Laboratorio de Biología Molecular del ION-SOLCA: Blgo. Ramiro Burgos, Blga. Tatiana Puga, Lic. Franklin Almeida, por la oportunidad de desarrollo profesional de calidad y amistad que siempre me han brindado.

Al Dr. Rommel Ramirez jefe del área de Colposcopia del ION-SOLCA Guayaquil y a su equipo medico y administrativo del área por el apoyo y asesoramiento en la toma de muestras.

A la Dra. Aurora Romero por su colaboración en casos patológicos.

A mi madre Mercedes Rodríguez y a mis hermanas Evelyn y Kelly García por toda su ayuda en el transcurso de mi carrera.

A mi novio Adrián Piedra y a mis amigos Nelly Mora y Jorge Puente por su apoyo incondicional.

Agradecimiento y reconocimiento especial a cada una de las pacientes que participaron en este trabajo, aunque sus nombres queden en el anonimato, su colaboración para con la ciencia ha sido un fuerte puntal en el desarrollo de nuevas técnicas destinadas a la detección precoz, prevención, y mejor tratamiento del Cáncer.

## RESUMEN

El *Papilomavirus humano* (HPV por sus siglas en inglés) pertenece al Género *Papilomavirus* de la familia Papoviridae y son virus sin envoltura. En particular la familia Papoviridae incluye virus que provocan evidentes afecciones clínicas no solo en humanos sino también en animales. Desde la década de los 90 varios estudios con el soporte de la tecnología molecular han demostrado que la infección con genotipos del *Papilomavirus humano* de alto riesgo es una causa bien establecida del desarrollo de cáncer cérvico uterino<sup>[1, 3, 30]</sup>, patología que constituye el 51% de todos los cánceres detectados en la población femenina que acude al ION SOLCA-Guayaquil<sup>[25]</sup>.

Técnicas de detección temprana molecular del HPV como la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (Polimerase Chain Reaction, PCR), PCR en tiempo real (real-time PCR) entre otras, se están convirtiendo en importantes herramientas de los protocolos de prevención y manejo del cáncer cérvico uterino *in situ*. La PCR es una de las técnicas moleculares más utilizadas debido a que copia millones de veces, in-vitro, un segmento de ADN<sup>[21]</sup>. Esta copia exponencial le da a esta prueba un alto nivel de sensibilidad<sup>[30]</sup>. En el caso del HPV existe una región especial del genoma denominada Región L1 donde se tipifica este virus; para lograrlo se utilizan cebadores especiales (GP5+ y GP6+) que delimitan esta región y se amplifica mediante la técnica de PCR en tiempo real, determinando de esta forma la presencia o ausencia del virus<sup>[16]</sup>.

El presente trabajo de tesis busca detectar el genoma del *Papilomavirus humano* mediante la técnica de la PCR en tiempo real en pacientes sospechosas o ya diagnosticadas con infección por HPV y comparar su especificidad y sensibilidad con la técnica diagnóstica de histopatología

Se analizó un total de 99 muestras obtenidas de 52 pacientes sospechosas o con diagnóstico de infección por HPV, divididas en dos grupos de análisis para comparar técnicas de extracción de ADN.

La extracción mediante el uso del Kit Wizard de Promega dio mejores resultados en la amplificación por PCR en tiempo real, al obtener ADN de mayor pureza comparado con el método Invitrogen –Innogenetics.

Al evaluar la calidad de la detección por PCR en tiempo real nos dio como resultado un 95.23% de sensibilidad y un 11.11% de especificidad.

De acuerdo a la prueba de Ji cuadrado  $X^2$  y con un nivel de confianza del 95%, se determinó que las dos pruebas de detección (PCR en tiempo real y el análisis histopatológico) guardan relación ( $0.408 < 3.841$ ).

La detección molecular del *Papilomavirus humano* mediante PCR en Tiempo real es posible, siempre y cuando se maneje con precaución cada uno de los procesos en especial el mantener la muestra adecuada y compatible con la reacción de amplificación.

## SUMMARY

The Human Papillomavirus (HPV by its acronym in English) belongs to the Papillomavirus genus and Papoviridae family and they are non enveloped viruses. Papoviridae family includes viruses that cause evident clinic diseases not only in humans but also in animals. Since the 90, several studies with the support of molecular technology have shown that infection with high risk Human Papillomavirus genotype is a well-established cause of developing cervical cancer <sup>[1, 3, 30]</sup>, which constitutes 51% of all cancers detected in the female Guayaquil population according to statistics ION-Solca Guayaquil<sup>[25]</sup>.

Molecular techniques for early detection of HPV as the conventional Polymerase Chain Reaction (PCR), real-time PCR among others, are becoming important tools for preventing and handling protocols of cervical cancer *in situ*. The PCR is one of the most commonly used molecular techniques because they copy million times, in-vitro, a segment of DNA <sup>[21]</sup>. This exponential copy gives this test a high level of sensitivity <sup>[30]</sup>. In the case of HPV there is a special region of the genome called L1 region where typifies this virus, are used to achieve special primers (GP5+ and GP6 +) that define this region and is amplified by PCR technique in real time, determining virus presence or absence <sup>[16]</sup>.

This thesis seeks to detect the human Papillomavirus genome through the technique of real-time PCR in patients suspected or diagnosed as infected with HPV and compare their sensitivity and specificity with the diagnostic technique of histopathology.

A total of 99 samples taken from 52 patients suspected or diagnosed with HPV infection had been analyzed, divided into two groups of analysis to compare DNA extraction techniques.

Extraction using the kit Wizard of Promega gave better results in amplification by real-time PCR, to obtain DNA higher purity compared with the method Invitrogen-Innogenetics.

In assessing the quality of detection by real-time PCR proves resulted in a 95.23% of sensitivity and 11.11% of specificity.

According to evidence chi square  $X^2$  with a confidence level of 95%, it was determined that the two tests (real-time PCR and histopathological analysis) are related ( $0,408 < 3,841$ ).

The molecular detection of *Human Papillomavirus* through real-time PCR is possible, provided they are handled with caution each of the processes in particular the maintenance of an adequate and consistent probe with the amplification reaction.

# INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. OBJETIVOS .....	4
<b>2. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>5</b>
2.1. HISTORIA DEL <i>PAPILOMAVIRUS HUMANO</i> .....	5
2.2. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES.....	7
2.3. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL.....	8
2.4. CICLO VIRAL .....	9
2.4.1. Infección e Incubación.....	9
2.4.2. Mantenimiento del Genoma Viral.....	10
2.4.3. Fase de Proliferación y Amplificación Genómica.....	10
2.4.4. Síntesis del Virus .....	12
2.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR HPV .....	12
2.5.1. Infecciones Clínicas.....	13
2.5.1.1. Verrugas y Condilomas.....	13
2.5.1.2. PAP II e Infecciones del Canal Cérvico Uterino.....	13
2.5.1.3. Displasias.....	14
2.5.1.4. Cambios Celulares .....	15
2.6. TECNICAS DE DIAGNÓSTICO DEL <i>Papilomavirus Humano</i> .....	16
2.6.1. Citología.....	16
2.6.2. Colposcopia y Serología .....	17
2.6.3. Patología.....	18
2.6.4. Detección Molecular y Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	18
2.6.4.1. PCR en Tiempo Real.....	20
2.6.4.1.1. Reactivos esenciales en la PCR en tiempo real ....	21
2.7. AVANCES EN INVESTIGACIÓN.....	25

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. AREA DE ESTUDIO.....	28
3.2. MATERIALES .....	28
3.2.1. Requisitos de Infraestructura .....	28
3.2.2. Requisitos de Equipos .....	29
3.3. METODOS .....	30
3.3.1. Levantamiento de información .....	30
3.3.2. Métodos empleados.....	30
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA .....	34
4.2. AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL POR PCR EN TIEMPO REAL.....	39
4.3. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	54
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>7. GLOSARIO .....</b>	<b>58</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>61</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE ANEXOS

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Anexo 1. Imagen de la base datos Access utilizada en el levantamiento de información .....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 2. Protocolo de Extracción de ADNKit de extracción ADN WIZARD-PROMEGA.....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo 3. Protocolo de Extracción de ADN Invitrogen - INNOGENETICS .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo 4. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de Muestras.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo 5. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de Muestras obtenidas en la región Exocervical con Cotonete y Espátula de Ayre.....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo 6. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de Muestras obtenidas en la región Endocervical con Citobrush.....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo 7. Protocolo de purificación orgánica de ADN con Fenol-Cloroformo .....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo 8. Cuantificación del ADN HPV obtenido del segundo grupo de muestras.....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo 9. Comparación de resultados según Patología y PCR en tiempo real .....</b>	<b>74</b>
<b>Anexo 10. Análisis Ji cuadrado <math>X^2</math> .....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1. Conejo con lesiones papilomatosas producidas por el CRPV descrito por R. Shope. (Tomada de: <a href="http://www.neatorama.com/2007/03/14/the-real-jackalopes-rabbits-with-shope-papilomavirus-infection">http://www.neatorama.com/2007/03/14/the-real-jackalopes-rabbits-with-shope-papilomavirus-infection</a>. ....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2. Modelo tridimensional del <i>Papilomavirus humano</i>. (Tomado de Physicians' Research Network, 2003. Dirección URL: <a href="http://www.prn.org">http://www.prn.org</a>). ....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 3. Esquema del Genoma Viral del <i>Papilomavirus humano</i> (Tomado de HPV Research at Brown University, 1999. Dirección URL: <a href="http://www.brown.edu/.../hvp/images/graph">http://www.brown.edu/.../hvp/images/graph</a>). ....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 4. Organización del Ciclo de vida durante la infección producida por los Tipos HPV (A) Representación diagramática de la piel que revela el modelo de expresión génica del HPV 16 como la célula infectada migra a través de la superficie epitelial. Clave: Células fase S (rojo), Proteínas E1, E2, E4, E5 (verde), Amplificación de los genomas virales (azul). Proteínas de la cápside viral (amarillo). (Tomado de Doorbar John, 2005. The Papilomavirus life cycle). ....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 5. Diferencias en la organización del ciclo de vida de distintos tipos de HPV. Cuando se compara los HPV del supergrupo A tales como HPV2 o HPV11 (panel izquierdo A), aquellos del supergrupo E tales como HPV1 o HPV63 (panel derecho B), comienzan su ciclo productivo cerca de la capa basal. En las lesiones causadas por estos tipos</b>	

de HPV, no hay compartimentos separados donde E7 puede ser detectado en la ausencia de E4, y la amplificación del genoma viral comienza en la capa de células parabasales. (Tomado de Doorbar John, 2005. The papillomavirus life cycle). .....11

**Figura 6. Condiloma acuminado gigante en vulva de paciente inmunosuprimida (Tomado de Revista Científica Colposcopia, pag.20)......13**

**Figura 7. Cambios en el Ciclo de vida del HPV16 durante el desarrollo del Cáncer Cervico Uterino. Durante la progresión Neoplásica intraepitelial cervical grado 1 (CIN1) a CIN 3, la regulación normal del ciclo de vida del papilomavirus se pierde. Las lesiones CIN1 generalmente asemejan a lesiones productivas causadas por otros HPV del supergrupo A, y expresan proteínas de cobertura en la superficie epitelial. En las lesiones CIN2 y CIN3, el orden de los eventos en el ciclo de vida no puede cambiar, pero la expresión de E7 puede verse incrementada. (Tomado de Doorbar John, 2005. The papillomavirus life cycle). .....14**

**Figura 8. Coilocito (Tomado de Galería de imágenes: Virus del papiloma humano (VPH) <http://www.gefor.4t.com/virus/vph.html>). .....15**

**Figura 9. Lesión acetoblanca de Alto grado originada por HPV observada a través de un colposcopio. (Tomado de Atlas Cáncer Cérvico Uterino). .....17**

**Figura 10. Carcinoma escamocelular *in situ* con extensión glandular en biopsia de cono de cérvix. (Tomado de Caso particular Patóloga Dra. Aurora Romero). .....18**

<b>Figura 11. Proceso de Amplificación mediante PCR en tiempo real (Tomado de Bioteach, Polymerase Chain Reaction, 2005. Dirección URL: <a href="http://www.bioteach.ubc.ca/.../PCR">http://www.bioteach.ubc.ca/.../PCR</a>).</b>	<b>19</b>
<b>Figura 12. Bosquejo del Genoma del ADN del HPV, presentado en forma lineal. Se indica la posición de los genes Early (E), Late (L) y la región sin traducción (UTR) así como las posiciones de los 4 set de cebadores mas usados: MY09/11, GP5+/6+, SPF10 y Roche Amplicor HPV assay con su respectivo tamaño de amplicones. (Tomado de MOLIJN, 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections.)</b>	<b>23</b>
<b>Figura 13. Espátula de Ayre y Cepillo citológico utilizados en la toma de muestras.</b>	<b>30</b>
<b>Figura 14. Kit de extracción de ADN Wizard de Promega™</b>	<b>31</b>
<b>Figura 14. Distribución Total de casos analizados</b>	<b>34</b>
<b>Figura 15. Grupo de comparación para las diferentes técnicas de extracción de ADN</b>	<b>34</b>
<b>Figura 16. Distribución de diferentes tipos de lesiones patológicas encontradas en el primer grupo</b>	<b>35</b>
<b>Figura 17. Distribución de los diferentes tipos de lesiones patológicas encontradas en el segundo grupo</b>	<b>36</b>
<b>Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 2X</b>	<b>37</b>
<b>Figura 19. Resultados por PCR en tiempo real según número de casos</b>	<b>40</b>

<b>Figura 20. Resultados por PCR en tiempo real según el número de muestras.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 21. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Caso 1 .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 22. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real Casos 3-4-5.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 23. Imagen de la amplificación del AN HPV por PCR en tiempo real. Caso 6 .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 24. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 9-10-11-12-13.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 25. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 14-15-16-17-18.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 26. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 15esp. -15cit.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 27. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 19-20-21-22.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 28. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 23-24-25.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 29. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 26-27 .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 30. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 28-29-30-31-32.....</b>	<b>50</b>

<b>Figura 31. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 1-11-17 del segundo grupo .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 32. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 1-11-17 del segundo grupo después de la purificación .....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 33. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 3-5-7-13 del segundo grupo después de la purificación .....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Secuencia de los cebadores GP5+/GP6+. .....	32
Tabla 2. Cálculos del Master Mix previo a la detección por PCR en tiempo real. ....	32
Tabla 3. Programa de amplificación del HPV por PCR tiempo real. ....	32
Tabla 4. Resultados obtenidos en la PCR en tiempo real.....	39

# 1. INTRODUCCIÓN

El *Papilomavirus humano* (HPV por sus siglas en inglés) pertenece al Género *Papilomavirus* de la familia Papoviridae y son virus sin envoltura, de 50 a 55 nm de diámetro, con cápsides icosaédricas formadas por 72 capsómeros. Contiene un genoma de ADN circular bicatenario con 7900 pares de bases, aproximadamente<sup>[13]</sup>.

La organización del genoma de todos los Papilomavirus es similar y consta de una región precoz (E. de “early”) y una región tardía (L: de “late”), y una región reguladora no codificadora hacia 5'. Los tipos de HPV oncógenos pueden immortalizar los queratinocitos humanos, y se ha localizado esta actividad en productos de los genes precoces E6 y E7<sup>[17]</sup>. La proteína E6 media la degradación de la proteína p53 supresora de tumores, y la proteína E7 se une al producto génico del retinoblastoma y proteínas relacionadas. Las proteínas E1 y E2 regulan la replicación del ADN viral y la expresión de los genes. El gen L1 codifica la proteína principal de la cápside que constituye hasta el 80% de la masa del virión. La L2 codifica una proteína secundaria de la cápside<sup>[13]</sup>.

El *Papilomavirus humano* infecta las células epiteliales y depende de la diferenciación epitelial para que su ciclo de vida se complete. La expresión de los productos génicos virales esta íntimamente regulada por la migración de las células basales infectadas hacia la capa superficial del epitelio. La expresión de las proteínas E6 y E7 en el epitelio bajo conduce a las células dentro de la fase S, lo cual crea un ambiente propicio para la replicación del genoma viral y la proliferación celular<sup>[16]</sup>

La infección con genotipos del *Papilomavirus humano* de alto riesgo es una causa bien establecida del desarrollo de cáncer cérvico uterino<sup>[1, 3, 30]</sup>, patología que es la segunda neoplasia maligna más común en mujeres de todo el mundo<sup>[13]</sup> y que según estadísticas del ION SOLCA-Guayaquil (años 1990 al 2000), constituye el 51% de todos los cánceres detectados en la población femenina que acude a dicho hospital<sup>[25]</sup>. Los genotipos virales que poseen dicho factor de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82) para generar cáncer cérvico uterino están implicados en el desarrollo del 95 a 99% de este tipo de neoplasia<sup>[13]</sup>.

Técnicas de detección temprana molecular del HPV como la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (Polimerase Chain Reaction, PCR), PCR en tiempo real (real-time PCR) entre otras, se están convirtiendo en importantes herramientas de los protocolos de prevención y manejo del cáncer cérvico uterino *in situ*<sup>[4]</sup>. Es así por ejemplo que la PCR convencional posee una sensibilidad del 89.3% y especificidad cercana al 94% para la detección del HPV<sup>[7, 25]</sup>, de manera que reduce los falsos negativos de las técnicas convencionales (citología, colposcopia, inmuno-histoquímica, etc)<sup>[7, 32]</sup>.

La PCR es una de las técnicas moleculares más utilizadas debido a que copia millones de veces, *in-vitro*, un segmento de ADN<sup>[21]</sup>. Esta copia exponencial le da a esta prueba un alto nivel de sensibilidad<sup>[30]</sup>. En el caso del HPV existe una región especial del genoma denominada Región L1 donde se tipifica este virus; para lograrlo se utilizan cebadores especiales (GP5+ y GP6+) que delimitan esta región y se amplifica mediante la técnica de PCR en tiempo real, determinando de esta forma la presencia o ausencia del virus<sup>[16]</sup>.

## **HIPÓTESIS**

El Genoma del *Papilomavirus humano* es detectado con mayor especificidad y sensibilidad mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real que con la técnica diagnóstica de Histopatología.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo General**

- Detectar el Genoma del *Papilomavirus humano* mediante la técnica de la PCR en tiempo real en pacientes sospechosas o ya diagnosticadas con infección por HPV.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Estandarizar los procesos a seguir en la técnica de detección del *Papilomavirus humano* mediante el empleo de la PCR en tiempo real.
- Amplificar la región L1 del Genoma del *Papilomavirus humano* mediante la técnica de PCR en tiempo real.
- Verificar la eficiencia de la PCR en tiempo real comparándolos estadísticamente con la técnica diagnóstica de Histopatología.

## 2. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

### 2.1 HISTORIA DEL *Papilomavirus humano*

Durante muchos siglos se sospechaba que el origen de ciertas verrugas de la piel era debido a la presencia de virus. A medida que aumentaron las investigaciones sobre el tema se fueron descubriendo uno a uno los diferentes virus que provocan evidentes afecciones clínicas no solo en humanos sino también en animales, entre ellos los virus de la familia Papoviridae.



**Figura 1.** Conejo con lesiones papilomatosas producidas por el CRPV descrito por R. Shope. (Tomada de: <http://www.neatorama.com/2007/03/14/the-real-jackalopes-rabbits-with-shope-papilomavirus-infection/>)

En 1930 Richard Shope describió el primer *Papilomavirus*, reconociéndolo como el agente etiológico de la papilomatosis cutánea del conejo de cola de algodón, el CRPV (cottontail rabbit papilomavirus) (Figura 1. Conejo con lesiones papilomatosas producidas por el CRPV). Este virus producía papilomas que progresaban a carcinomas en la mayoría de los casos.

La morfología del virus se describió tan pronto se desarrolló el uso de la microscopía electrónica.

En los años 70 coincidiendo con el desarrollo de las técnicas de genética molecular se reconocieron un gran número de *Papilomavirus humanos* (HPV) y *papilomavirus animales*, identificándose en los años 80 aproximadamente 60 tipos diferentes, dependiendo de las características de la lesión con el genotipo infectante<sup>[13]</sup>.

Desde la década de los 90 varios estudios con el soporte de la tecnología molecular han demostrado la relación estrecha entre la presencia del virus y el desarrollo del cáncer cérvico-uterino<sup>[3]</sup>. Entre muchos de los investigadores del tema alrededor del mundo se destacan:

Walboomers, J.M., M.V. Jacobs, M.M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, J. Peto, C.J.L.M. Meijer and N. Muñoz. 1999 utilizaron técnicas moleculares para determinar la presencia del virus en cada uno de los casos analizados y revelar la importancia de la presencia del virus en el desarrollo del cáncer.

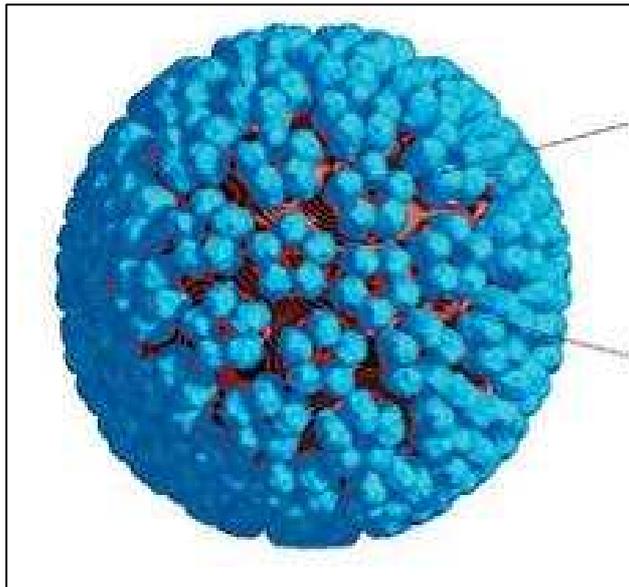
Bosch, F., A Lorincz, N. Muñoz, C.J.L.M. Meijer and K. V. Shah. 2002; por otro lado reestructuran los avances tecnológicos en la detección del virus.

Varios estudios han demostrado la alta sensibilidad que posee la detección molecular del HPV, como por ejemplo Schneider, A., H. Hoyer, B. Lotz, S. Leistritza, R. Kuhne-heid, I. Nindl, B. Muller, J. Haerting and M. Durst, en el año 2000 analizaron 114 pacientes entre los 18 y 50 años utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y cebadores GP5+ y GP6+ obteniendo el 89.4% de sensibilidad y el 93.9 % de especificidad.

Durante el año 2005 Takuma F., N. Masumoto, M. Saito, N. Hirao, S. Niimi, M. Mukai, A. Ono, S. Hayashi, K. Kubushiro, E. Sakai, K. Tsukazaki, and S. Nozawa investigaron especímenes que presentaban Neoplasias cérvico intraepitelial (CIN) y carcinomas invasivos para identificar el estado físico del HPV 16 mediante PCR en tiempo real e Hibridación *in situ*. La presencia de la forma integrada del virus HPV 16 fue detectada por ambas técnicas y el nivel de concordancia fue del 86%. Estas técnicas demuestran ser convenientes y complementarias en la determinación del estado físico del genoma viral<sup>[28]</sup>.

## 2.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

El *Papilomavirus humano* pertenece al género *Papillomavirus* de la familia Papoviridae y son virus sin envoltura, de 50 a 55 nm de diámetro, con cápsides icosaédricas formadas por 72 capsómeros (Figura 2. Modelo tridimensional del *Papilomavirus humano*). Contienen un genoma de ADN circular bicatenario con 7900 pares de bases, aproximadamente<sup>[13]</sup>.

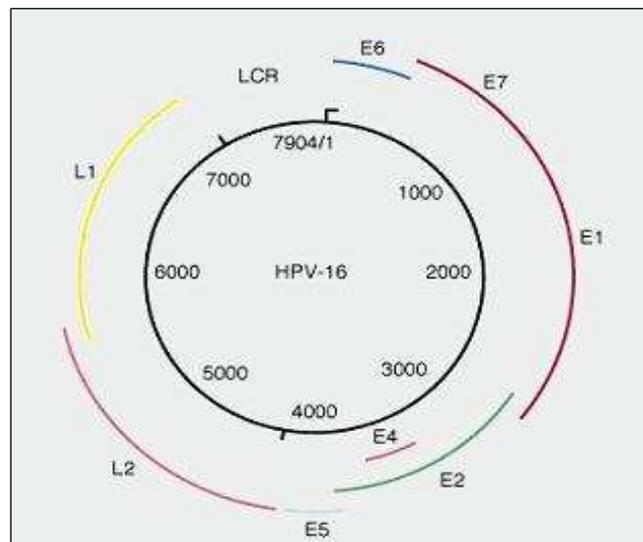


**Figura 2.** Modelo tridimensional del *Papilomavirus humano* (Tomado de Physicians' Research Network, 2003. Dirección URL: <http://www.prn.org>)

La estructura del virus esta formada por el ensamblaje de dos tipos de proteínas: VP1 ó proteínas mayores y VP2 ó proteínas menores que le confieren gran parte de su resistencia y estructura característica.

## 2.3. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL

La organización del genoma de todos los Papilomavirus es similar y consta de una región precoz (E. de “early”) y una región tardía (L. de “late”), y una región reguladora no codificadora hacia 5'. (Figura 3. Esquema del Genoma viral del *Papilomavirus Humano*)



**Figura 3.** Esquema del Genoma Viral del Papilomavirus Humano (Tomado de HPV Research at Brown University, 1999. Dirección URL: <<http://www.brown.edu/hpv/images/graph>>)

Los tipos de HPV oncógenos pueden immortalizar los queratinocitos humanos, y se ha localizado esta actividad en productos de los genes precoces E6 y E7. La proteína E6 media la degradación de la proteína p53 supresora de tumores, y la proteína E7 se une al producto génico del retinoblastoma y proteínas relacionadas.

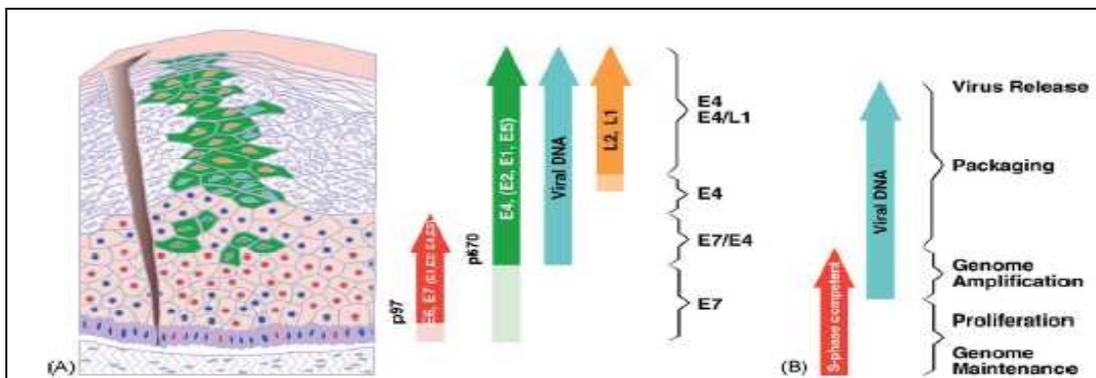
Las proteínas E1 y E2 regulan la replicación del ADN viral y la expresión de los genes. El gen L1 codifica la proteína principal de la cápside que constituye hasta el 80% de la masa del virión y el gen L2 codifica una proteína secundaria de la cápside<sup>[13]</sup>.

## 2.4. CICLO VIRAL

Se aprecia que desde el punto de vista general los diferentes tipos de HPV han evolucionado para ocupar los diferentes nichos biológicos, y en algunas circunstancias, los virus de diferentes grupos evolutivos son capaces de enfocarse en el mismo tipo de epitelio. A pesar de la aparente heterogeneidad entre los diferentes genotipos de HPV, todos ellos comparten ciertas características que les permiten producir viriones infecciosos que continúan la infección [34].

### 2.4.1. Infección e Incubación

La infección inicial requiere del acceso de partículas infecciosas a células en la capa basal, lo cual para muchos tipos de HPV requiere un punto de corte en el epitelio estratificado (Figura 4. Organización del ciclo de vida del *Papilomavirus humano* durante la infección por los tipos de HPV). Estos puntos de corte pueden no ser aparentes, y pueden ocurrir bajo condiciones en que la piel se encuentra expuesta a el agua o es lesionada o sujeta a otro tipo de ambiente donde los microtraumas pueden desarrollarse. De la misma forma ha sido establecido que para que una lesión se mantenga el virus debe infectar las células madres epiteliales [9].



**Figura 4.** Organización del Ciclo de vida durante la infección producida por los tipos HPV.

(A) Representación diagramática de la piel que revela el modelo de expresión génica del HPV 16 como la célula infectada migra a través de la superficie epitelial. Clave: Células fase S (rojo), Proteínas E1, E2, E4, E5 (verde), Amplificación de los genomas virales (azul). Proteínas de la cápside viral (amarillo). (Tomado de Doorbar John, 2005. The papillomavirus life cycle).

Para los tipos HPV de alto riesgo, la formación de lesiones cervicales es facilitada por la infección de las células columnares, las cuales pueden formar subsecuentemente la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación <sup>[9]</sup>.

La internalización del virus es un proceso lento con una vida promedio de horas en lugar de minutos, y ocurre a través de un proceso de endocitosis. <sup>[6]</sup> La incubación del HPV puede ser facilitada por la disrupción de los puentes disulfuro intracapsoméricos en el reducido ambiente de la célula <sup>[15]</sup>, permitiendo que el ADN viral sea transportado al núcleo muy fácilmente.

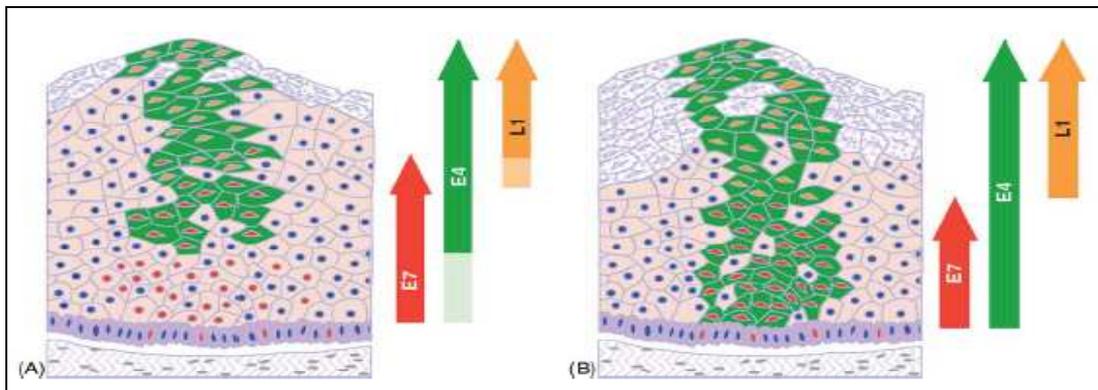
#### **2.4.2. Mantenimiento del Genoma Viral**

Después de la infección e incubación, el virus mantiene su genoma con un número de copias muy bajo en las células basales del epitelio. El patrón génico viral en estas células no se encuentra bien definido, pero generalmente las proteínas virales E1 y E2 se expresan para mantener al virus en forma episomal <sup>[31]</sup> y para facilitar la correcta segregación del genoma durante la división celular.

La infección inicial es continuada con una fase proliferativa en el que se incrementa el número de células basales infectadas con el virus episomal. Este virus se mantiene en la capa basal a razón de 10-200 copias por célula dentro de las cuales las proteínas E6, E7, E1 y E2 del virus se expresan en bajo nivel. Inclusive la expresión de las proteínas E1 y E2 es suficiente para el mantenimiento del genoma viral en forma episomal <sup>[33]</sup>

#### **2.4.3. Fase de Proliferación y Amplificación Genómica**

En un epitelio libre de infección, las células basales terminan su ciclo celular antes de migrar a la capa suprabasal. Durante la infección con HPV las proteínas E7 se expresa en estas células, restringiendo la progresión normal del ciclo celular y la diferenciación terminal es retardada (Figura 5. Diferencias en la organización del ciclo de vida de distintos tipos de HPV).



**Figura 5.** Diferencias en la organización del ciclo de vida de distintos tipos de HPV. Cuando se comparan los HPV del supergrupo A tales como HPV2 o HPV11 (panel izquierdo A), aquellos del supergrupo E tales como HPV1 o HPV63 (panel derecho B), comienzan su ciclo productivo cerca de la capa basal. En las lesiones causadas por estos tipos de HPV, no hay compartimentos separados donde E7 puede ser detectado en la ausencia de E4, y la amplificación del genoma viral comienza en la capa de células parabasales. (Tomado de Doorbar John, 2005. The papillomavirus life cycle).

Para la producción de viriones infecciosos el genoma viral debe amplificarse y empaquetarse dentro de partículas infecciosas, lo cual es controlado por la proteína E7 mientras que la amplificación del genoma viral requiere la expresión de todas las proteínas especialmente E4 y E5.

La mayor proteína de la cápside L1 se expresa durante el ensamble de las partículas infecciosas en las capas superficiales de epitelio. El HPV comprende aproximadamente 800 pares de bases con una cápside que contiene 360 copias de la región L1 organiza en 72 capsómeros.

El HPV puede permanecer latente sin estimular la diferenciación celular y sin presentar signos clínicos de lesión. La formación de la lesión es inducida por inmunosupresión u otros estímulos y el periodo de incubación desde que se produce la infección latente hasta que se produce la lesión es de aproximadamente 3 meses. La señal para que se produzca la fase productiva por HPV desde la infección latente parece ser la diferenciación de las células del huésped. La limitación de la expresión de los genes virales durante el estado de latencia probablemente contribuye a la no detección de células infectadas por parte del sistema inmune del huésped.

#### 2.4.4. Síntesis del virus

El HPV codifica dos proteínas estructurales L1 y L2 en las capas superiores del tejido infectado una vez que la amplificación genómica ha sido completada. <sup>[19]</sup> La proteína mayor de la cápside L1 se expresa después de la proteína L2 permitiendo el ensamblaje de las partículas infecciosas en las capas superficiales del epitelio <sup>[10]</sup> Las nuevas partículas sintetizadas comprenden un genoma de 8000 pares de bases con una cápside que contiene 360 copias aproximadamente de la proteína L1.

Para que el proceso resulte exitoso, el virus eventualmente escapa de la célula epitelial infectada y sobrevive extra-celularmente previo a la re-infección. Los papilomavirus son no líticos, y no son liberados hasta que las células infectadas alcanzan la superficie del epitelio. Los papilomavirus son resistentes a la desecación <sup>[23]</sup> y su supervivencia extracelular puede ser facilitada si son protegidas dentro de una escama cornificada <sup>[5]</sup>. La retención intracelular de los antígenos virales hasta que la célula alcance la parte mas superior de las capas epiteliales puede comprometer la detección inmune del virus.

### 2.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCION POR HPV

El HPV infecta mucosas y epitelio. En cérvix infecta con mayor frecuencia a las células epiteliales de la zona de transformación debido a los cambios estructurales y hormonales a los que esta expuesto esta zona. El virus una vez adquirido presenta una infección viral a menudo pasajera debido a una inmuno-respuesta específica. En su detección el 1% de la población desarrollan verrugas genitales y el 4% lesiones cervicales intraepiteliales <sup>[24]</sup>.

Cuando el HPV entra en las células epiteliales se pueden dar tres tipos de infección:

- **Infección clínica** con signos claros de lesión como el condiloma acuminado.
- **Infección subclínica**, en la que no existen signos visibles de infección y donde la lesión puede visualizarse tras la aplicación de ácido acético al 30%.

- **Infección latente**, en la que el virus se encuentra en estado de latencia sin provocar lesiones. Se puede demostrar la existencia de HPV por métodos de biología molecular. La prevalencia del HPV en el epitelio metaplásico normal en portadoras sanas es del 10% <sup>[32]</sup>.

### 2.5.1. Infecciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas de la infección por HPV dependen de la localización de las lesiones y del tipo de virus.

#### 2.5.1.1. Verrugas y Condilomas



**Figura 6.** Condiloma acuminado gigante en vulva de paciente inmunosuprimida (Tomado de Revista Científica Colposcopia, pag.20)

El virus del HPV, después de sintetizarse se protege formando una escama cornificada haciendo mas fácil su supervivencia extracelular originando de esta manera verrugas o condilomas (Figura 6. Condiloma acuminado gigante en vulva de paciente inmunosuprimida). Las verrugas anogenitales aparecen en la piel y mucosas de los genitales externos y región perianal.

El diagnóstico de las verrugas anogenitales debe diferenciarse de los condilomas planos de la sífilis, el molusco contagioso, la papilomatosis hirsutoide y diversas neoplasias muco cutáneas benignas y malignas <sup>[13]</sup>.

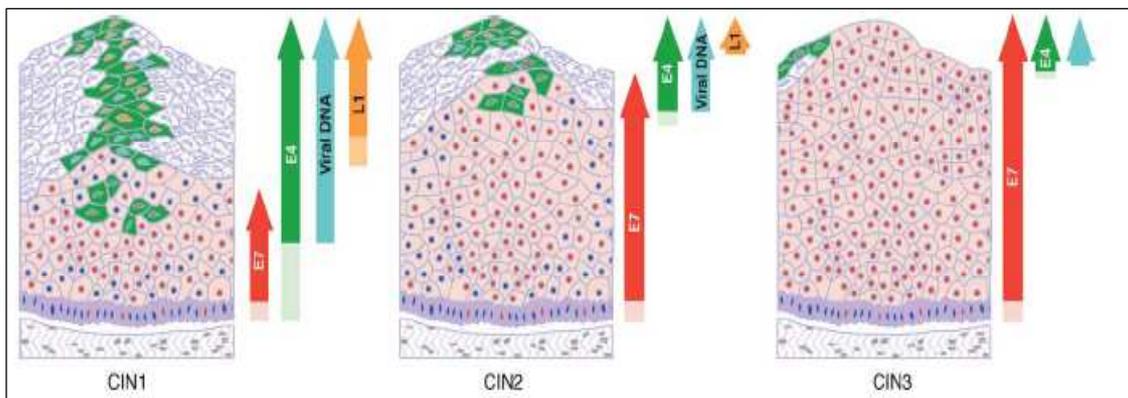
#### 2.5.1.2. PAP II e Infecciones del canal cérvico uterino.

Esta denominación se utiliza para definir los cambios morfológicos de tipo inflamatorio que sufren las células epiteliales de la vagina y el canal cérvico uterino de mujeres y que son fácilmente detectados por un exámen citológico o Papanicolao como vaginitis o cervicitis. Estas infecciones pueden no solo ser causadas por el virus del HPV por eso su diagnóstico debe diferenciar el origen de la infección como pueden ser tricomonas, candidas o bacterias.

En mujeres, que no han sido tratadas adecuadamente de estas infecciones, dichas lesiones pueden progresar a neoplasias intra-epiteliales cervicales grado I (NIC I), y mas tarde a NIC-II y NIC – III y Cáncer cérvico uterino [26].

### 2.5.1.3. Displasias

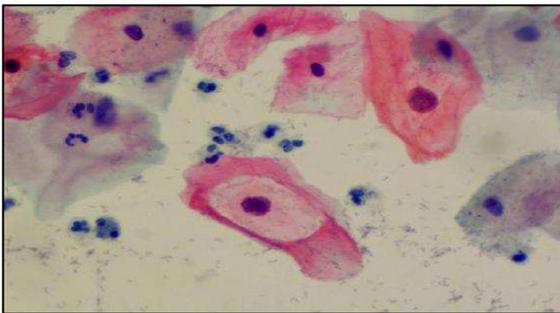
Aproximadamente el 75% de las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales de grado I (CIN I o Displasias leves) están asociadas a la forma episomal del virus HPV. Las displasias del cuello uterino en general son asintomáticas hasta que se desarrollan un carcinoma manifiesto [13]. En las displasias moderadas (grado 2 y 3) la prevalencia de la detección del ADN viral es del 90%, pero los antígenos de la cápside viral y partículas virales no son detectados frecuentemente [32]. (Figura 7. Cambios en el ciclo de vida del HPV16 durante el desarrollo del Cáncer Cérvico Uterino)



**Figura 7.** Cambios en el Ciclo de vida del HPV16 durante el desarrollo del Cáncer Cervico Uterino. Durante la progresión Neoplásica intraepitelial cervical grado 1 (CIN1) a CIN 3, la regulación normal del ciclo de vida del papilomavirus se pierde. Las lesiones CIN1 generalmente asemejan a lesiones productivas causadas por otros HPV del supergrupo A, y expresan proteínas de cobertura en la superficie epitelial. En las lesiones CIN2 y CIN3, el orden de los eventos en el ciclo de vida no puede cambiar, pero la expresión de E7 puede verse incrementada. (Tomado de Doorbar John, 2005. The papilomavirus life cycle).

#### 2.5.1.4. Cambios Celulares

Las células infectadas por el HPV tienden a perder la forma angulada de las células escamosas y se hacen más redondas y ovoides [32]. El citoplasma muestra condensación periférica y produce un efecto de reforzamiento periférico, en el cual las citoproteínas se dirigen hacia el margen de la célula. Este citoplasma generalmente aparece menos estructurado y opaco. Este puede ser acidófilico, brillante rosado-anaranjado, recordando una gran calabaza [32, 30].



**Figura 8.** Coilocito (Tomado de Galería de imágenes: Virus del papiloma humano (VPH) <http://www.gefor.4t.com/virus/vph.html>)

El coilocito es una célula epitelial escamosa, generalmente son células intermedias pero pueden observarse en células epiteliales metaplásicas [16, 23]. La típica célula coilocítica tiene una gran cavidad o halo claro intra-citoplasmático y el núcleo frecuentemente es de localización excéntrica [32]. (Figura 8. Coilocito)

Las células infectadas por VPH tienden a estar juntas formando grupos o nidos profundamente acidófilos en el frotis. [32, 30]. La paraqueratosis es otro hallazgo asociado a infecciones por VPH, revelando queratinización anormal o disqueratosis. [32, 30]. Los cambios nucleares no son específicos, observándose un núcleo con degeneración, hiperchromatismo, picnosis, marginación de la cromatina, binucleación, núcleos alargados, con cromatina finamente granular pálida distribuida uniformemente [32, 30].

## 2.6. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DEL *Papilomavirus humano*

El cáncer cérvico uterino ha logrado establecerse como el cáncer más común en el mundo en desarrollo con una incidencia global de 470.000 casos por año y 233.000 muertes aproximadamente <sup>[7]</sup>. La infección con genotipos del *Papilomavirus humano* de alto riesgo es una causa bien establecida del desarrollo de cáncer cérvico uterino al presentarse en más del 99% de los casos <sup>[1, 3, 30]</sup>.

Entre las diferentes técnicas diagnósticas de la presencia del Papilomavirus Humano se encuentran: Citología, Colposcopia, Inmuno-histoquímica, y Reacción en Cadena de la Polimerasa <sup>[13]</sup>.

### 2.6.1. Citología

El diagnóstico citológico mundialmente usado comprende el Papanicolau, técnica basada en la tinción de células epiteliales del cuello uterino con la expectativa de identificar signos citológicos de la infección por el HPV como la forma redonda u ovoide de las células escamosas, la condensación periférica del citoplasma y la anormalidad nuclear (diskariosis) <sup>[30]</sup>.

Mujeres con citología normal pueden continuar con exámenes ginecológicos en intervalos prolongados de tiempo, por otro lado mujeres que presentan diskariosis deberán ser monitoreadas con métodos citológicos, referidas a colposcopia, y someterse a tratamiento dependiente de la gravedad de las lesiones <sup>[7]</sup>.

Sin embargo hay una falta de consenso acerca de la sensibilidad de este método para la detección de lesiones histológicas precursoras del cáncer, lo cual representa un problema al momento de implementar programas de detección temprana del cáncer <sup>[7]</sup>.

## 2.6.2. Colposcopia y Serología

La mayoría de las verrugas se descubren por simple inspección. El colposcopio (instrumento que presenta un sistema de iluminación y ópticas que permiten ver el cuello del útero con un aumento diez o veinte veces mayor, comúnmente usado en los exámenes ginecológicos) es útil para demostrar las lesiones vaginales y cervicales. Las lesiones persistentes o atípicas deben biopsiarse y estudiarse con los métodos histopatológicos habituales<sup>[13]</sup>.



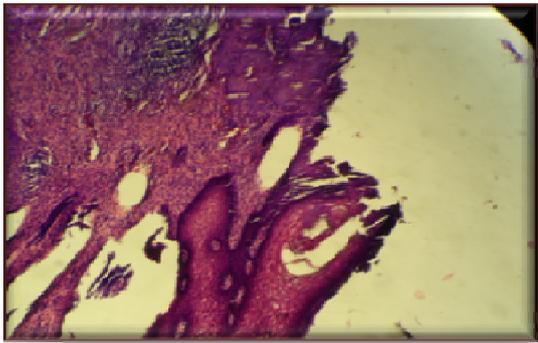
**Figura 9.** Lesión acetoblanca de Alto grado originada por HPV observada a través de un colposcopio. (Tomado de Atlas Cáncer Cérvico Uterino)

Con la aplicación tópica de Acido acético al 5% sobre el cuello uterino se puede diferenciar regiones alteradas por la presencia del virus (coloración acetoblanca) y siendo fácil de localizar una infección subclínica que podría avanzar a mayor grado de complejidad. (Figura 9. Lesión acetoblanca de Alto grado originada por HPV observada a través de un colposcopio). Por otra parte se puede teñir el cuello del útero con una solución de lugol dejándolo de un color marrón; si el cuello del útero no adquiere este color puede ser indicio de que halla una infección por HPV u otras patologías.

Hay que tener en cuenta que el HPV no puede ser cultivado en medios convencionales y los exámenes serológicos tienen limitada sensibilidad debido a que la infección por HPV es seguida por una respuesta inmune en contra de la mayor proteína que se encuentra en la cápside, con anticuerpos detectables por muchos años, por esta razón la serología no puede distinguir una infección presente o pasada. Dejando a la detección molecular del virus como la única vía para detectar una infección de HPV actual<sup>[16]</sup>.

### 2.6.3. Patología

Cuando la colposcopia brinda imágenes sospechosas mediante pequeñas pinzas es posible tomar en forma dirigida muestras de tejidos que luego serán analizadas en un laboratorio. Es importante que ante cualquier sospecha de lesión el ginecólogo realice una biopsia preventiva que serán analizadas por un anatómopatólogo.



**Figura 10.** Carcinoma escamocelular *in situ* con extensión glandular en biopsia de cono de cérvix. (Tomado de Caso particular Patóloga Dra. Aurora Romero)

Las biopsias de cuello uterino generalmente son indoloras y se realizan en consultorio pudiéndose también hacer en un quirófano en forma ambulatoria con mínima anestesia. (Figura 10. Carcinoma escamocelular *in situ* con extensión glandular en biopsia de cono de cérvix.)

El diagnóstico patológico de estas biopsias se puede diferenciar desde displasias leves hasta adenocarcinomas invasores de acuerdo a los cambios morfológicos que presentan las células y la relativa invasión de estas células anómalas en el tejido analizado.

### 2.6.4. Detección Molecular y Reacción en Cadena de la Polimerasa

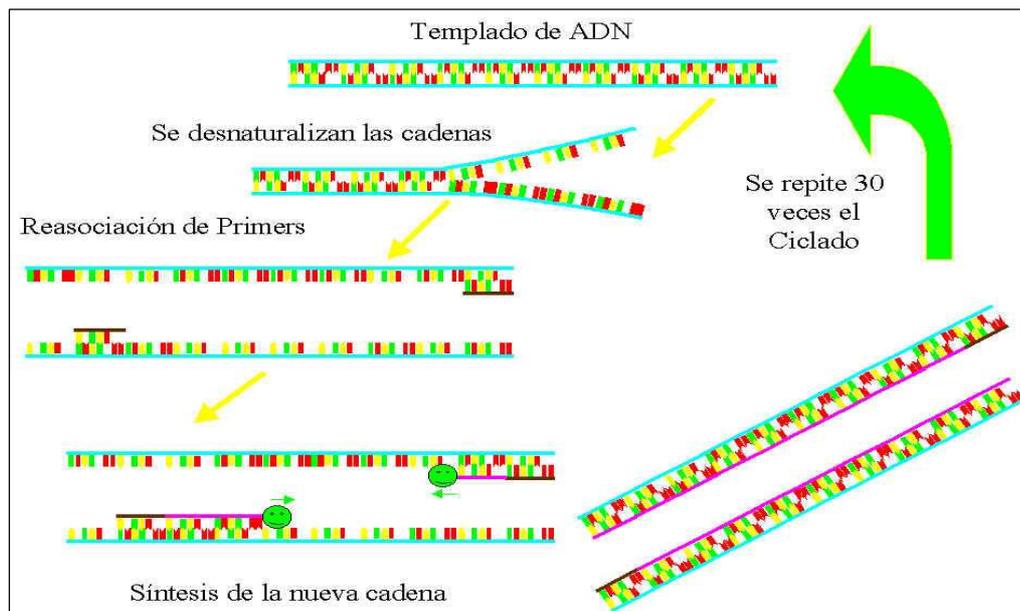
Los métodos más sensibles y específicos de diagnóstico virológico implican el empleo de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o el análisis de captura de híbridos para detectar ácidos nucleicos del HPV<sup>[13]</sup>.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa se desarrolla en tres pasos:

El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria<sup>[21]</sup>.

A continuación en el segundo paso se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN.

El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa <sup>[21]</sup>.



**Figura 11.** Proceso de Amplificación mediante PCR en tiempo real (Tomado de Bioteach, Polymerase Chain Reaction, 2005. Dirección URL: <http://www.bioteach.ubc.ca/.../PCR>)

Pese a que con la PCR convencional se obtiene rápidos resultados; la reciente innovación de la PCR en tiempo real ha simplificado y facilitado la PCR considerablemente. Uno de estos instrumentos es el termociclador (LightCycler), que facilita los cambios rápidos de temperatura usando aire caliente por medio de una cámara termal, y medidas de fluorescencia en tubos capilares especialmente diseñados para que contengan la reacción de la PCR, permitiendo el análisis de los productos durante la amplificación <sup>[22]</sup>.

### **2.6.4.1. PCR en Tiempo Real**

La PCR en tiempo real combina un termociclador, un espectrofotómetro y un monitor. El termociclador efectúa la PCR en muestras que contienen fluorocromo fluorescente (en este caso SYBR green) proporcional a la cantidad de ADN, cantidad que dobla de ciclo en ciclo. Al unirse al ADN de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo, éste reactivo emite una fluorescencia proporcional a la concentración de ADN.

La señal puede medirse una vez por ciclo o bien continuamente, y aparece en la pantalla del ordenador. La fluorescencia de cada tubo se mide en cada ciclo. El monitor indica, después de cada ciclo, las fluorescencias leídas dentro de la longitud de onda elegida para la muestra.

Un rayo láser excitador es transmitido a la muestra por una fibra óptica. La emisión fluorescente inducida es enviada al espectrofotómetro que la analiza a diferentes longitudes de onda. A menudo, la misma fibra transmite el rayo excitador y recibe la fluorescencia.

La temperatura de fusión de un fragmento específico depende de su longitud y su contenido en G+C (guanina + citosina), de forma que pueden obtenerse curvas por cada producto amplificado. Puede también obtenerse la derivada de la curva, lo que facilita mucho el análisis. De esta forma, unos fragmentos pueden distinguirse de otros a partir de sus distintas temperaturas de fusión <sup>[21]</sup>.

#### **2.6.4.1.2. Reactivos esenciales en la PCR en tiempo real**

#### **2.6.4.1.3. Fluoróforo Syber-green**

El fluoróforo Syber-Green es un colorante fluorescente intercalante que reporta cuantitativamente la presencia de ADN, estas propiedades son analizadas mediante PCR en tiempo real <sup>[22]</sup>.

Este fluoróforo también puede detectar ADN amplificado no específico y dímeros de primer. Pero estos productos amplificados no específicos tienen una amplia variedad de tamaños, sin embargo el ADN amplificado del virus HPV tiene un tamaño definido que se traducirá en un rango específico de temperatura. Esta información puede ser utilizada para discriminar de manera eficiente las posibles amplificaciones no específicas y los dímeros de primer existentes en la reacción. Además se ha incorporado un inicio caliente (Hotstart) que incrementa la especificidad y sensibilidad de la PCR minimizando la formación de productos de amplificación no específica al inicio de la reacción <sup>[22]</sup>.

El Syber-green se intercala dentro de la doble cadena, la cantidad de colorante presenta muy poca fluorescencia, sin embargo esta fluorescencia (rango de 530 nm) se incrementa en la fusión de ADN. Durante la PCR el incremento de la fluorescencia del Syber-green es directamente proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena generado. Los pasos básicos en la detección de ADN usando Syber-green durante un análisis de PCR en tiempo real son los siguientes:

Al principio de la amplificación, la mezcla contiene ADN desnaturalizado, los cebadores, y el fluoróforo. Las moléculas del fluoróforo que no se encuentran fusionadas producen una señal mínima de fluorescencia como fondo lo cual es sustraído durante el análisis computarizado. Después del alineamiento de los cebadores pocas moléculas del fluoróforo pueden unirse a la doble cadena. La fusión del ADN resulta en un dramático incremento de moléculas de fluoróforo que emiten luz a través de la excitación mediante el láser.

Durante la elongación, cada vez más moléculas del fluoróforo se unen a un nuevo ADN sintetizado. Si la reacción es monitoreada constantemente se puede apreciar el incremento gradual de la fluorescencia en tiempo real. Después de la desnaturalización del ADN, las moléculas del fluoróforo son liberadas y la señal de fluorescencia baja. La medida de la fluorescencia al final de la elongación de cada ciclo de PCR está diseñado para monitorear el incremento de ADN amplificado.

En el análisis de la curva de fusión la mezcla es calentada lentamente a +95°C, lo que ocasiona la fusión de las dobles cadenas del ADN y el correspondiente descenso en la fluorescencia del Syber-green.

El termociclador continuamente monitorea el descenso de la fluorescencia y presenta picos de fusión. Cada pico representa una temperatura de fusión característica de un producto en particular de ADN (donde la cadena de ADN está el 50% unido y el otro 50% sin unir) los factores más importantes que determinan la temperatura de ADN de doble cadena son el tamaño y el contenido de Guanina-Citosina del fragmento. Si la PCR genera solo un amplicon el análisis de la curva de fusión mostrará solo un pico de fusión <sup>[27]</sup>.

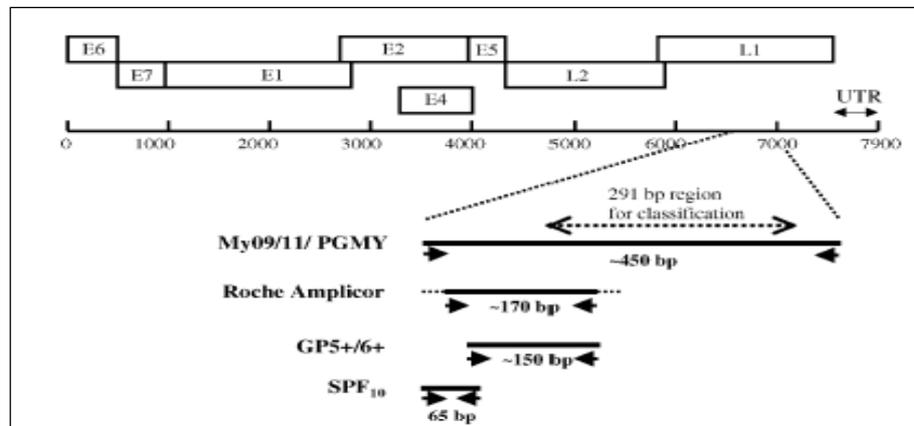
Si se presenta en la reacción dímeros de cebadores o productos no específicos estos se mostrarán como picos de fusión adicionales.

#### **2.6.4.1.4. Taq-Polimerasa**

La Fast start Taq DNA polimerasa es una enzima químicamente modificada que no presenta actividad sobre los 75°C. Esta enzima solo se activa a altas temperaturas, donde los cebadores no se unen inespecíficamente, la enzima se encuentra totalmente activada en un simple periodo de pre-incubación de 10 minutos a 95°C antes que los ciclos de amplificación comiencen.

### 2.6.4.1.5. Cebadores

En la detección del HPV por PCR es de suma importancia el uso de cebadores adecuados al resultado que se requiere, por esta razón se han creado diversos tipos de cebadores donde el fragmento de 291 pares de bases usado para la identificación del genotipo del HPV es conocida en la región L1. Los cebadores más usados son detallados a continuación. (Figura 12. Bosquejo del Genoma del ADN del HPV, presentado en forma lineal).



**Figura 12.** Bosquejo del Genoma del ADN del HPV, presentado en forma lineal. Se indica la posición de los genes Early (E), Late (L) y la región sin traducción (UTR) así como las posiciones de los 4 set de cebadores más usados: MY09/11, GP5+/6+, SPF10 y Roche Amplicor HPV assay con su respectivo tamaño de amplicones. (Tomado de MOLIJN, 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections.)

- **MY09 y MY11.-** Este tipo de cebadores comprende una compleja mezcla de diferentes oligonucleótidos que pueden producir un amplicon de 450 pb, la desventaja de su diseño es que la síntesis de los oligonucleótidos degenerados no es altamente reproducible y resulta con altas variaciones de lote a lote.
- **PGMY y SPF10.-** Estos cebadores no contienen degeneraciones al azar, pero contienen inosina, que se une a cualquier nucleótido. Si se utiliza una definida mezcla de cebadores no degenerativos existe la ventaja de que los oligonucleótidos puedan ser sintetizados con alta reproducibilidad. <sup>[12]</sup>. En forma general la eficiencia de una PCR decrece a medida que se incrementa el tamaño del amplicon final.

- **GP5+/GP6+.-** Este tipo de cebadores se los conoce como cebadores consenso donde incluyen un cebador “forward” y otro “reverse” destinados a la región conservada L1. Para evitar las no concordancias con otro tipo de genotipos de HPV, la PCR debe ser realizada a una temperatura baja de anillamiento, como resultado se obtiene un amplicon de 150 pb <sup>[16, 29]</sup>.

#### **2.6.4.1.6. Beta 2 Microglobulina**

La determinación de las concentraciones de beta-2-microglobulina (beta-2-M) se utiliza de forma rutinaria en la clínica práctica. La beta-2-M es un polipéptido de bajo peso molecular (11.800 D) que fue identificado por primera vez en la orina de pacientes con enfermedad tubular renal. Parte de la beta 2-M de la superficie celular forma la cadena ligera de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) de clase I, presente en la superficie de todas las células nucleadas.

Concentraciones altas de beta-2-M conllevan un mayor deterioro inmunológico del paciente y una mayor propensión al desarrollo de carcinoma de cérvix. Se recomienda, una vez llegada esta situación, la realización de controles ginecológicos periódicos <sup>[11]</sup>.

## 2.7. AVANCES EN INVESTIGACIÓN

Desde la década de los 90 varios estudios con el soporte de la tecnología molecular han demostrado la relación estrecha entre la presencia del virus y el desarrollo del cáncer cérvico-uterino<sup>[3]</sup>. Entre muchos de los investigadores del tema alrededor del mundo se destacan:

Walboomers et al. (1999) utilizó técnicas moleculares para determinar la presencia del virus en cada uno de los casos analizados y revelar la importancia de la presencia del virus en el desarrollo del cáncer.

Bosch et al. (2002) por otro lado reestructura los avances tecnológicos en la detección del virus. Varios estudios han demostrado la alta sensibilidad que posee la detección molecular del HPV, como por ejemplo Schneider et al. en el año 2000 analizó 114 pacientes entre los 18 y 50 años utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y cebadores GP5+ y GP6+ obteniendo el 89.4% de sensibilidad y el 93.9 % de especificidad<sup>[24]</sup>.

Durante el año 2005 Takuma Fujii et al. investigó especímenes que presentaban Neoplasias cérvico intraepitelial (CIN) y carcinomas invasivos para identificar el estado físico del HPV 16 mediante PCR en tiempo real e Hibridación *in situ*. La presencia de la forma integrada del virus HPV 16 fue detectada por ambas técnicas y el nivel de concordancia fue del 86%.

Estas técnicas demuestran ser convenientes y complementarias en la determinación del estado físico del genoma viral<sup>[28]</sup>.

A pesar de existir gran variedad de investigaciones respecto al tema con diversas técnicas moleculares de detección del HPV alrededor del mundo, en Ecuador recientemente se ha intentado enfocar la problemática del cáncer cérvico uterino en la implementación de nuevas técnicas diagnósticas más sensibles y acordes con la realidad económica de nuestro país.

En el año 2003 SOLCA-Cuenca monitoreó una población de 200 pacientes y detectaron mediante PCR normal la presencia del HPV.

En Guayaquil entre los meses de agosto y noviembre del 2005 el Instituto Oncológico Nacional -SOLCA Guayaquil detectó la presencia del HPV en 20 pacientes implementado técnicas moleculares como PCR y la tipificación del virus mediante DOT-BLOT reverso, demostrando la ausencia del HPV tipo 16 y 18 que aparentemente no son comunes para la población ecuatoriana siendo los genotipos de más alto grado de desarrollo de cáncer cérvico uterino a nivel mundial.

Recientemente publicado en la revista científica Colposcopia, el laboratorio de Biología Molecular del ION-SOLCA Guayaquil presenta un estudio de 80 pacientes con diagnóstico previo de cervicitis crónica referidas de diferentes servicios de ginecología de Guayaquil, población en la cual se detecta que el 100% presenta el virus del HPV y que el 93.3% de los casos presentaron al menos un genotipo de HPV de alto riesgo, entre ellos los de mayor prevalencia se encontraron genotipos de bajo riesgo HPV6 y HPV11 con prevalencia del 23% y 21% respectivamente mientras que el genotipo de alto riesgo fue el HPV52 con un 19%, además que el 80% presenta infección con múltiples genotipos.

Con el constante desarrollo de las tecnologías de detección temprana, hace unos años se elaboró la vacuna contra el HPV, la cual es actualmente comercializada y difundida, esta vacuna implementa partículas similares al virus HPV que poseen el mismo recubrimiento exterior de proteína L1, pero no tienen material genético en el interior, esta estructura le permite a la vacuna inducir una respuesta inmune protectora en el organismo, de tal manera que el cuerpo de la persona vacunada elabora y acumula anticuerpos que pueden reconocer y atacar a la proteína L1 en la superficie de los virus HPV <sup>[18]</sup>.

La vacunación protege a una persona de la infección futura por los tipos de alto riesgo de HPV que pueden conducir al cáncer. No es una vacuna contra el cáncer en sí mismo. Las vacunas recientemente elaboradas son re-combinantes y mientras la vacuna denominada "Tetravalente" protege de los genotipos 6, 11, 16 y 18, la vacuna "Bivalente" tan solo protege de los genotipos 16 y 18. Una persona recibe una serie de tres vacunas intramusculares durante un periodo de 6 meses.

Después de la vacunación, las células inmunes de la persona están preparadas para combatir la infección futura por los virus HPV de alto riesgo. Si una exposición ocurre, los anticuerpos de la persona vacunada en contra de la proteína L1 recubren al virus y evitan que libere su material genético.

Después de la vacunación, una mujer aún debe realizarse las pruebas de Papanicolaou de rutina u otra prueba aprobada de detección del cáncer cervical. Aunque la vacuna contra el HPV previene la infección por los tipos dominantes de HPV, no previene la infección por la mayoría de los otros tipos que también pueden causar cáncer cervical.

Algunos laboratorios están llevando a cabo estudios para determinar si una vacuna de refuerzo, además de las tres inyecciones intramusculares iniciales, será necesaria para la protección a largo plazo. Por el momento se conoce que la nueva vacuna contra el HPV sigue siendo efectiva hasta por lo menos durante 4 años, pero es necesaria una investigación adicional para determinar qué sucede después de ese tiempo.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Área de Estudio**

El estudio se realizó en el área de Colposcopia del Instituto Oncológico Nacional -SOLCA Guayaquil en pacientes con diagnóstico previo o sospecha de infección por *Papilomavirus humano*.

### **3.2. Materiales**

#### **3.2.1. Requisitos de infraestructura**

El Departamento de Colposcopia del ION-SOLCA Guayaquil consta con un consultorio propio y totalmente equipado para analizar clínicamente a las pacientes y se pudo tomar las muestras citológicas *in vivo* necesarias para el trabajo de investigación.

El laboratorio de Biología Molecular del ION-SOLCA Guayaquil consta de dos áreas de trabajo:

Área Pre- PCR

Área Post- PCR

En el Área de Pre- PCR se analizaron las muestras tomadas en el consultorio de Colposcopia, luego de extraer el ADN en esta área se preparó el master-Mix para la PCR en tiempo real.

En el Área de Post-PCR se analizaron las muestras mediante la técnica de la PCR en tiempo real y se interpretaron los resultados.

Las dos áreas delimitadas físicamente corresponden a las normas básicas de bio-seguridad internacionales propuestas para la prevención de contaminación cruzada.

### **3.2.2. Requisitos de equipos**

#### **Para toma de Muestras Citológicas:**

- Espéculos
- Tubos de ensayos
- Espátulas de Ayre
- Cepillos citológicos
- Solución Preservante de Células

#### **Para laboratorio de Biología Molecular:**

##### **Equipos:**

- Cámara de Flujo laminar
- Centrífuga
- Termociclador (Light-Cycler)
- Refrigeradora
- Congelador
- Termobloque
- Vórtex
- Micropipetas
- Bloque frío

##### **Material fungible:**

- Vidriería
- Gradillas
- Puntas para Micro pipetas de diferentes volúmenes
- Tubos Eppendorf
- Capilares para PCR en tiempo real
- Pinzas
- Guantes
- Varios (papelería en general)

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Levantamiento de información

La información obtenida en cada uno de los casos sospechosos de infección por HPV fueron registrados en una Base de Datos Microsoft Access en la computadora del laboratorio de Biología Molecular del ION – SOLCA la cual posee un software compatible con la aplicación Microsoft 2000 SR-1 Premium, los datos a considerar para la creación de esta base de datos fueron los siguientes: (Anexo 1. Imagen de la base datos Access utilizada en el levantamiento de información).

- ◆ Nombre de la paciente
- ◆ Edad de la paciente
- ◆ Número de historia clínica
- ◆ Fecha de la toma de muestra
- ◆ Número de muestras obtenidas de la paciente
- ◆ Estado de la muestra
- ◆ Tipo de celularidad (normal o anormal)
- ◆ Presencia de infecciones clínicas (condilomas, verrugas, etc)
- ◆ Resultados por Colposcopia e Histopatología
- ◆ Resultados PCR en tiempo real

#### 3.3.2. Métodos empleados



**Figura 13.**  
Espátula de Ayre  
y Cepillo citológico  
utilizados en la  
toma de muestras

Se coordinó con el Departamento de Colposcopia del ION-SOLCA Guayaquil la toma de muestras citológicas a pacientes sospechosas o ya diagnosticadas con infección por HPV.

Las muestras tomadas con espátula de Ayre mediante un raspado exo-cervical y cepillado endo-cervical con cepillo citológico se preservaron inmediatamente en tubos de ensayo con 1 ml de solución salina hasta su extracción de ADN. (Figura 13. Espátula de Ayre y Cepillo citológico utilizados en la toma de muestras).

Se dividió el proyecto en dos grupos con la finalidad de comparar dos técnicas diferentes de extracción de ADN viral. En el primer grupo conformado por 32 pacientes de las cuales se extrajo el ADN viral de HPV según el protocolo del Kit de extracción de ADN Wizard de Promega <sup>[20]</sup> (Figura 14. Kit de extracción de ADN Wizard de Promega™) (Anexo 2. Protocolo de Extracción de ADN - Kit de extracción ADN WIZARD-PROMEGA)



**Figura 14.** Kit de extracción de ADN Wizard de Promega™

Mientras el segundo grupo de 20 pacientes se extrajo el ADN viral bajo el protocolo de extracción Invitrogen-Innogenetics <sup>[14]</sup>. (Anexo 3. Protocolo de Extracción de ADN - Invitrogen INNOGENETICS)

El ADN extraído por ambas técnicas fue cuantificado en el Cuantificador de ADN Genequant-Pro, siendo de mucha utilidad los parámetros observados para verificar la pureza y concentración del ADN a utilizar en la PCR en tiempo real.

Al comprobar la falta de pureza obtenida con el protocolo de extracción Invitrogen fue necesario implementar una técnica de purificación orgánica del producto obtenido en este caso con Fenol-cloroformo.

Se utilizaron en este proyecto los cebadores GP5+ y GP6+ para amplificar la región L1 del genoma viral del HPV mediante PCR en tiempo real (Tabla 1. Secuencia de los cebadores GP5+/GP6+), y se empleo el fluoróforo LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I para detectar las señales del ADN amplificado.

**Tabla 1.** Secuencia de los cebadores GP5+/GP6+

<b>Secuencia de los cebadores</b>	GP5+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
	GP6+	5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'

El volumen de los reactivos que fueron utilizados en el Master Mix previo a la PCR en tiempo real se detalla en la tabla 2: Cálculos del Master Mix previo a la detección por PCR en tiempo real; y el programa utilizado en el LightCycler para la amplificación de la región L1 del genoma viral esta descrito en la Tabla 3. Programa de amplificación del VPH por PCR tiempo real. Cada análisis efectuado incluyó un control positivo (ADN purificado de los genotipos HPV 16 y HPV 6), y un control negativo (Agua ultrapura).

**Tabla 2.** Cálculos del Master Mix previo a la detección por PCR en tiempo real.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen inicial</b>
H <sub>2</sub> O	10 ul
Cebador GP5+	0.5 ul
Cebador GP6+	0.5 ul
SYBR green	4 ul
ADN	5 ul
Volumen final	20 ul

**Tabla 3.** Programa de amplificación del HPV por PCR tiempo real

<b>Programa de amplificación PCR en tiempo real</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Velocidad de cambios de temperatura</b>	<b>Detección</b>	<b>No. De ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	15 minutos	20°C/seg	NO	1
<b>Amplificación</b>	94°C	10 segundos	20°C/seg	NO	35
	50°C	10 segundos	20°C/seg	NO	
	72°C	15 segundos	20°C/seg	SI /simple	
<b>Fusión</b>	95°C	10 segundos	20°C/seg	NO	1
	50°C	5 segundos	20°C/seg	NO	
	97°C	0 segundos	0,1°C/seg	SI / constante	
<b>Enfriamiento</b>	40°C	30 segundos	20°C/seg	NO	1

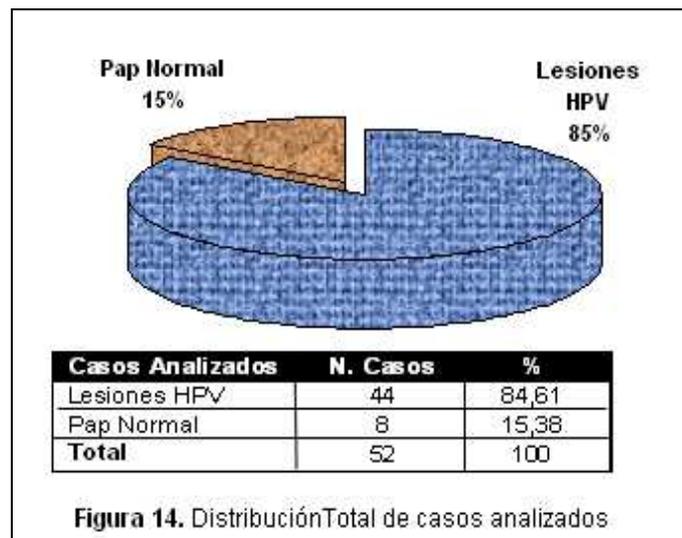
Los datos obtenidos mediante la PCR en tiempo real determinaron la presencia o ausencia del virus en cada una de las muestras, entre los cuales se destacan la temperatura de fusión (melting point), curva de fusión (melting curve), estándar de desviación (SD) y nivel de fluorescencia.

En esta investigación la medición de la precisión del procedimiento diagnóstico se realizó determinando la sensibilidad y especificidad de la prueba mediante el uso del análisis estadístico denominado Ji cuadrado  $X^2$  (tablas de contingencia 2 x 2) <sup>[8]</sup>, y utilizando como estándar de oro los diagnósticos definitivos de las pruebas realizadas en el área de Histopatología del ION – SOLCA Guayaquil.

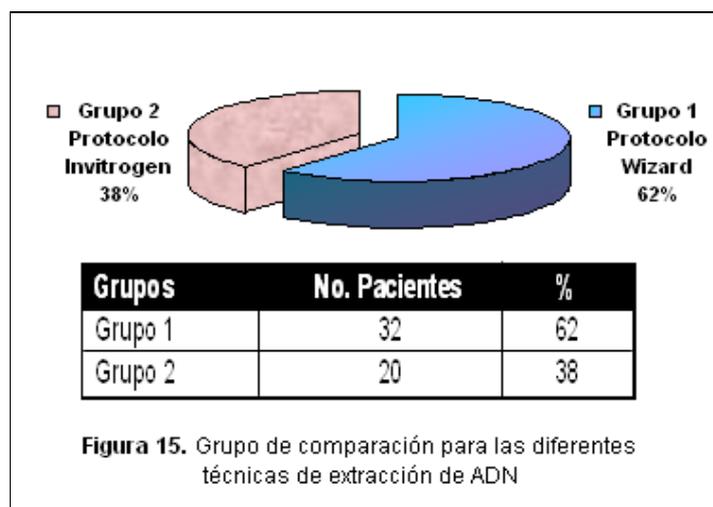
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estandarización de la Técnica

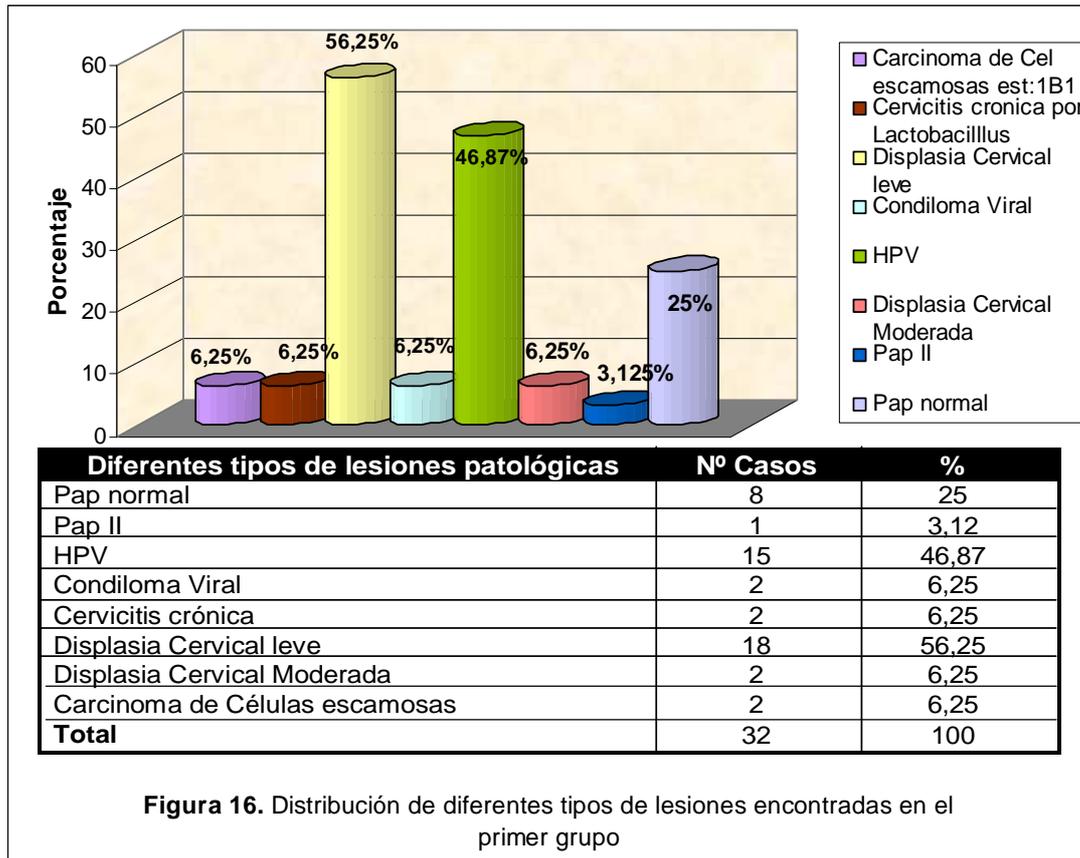
De acuerdo a los datos patológicos analizados, de las 52 pacientes que entraron en el estudio, 44 presentaron lesiones debido a una previa infección por el HPV. (Figura 14. Distribución Total de casos analizados).



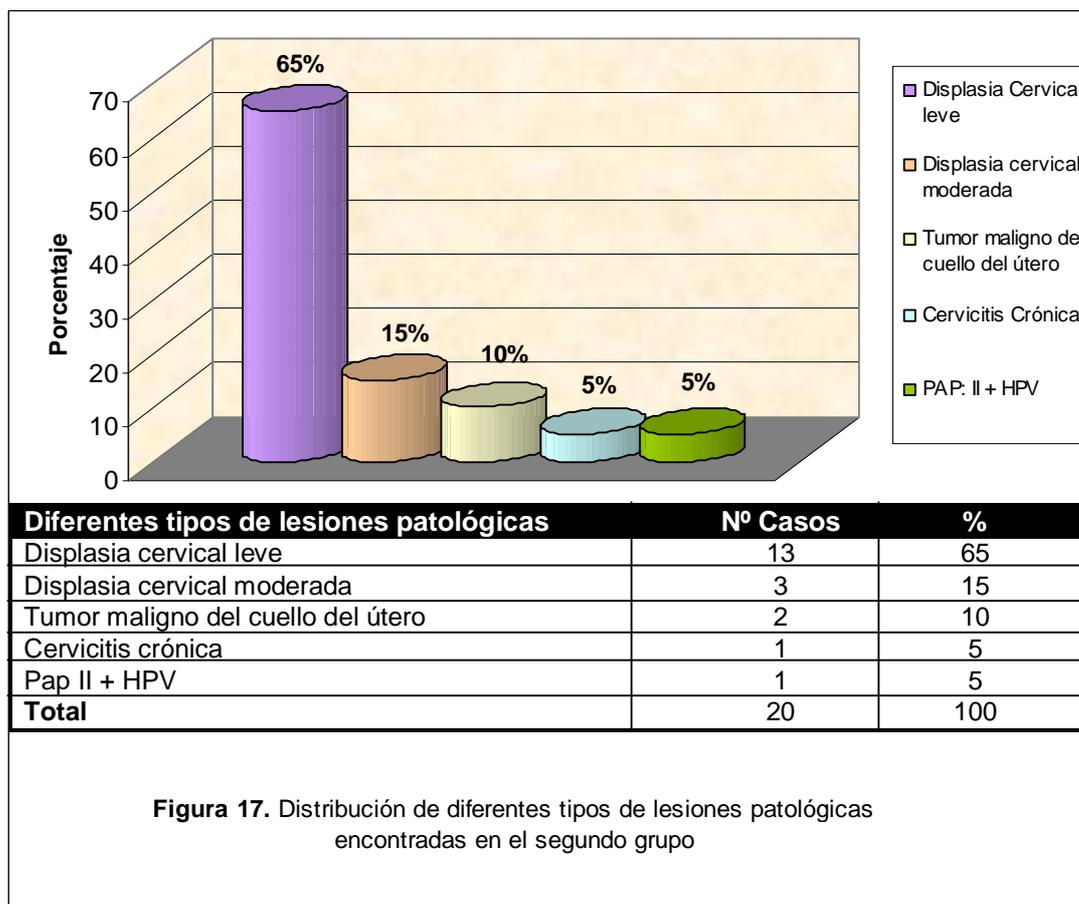
Dentro de este universo de 52 pacientes se dividió el 62% (32 pacientes) para ser analizado dentro del primer grupo y el 38% (20 pacientes) dentro del segundo grupo de análisis, con la finalidad de comparar los dos métodos de extracción de ADN. (Figura 15. Grupo de comparación para las diferentes técnicas de extracción de ADN).



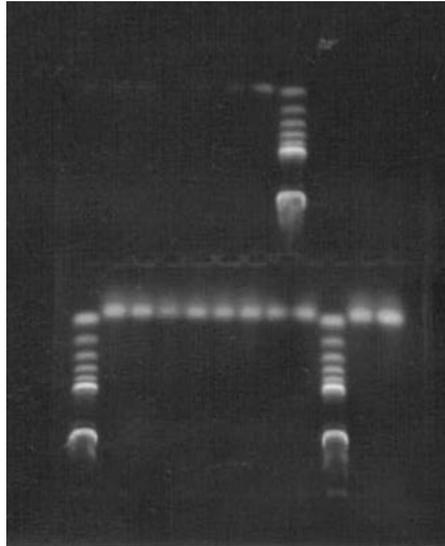
La distribución de las diferentes lesiones encontradas para el primer grupo se puede apreciar en la Figura 16. Distribución de diferentes tipos de lesiones patológicas encontradas en el primer grupo.



En el segundo grupo la distribución de las diferentes patologías se analizan en la Figura 17. Distribución de los diferentes tipos de lesiones patológicas encontradas en el segundo grupo.



En el primer grupo se logró extraer ADN de 59 muestras pertenecientes a 30 casos diferentes mediante el protocolo Wizard de Promega<sup>[20]</sup>. Un raspado y cepillado no adecuado de la zona lesionada provocó que 4 muestras de 2 pacientes no se pudieran obtener ADN. La ausencia de ADN en la muestra fue verificada posteriormente a la extracción con una electroforesis en gel de agarosa 2X, bajo la comparación de controles positivos y negativos en el mismo gel, acompañado de su posterior cuantificación. (Figura18. Electroforesis en gel de agarosa 2X).



**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa

Dentro del segundo grupo se extrajo ADN de 40 muestras pertenecientes a 20 casos diferentes mediante el protocolo Invitrogen.

Después de haber obtenido ADN en todas las muestras siguiendo los dos protocolos de extracción se cuantificó las muestras en el Cuantificador de ADN Gene Quant-PRO, obteniendo los siguientes resultados:

En el Primer grupo todas las muestras se aproximaron a los rangos óptimos de pureza y concentración recomendados para el análisis por PCR del HPV ( $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$  y un rendimiento mínimo de 50-100 ng /  $\mu$ l) [2], obteniendo un promedio general de Concentración: 21.99 ng /ul y Pureza: 1.96. (Anexo 4. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de muestras).

Las muestras del primer grupo obtenidas con Espátula de Ayre y cotonete de la region exocervical presentaron mayor concentración de ADN (24.59 ng/ul) en comparación a las muestras obtenidas con el Citobrush.(19.95 ng/ul). Mientras tanto las muestras tomadas con Citobrush presentaron un mayor grado de pureza (2.00) que las tomadas con espátula de Ayre (1.93) (Anexo 5. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de Muestras obtenidas en la región Exocervical con Cotonete y Espátula de Ayre) Anexo 6. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de muestras obtenidas en la región Endocervical con Citobrush.

En el segundo grupo los valores no se ajustaron a los requeridos (Concentración: 30.62 ug/ml y Pureza: 0.575). Luego de someter estas muestras a un proceso de purificación con Fenol-Cloroformo (Anexo 7. Protocolo de purificación orgánica de ADN con Fenol-Cloroformo) las muestras obtenidas muestran valores aceptables para continuar el proceso: Concentración: 27.32 ug/ml y Pureza: 1.6315. (Anexo 8. Cuantificación del ADN HPV obtenido del segundo grupo de muestras).

## 4.2. Amplificación del Genoma viral por PCR en tiempo real

En el primer grupo todas las muestras dieron un resultado compatible para la amplificación de la región L1 del genoma viral del HPV por PCR en tiempo real.

La temperatura de fusión promedio en las muestras analizadas fue de 79,4302 °C siendo su área pico de 2.4161 °C y desviación estándar ( $\sigma^2$ ) de 1.6786.

Para los controles positivos la temperatura de fusión promedio resultó en 81.08°C con áreas pico de 3.620 °C y desviación estándar ( $\sigma^2$ ) 2.5146. En cambio los controles negativos presentaron una temperatura de fusión promedio de 74.03 °C con áreas pico de 2.7435°C, con desviación estándar ( $\sigma^2$ ) de 2.5146.

Se estableció en el análisis de resultados como umbral de positividad a una temperatura de fusión mayor a 75 °C.

Los resultados obtenidos de las diferentes pruebas de PCR en tiempo real se resumen a continuación. (Tabla 4. Resultados obtenidos en la PCR en tiempo real)

**Tabla 4.** Resultados obtenidos en la PCR en tiempo real

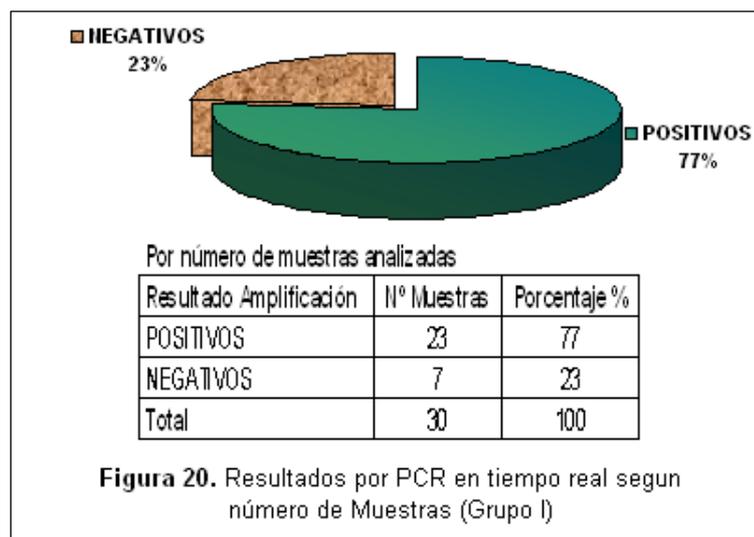
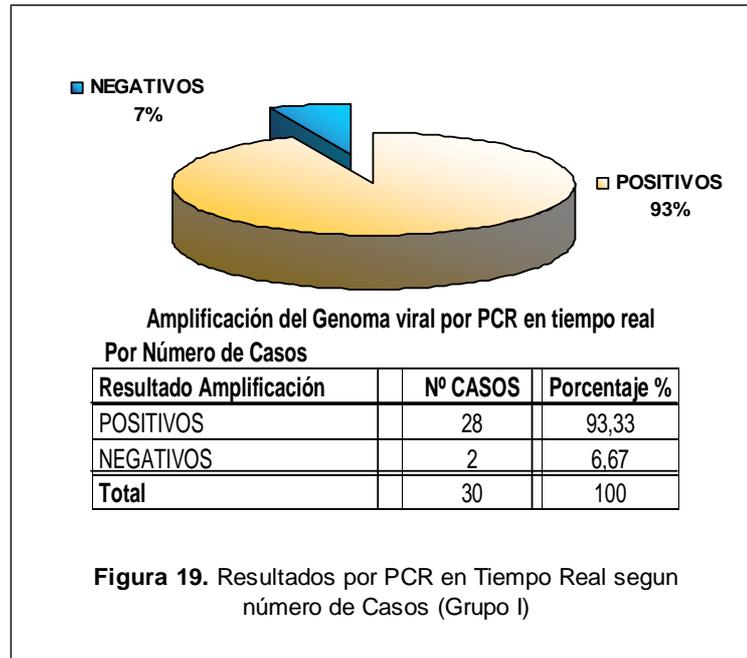
<b>Casos</b>	<b>Identificación de Muestras</b>	<b>Temperatura de fusión ° C</b>	<b>Area Pico °C</b>	<b>Desviación Estándar <math>\sigma^2</math></b>
Control B2 Microglobulina	1cot B2 microglobulina	79,71	1,046	1,241
	1cit B2 microglobulina	90,76	1,881	2,252
Caso N° 1	1cot	75,22	0,852	0,928
	1cit	90,50	2,001	2,374
Caso N° 3	3cit	85,14	4,98	2,294
Caso N° 4	4cit	79,38	2,706	0,843
Caso N° 5	5cit	75,71	3,718	1,476
Caso N° 6	6cit	79,47	2,477	0,592
Caso N° 9	9cit	79,74	1,014	1,937
Caso N° 10	10cit	84,29	1,128	1,068
Caso N° 11	11cit	83,58	3,355	5,056
Caso N° 12	12cit	84,21	0,923	1,422
Caso N° 13	13esp	91,15	2,115	0,659
	13cit	83,39	2,67	4,244
Caso N° 14	14esp	90,4	2,244	0,584
	14cit	69,43	0,827	1,873
Caso N° 15	15esp	77,86	1,821	0,856
	15cit	82,15	1,034	1,764
Caso N° 16	16cit	80	1,5	0,806
Caso N° 17	17cit	80,24	0,529	0,878
Caso N° 18	18cit	70,91	0,896	1,789
	18esp	90,32	1,987	0,754
Caso N° 19	19esp	79,49	2,189	0,769
	19cit	73,08	1,132	1,842
Caso N° 20	20esp	76,69	2,196	0,753
	20cit	77,48	3,738	0,682
Caso N° 21	21esp	89,48	2,251	1,17
	21cit	78,51	3,094	0,94
Caso N° 22	22esp	77,21	2,115	0,96
	22cit	78,68	4,083	0,851
Caso N° 23	23esp	77,28	4,331	4,576
	23cit	78,58	2,066	1,298
Caso N° 24	24cit	25,96	1,238	2,367
Caso N° 25	25cit	81,77	1,456	0,839
Caso N° 26	26cit	79,9	4,444	0,729
Caso N° 28	28cit	79,5	5,23	3,072
Caso N° 29	29cit	79,37	5,077	3,236
Caso N° 30	30cit	78,91	4,859	0,668
Caso N° 31	31cit	78,05	1,603	0,745
Caso N° 32	32cit	83,84	3,838	5,957

\*Cot: muestra tomada con cotonete

\*Esp: muestra tomada con espátula de Ayre

\*Cit: muestra tomada con cepillo citológico "citobrush"

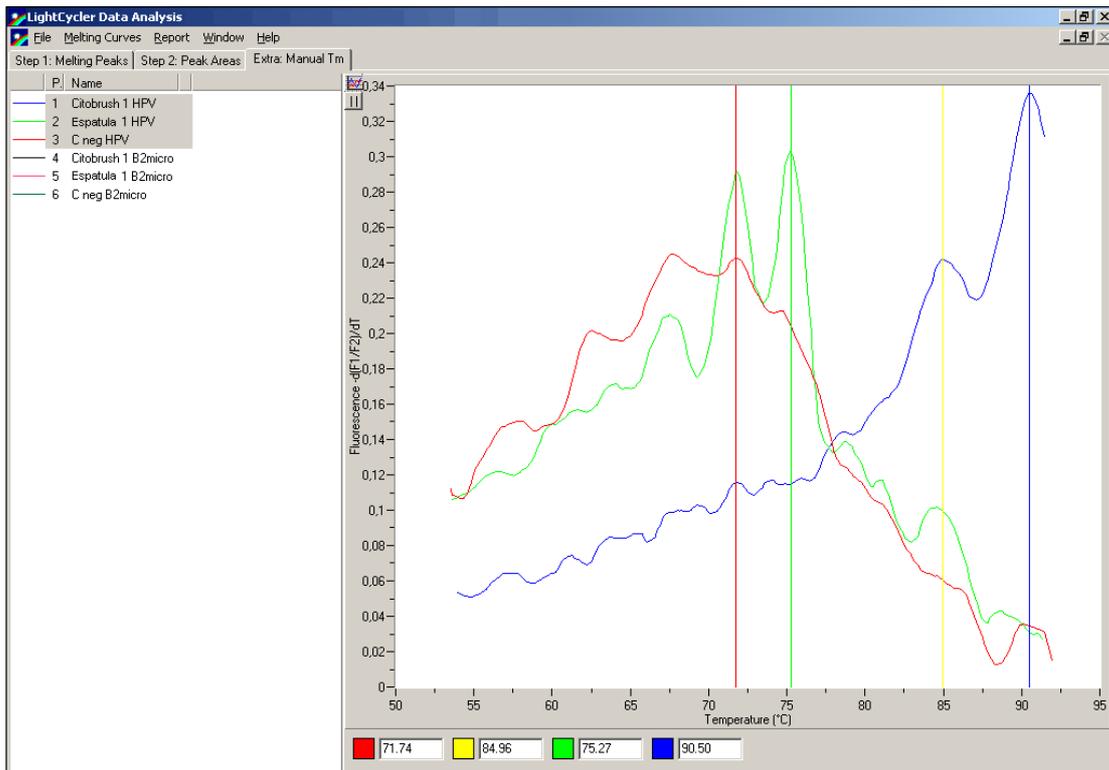
De los 30 casos analizados 28 casos fueron positivos para HPV y 2 casos negativos, 25 fueron positivos para los dos tipos de muestras tomadas con espátula y cepillo citológico, mientras 3 casos fueron positivos para la muestra tomada con espátula de Ayre. (Figura 19. Resultados por PCR en tiempo real según número de casos) (Figura 20. Resultados por PCR en tiempo real según el número de muestras).



En el segundo grupo las muestras no se pudieron valorar debido a la inhibición de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

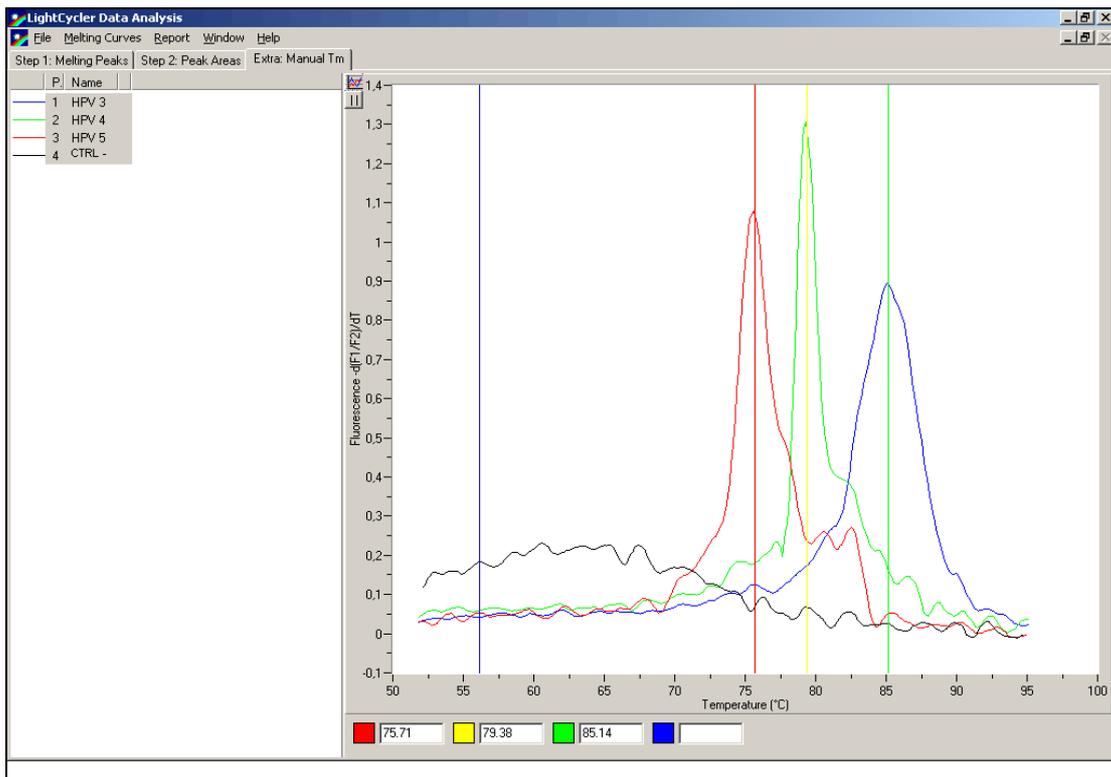
A continuación se detallan algunas imágenes obtenidas en las diferentes amplificaciones del ADN HPV por PCR en tiempo real de los diferentes casos. En su gran mayoría se encuentran casos obtenidos por citobrush y en algunos se interpretaron conjunto la muestra obtenida con cotonete o espátula de Ayre.

En la amplificación del primer caso la muestra obtenida con citobrush presentó 2 puntos de fusión a 90.50°C de mayor fluorescencia y a 84.96°C ambos puntos de fusión mayores a la muestra obtenida con cotonete que fue de 75.27°C pero en este caso el segundo pico de menor fluorescencia coincidió con el control negativo a 71.74°C. (Figura 21. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Caso 1).



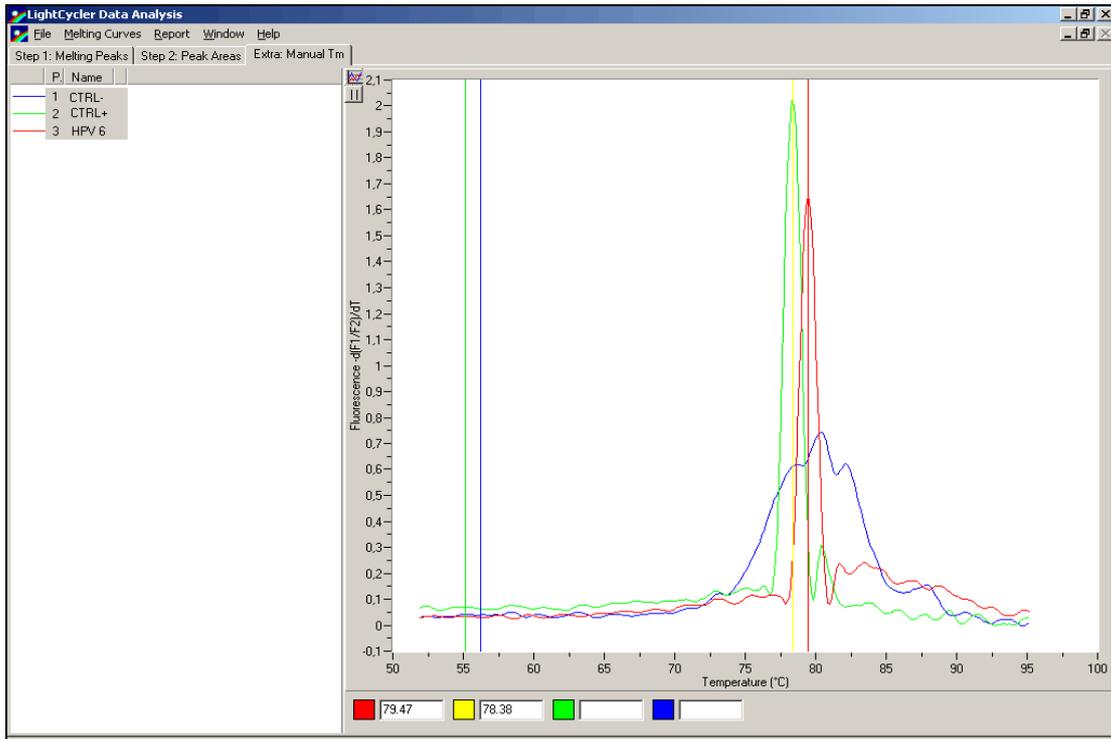
**Figura 21.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Caso 1.

En la amplificación del ADN de los casos 3, 4, y 5 se pudo obtener picos de fusión a partir de los 75.71°C para el caso 5, de 79.38°C en el caso 4 y de 85.14°C con un control negativo de apariencia uniforme en comparación a la fluorescencia presentado por los casos analizados en conjunto que no sobrepasaron 1.3 en el canal F1/F2. (Figura 22. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real Casos 3-4-5).



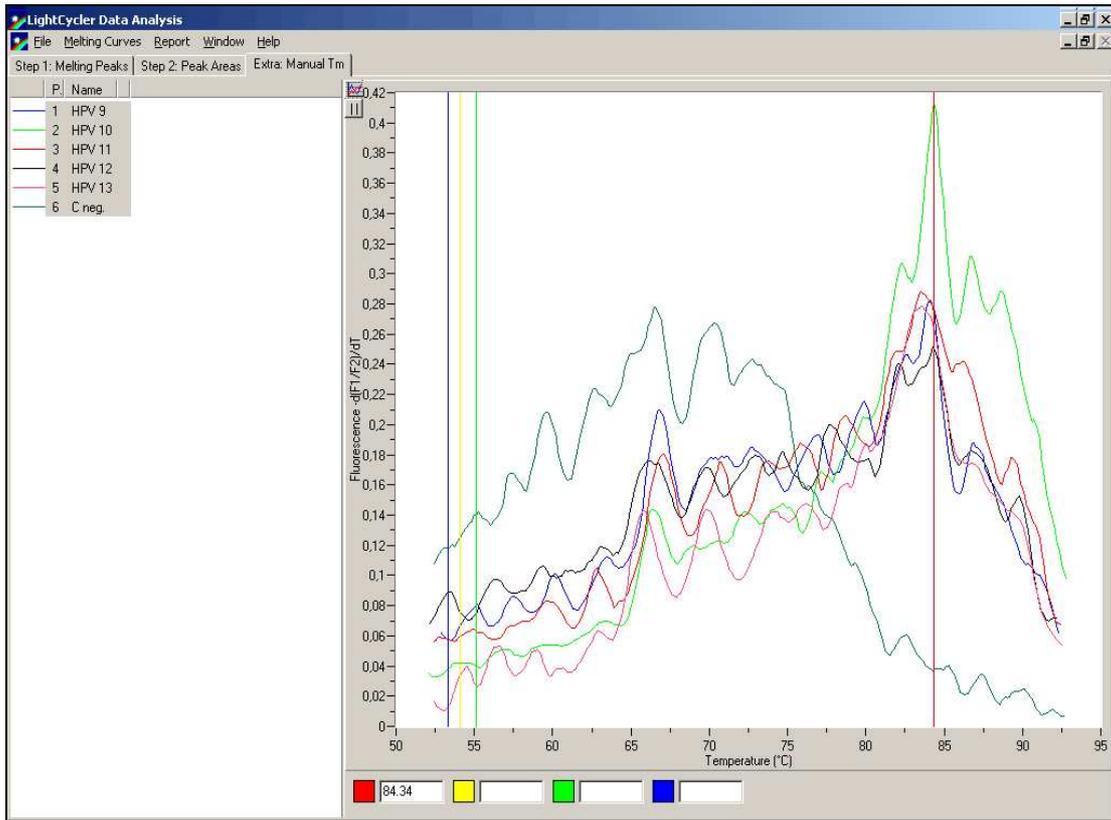
**Figura 22.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos: 3-4-5

Otro caso especial se encuentra en el caso 6 obtenido por citobrush donde en la figura se puede apreciar que entre el control positivo adicionado (HPV 6) con un pico de 78.38°C y la muestra del caso 6 con un punto de fusión de 79.47°C están relacionados debido a la estrecha similitud en áreas de fusión y la mayor fluorescencia que presentan ante el control negativo. (Figura 23. Imagen de la amplificación del AN HPV por PCR en tiempo real. Caso 6).



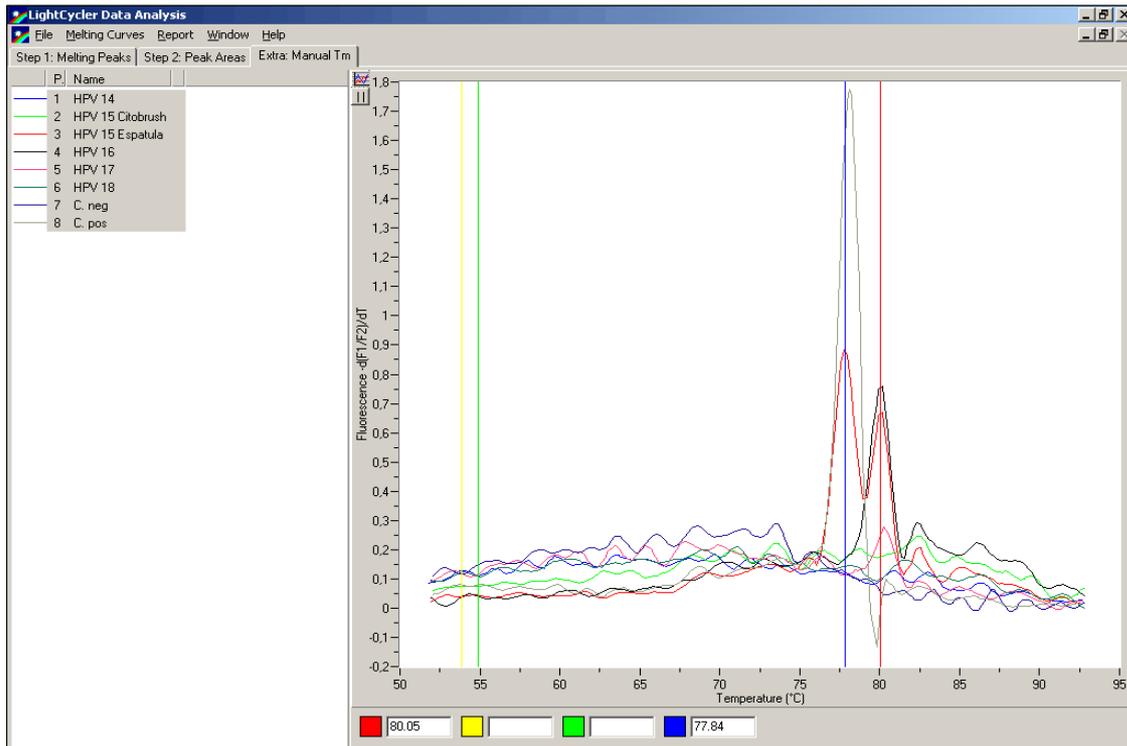
**Figura 23.** Imagen de la amplificación del AN HPV por PCR en tiempo real. Caso 6.

Para la amplificación de los casos 9-10-11-12 y 13 obtenidos con citobrush, se presenta una característica presencia de dímeros de cebadores y productos no específicos en la reacción debido a los puntos de fusión adicionales, pero lo interesante en estos casos es que parece ser que todos los casos analizados pertenecen a un mismo genotipo de HPV al mostrar un punto de fusión similar en 84.34°C, temperatura en la cual el control negativo al mismo tiempo deja de expresar y decae, además de que en el caso del HPV 10 presenta una mayor fluorescencia interpretativamente como mayor contenido de copias del virus en la muestra obtenidas en la PCR en tiempo real. (Figura 24. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 9-10-11-12-13).

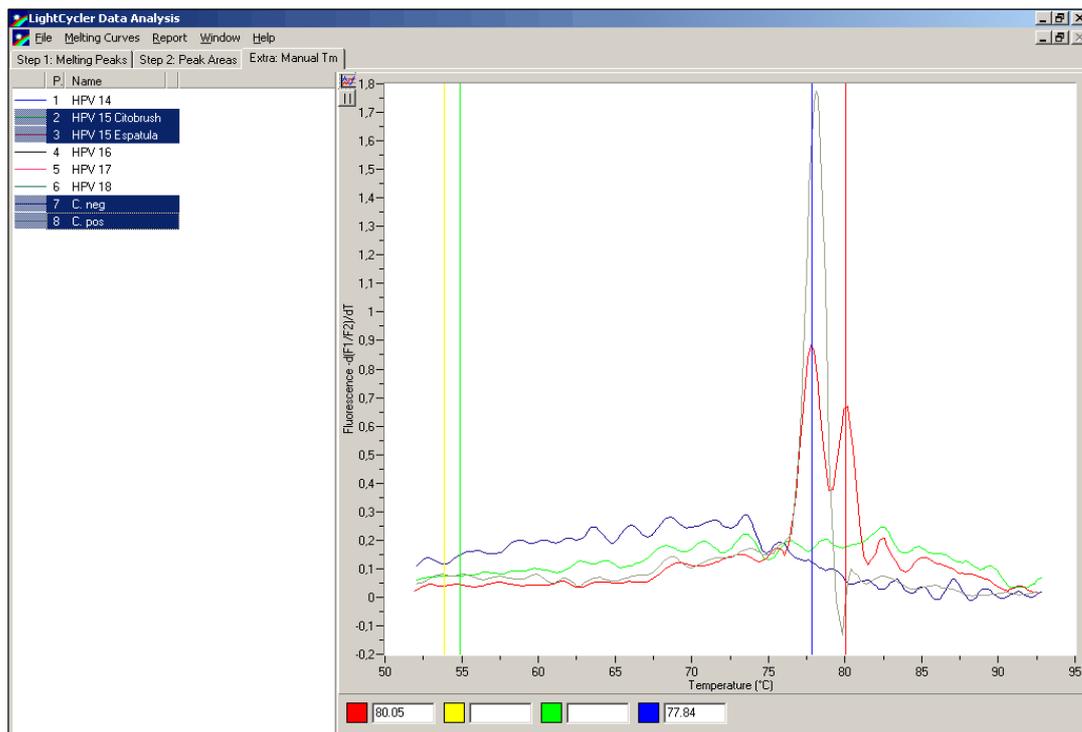


**Figura 24.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 9-10-11-12-13

En las imágenes de amplificación de los casos 14-15-16-17 y 18 se puede apreciar en conjunto (Figura 25. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 14-15-16-17-18) que los casos 14, 15 citobrush y 18 fueron negativos al no presentar puntos de fusión mayores al control negativo propuesto con un fluorescencia menor al 0.3, pero en el caso 15 (Figura 26. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 15esp. -15cit.), se puede apreciar como el control positivo coincide con el primer pico de fusión de la muestra obtenida con espátula (77.84°C) y el segundo pico aunque con menor fluorescencia se distingue a los 80.05°C, mientras que la muestra obtenida con citobrush no presenta ningún pico, corroborando los datos de patología en este caso que la paciente tenía una displasia cervical leve la cual no invadía el canal cervico uterino.

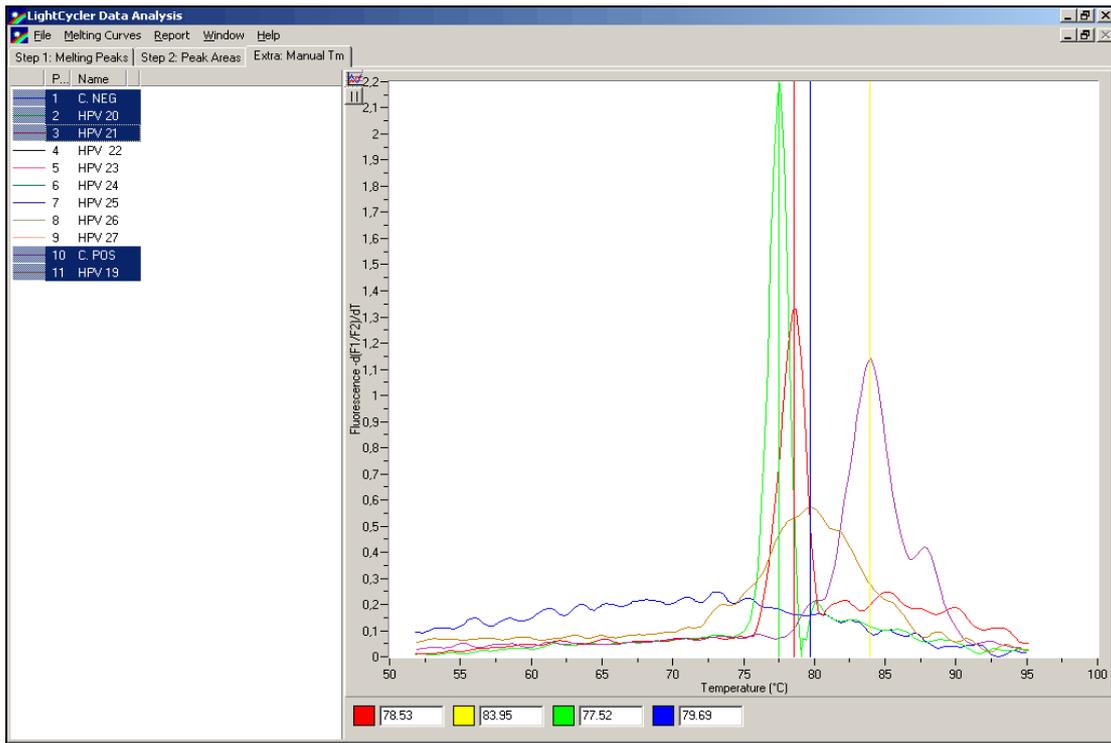


**Figura 25.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 14-15-16- 17-18



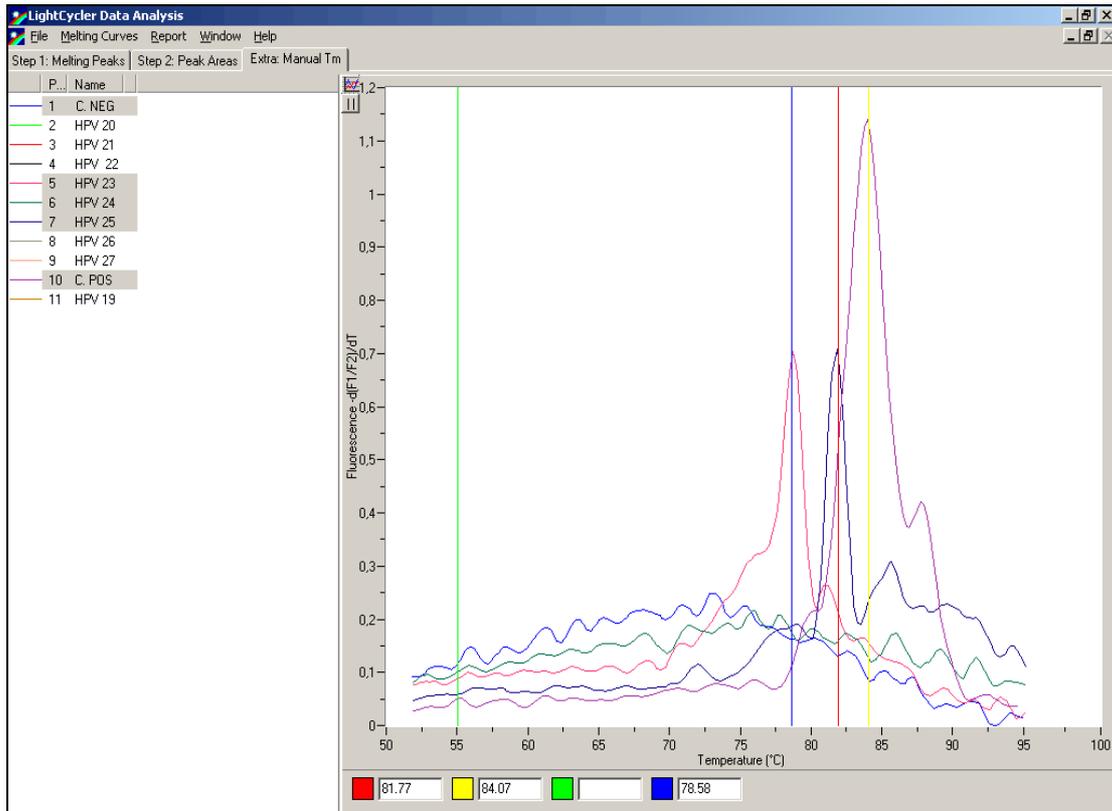
**Figura 26.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 15esp. – 15cit

En los casos 19-20-21-22 (Figura 27. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 19-20-21-22). Muestran la presencia del virus con puntos de fusión mayores al 77.52°C de diversos niveles de fluorescencia. El control positivo para estos casos resulto a los 83.95°C. debido a que se trabajo con ADN de HPV 16 proveniente de una muestra previamente tipificada en el laboratorio.



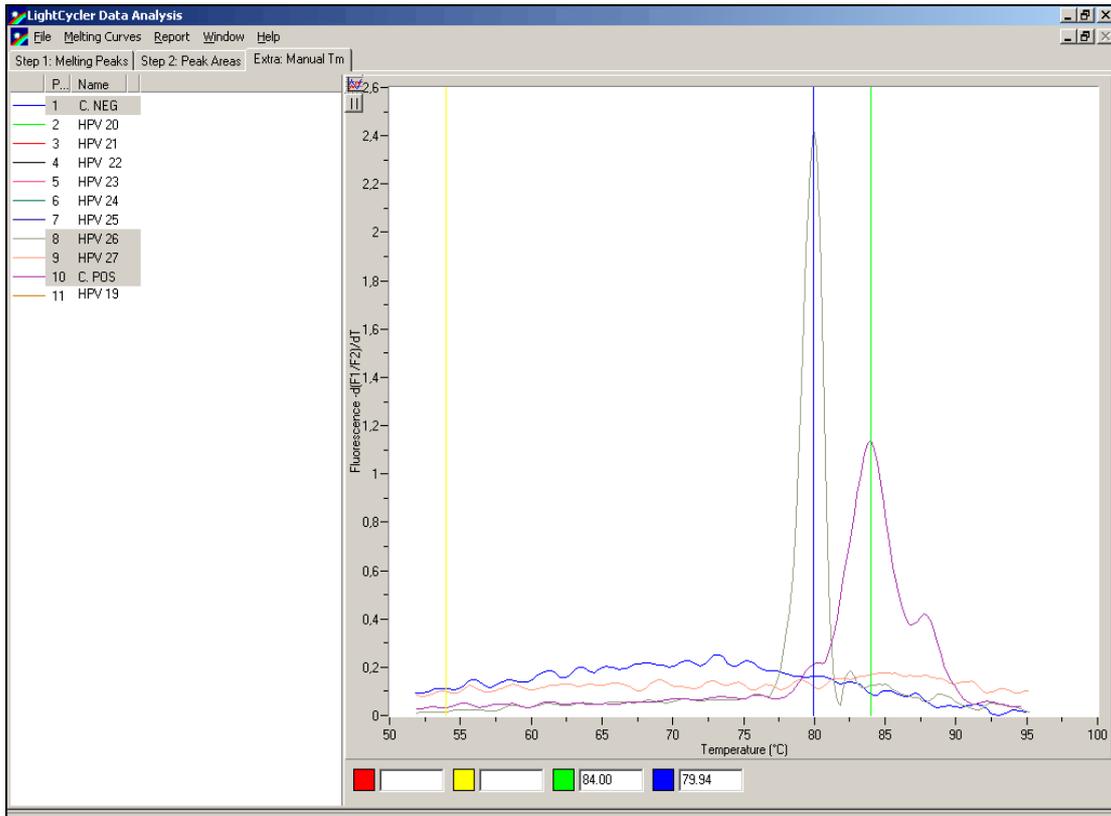
**Figura 27.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 19-20-21-22

El caso 24 representado en la Figura 28. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 23-24-25, se presenta negativo ante una patología descrita de Displasia Cervical Leve con tratamiento tópico de Acido Acético. En este caso nos llevaría a pensar que el hecho de que la paciente se encontrara en su tratamiento, es la razón por la cual no se detectaran virus en las dos muestras analizadas.



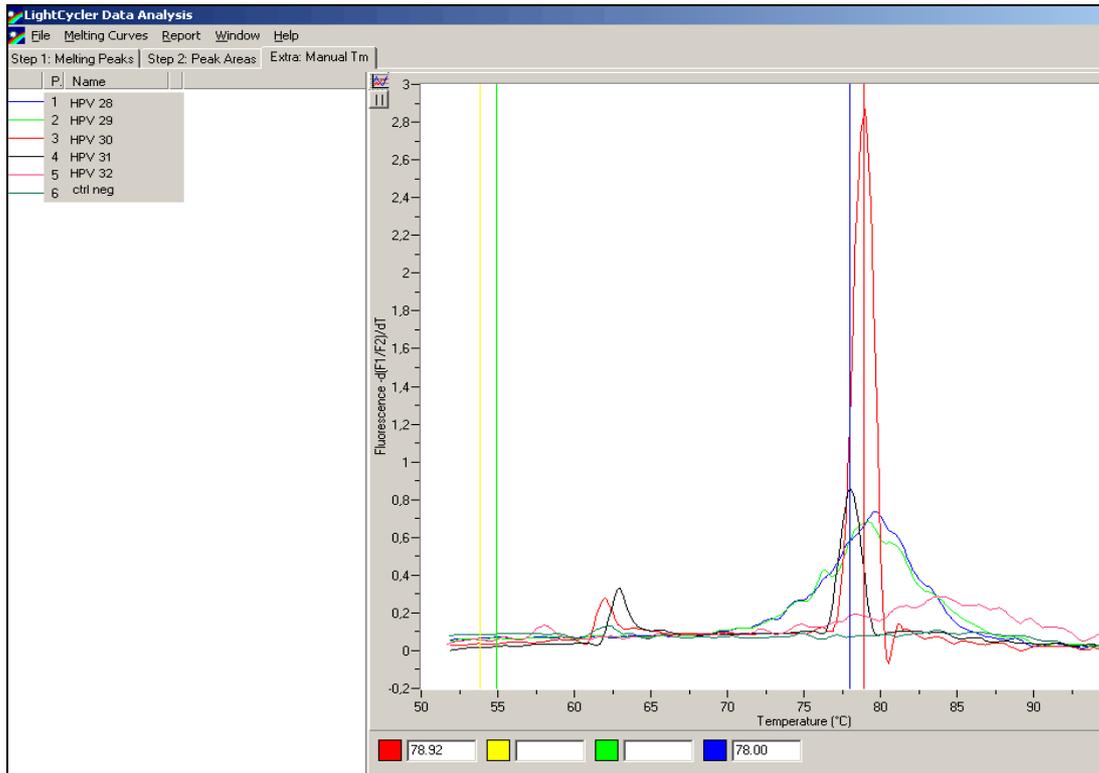
**Figura 28.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 23-24-25

Para los casos 26 y 27 (Figura 29. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 26-27); el primero fue positivo con un punto de fusión de 79.94°C y el segundo negativo, concuerdan con patología, el casos 26 al corroborar la existencia del virus en una Displasia Cervical leve con Condilomas y en el caso 27 con un Pap normal.



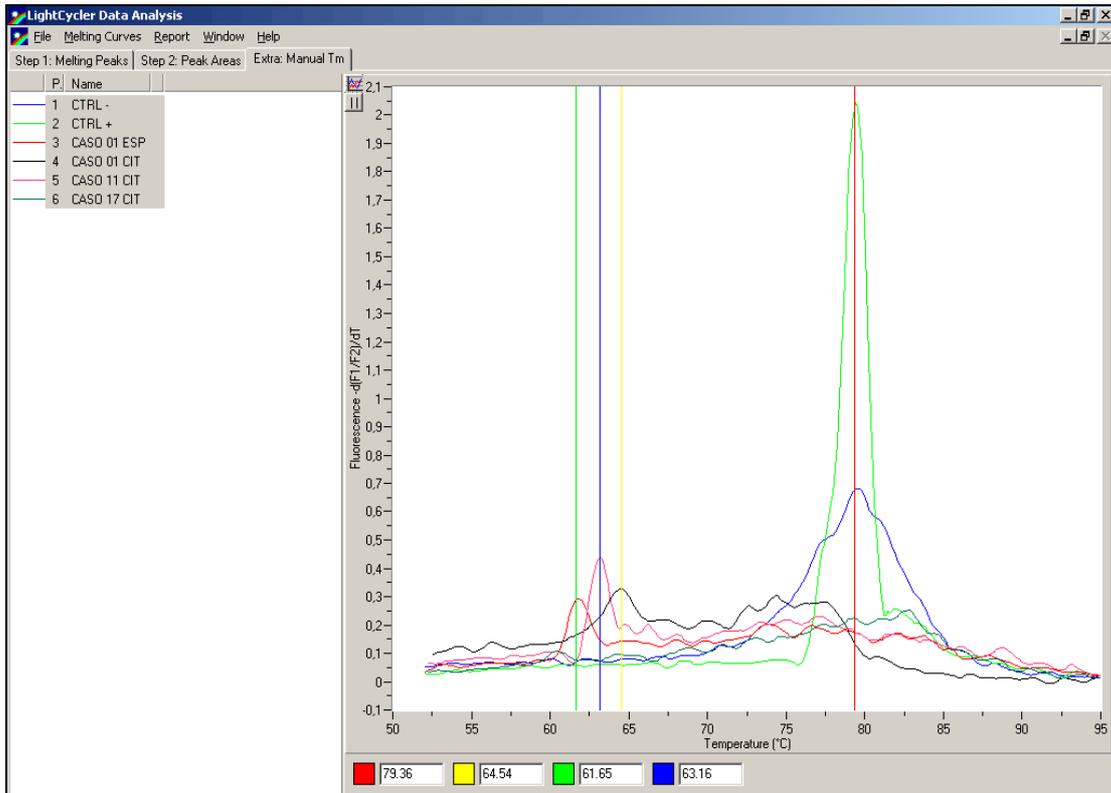
**Figura 29.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 26-27

Con los casos 28-29-30-31-32 (Figura 30. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 28-29-30-31-32) se puede distinguir claramente la positividad de todos ellos al observarse puntos de fusión mayores a los 78°C (Punto de fusión para el caso 31), mientras que el control negativo permanece uniforme en su señal 0. Aunque en el caso 32 no se aprecie claramente un pico o punto de fusión evidente como en los otros casos, en el análisis individual presenta 8384°C con un área pico de 3.83°C positivo para esta análisis.



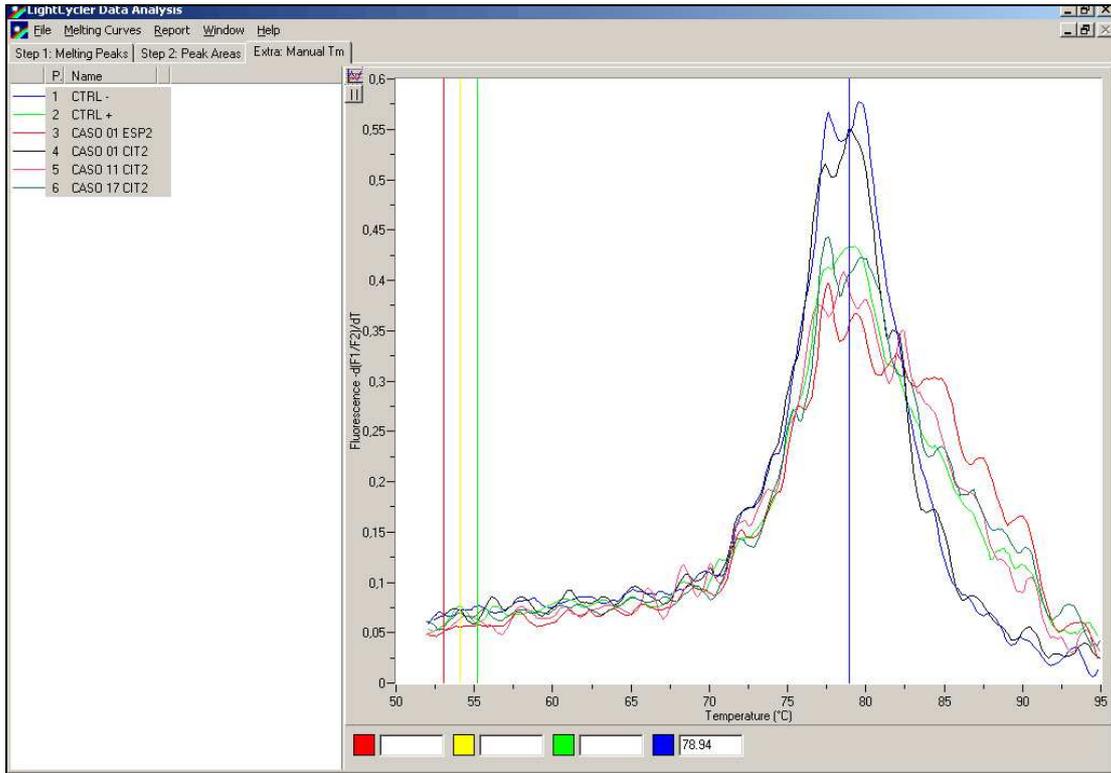
**Figura 30.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 28-29-30-31-32.

Para el segundo grupo de casos conformado por el ADN obtenido mediante la técnica Invitrogen-Innogenetics se realizó una primera amplificación donde (Figura 31. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 1-11-17 del segundo grupo). Se puede apreciar que los casos analizados se muestran negativos con puntos de fusión inferiores al control negativo y positivo resultando en una inhibición de la PCR en tiempo real, lo cual se confirma con la cuantificación del ADN donde cada una de las muestras se encuentran contaminadas con exceso de proteínas al obtener una pureza inferior a 0.616 para el caso1, 0.545 para el caso11 y de 0.627 para el caso 17.



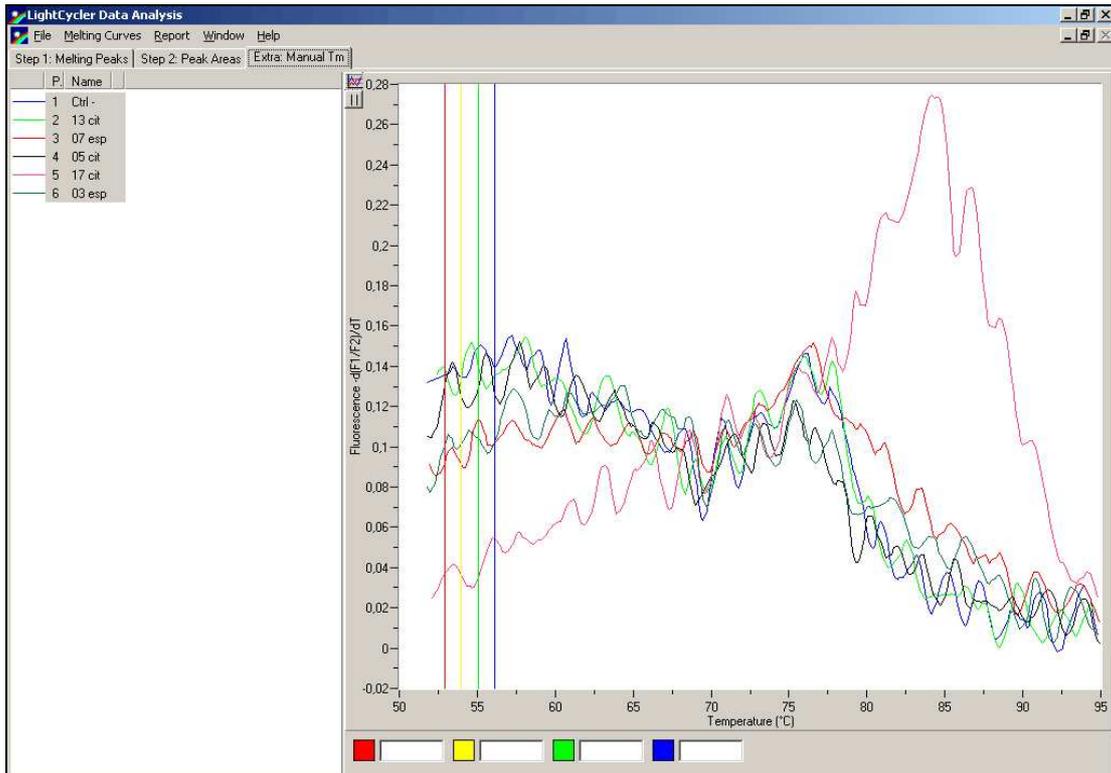
**Figura 31.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 1-11-17 del segundo grupo.

Luego de haber procedido a purificar el ADN con un protocolo de purificación orgánica con Fenol-Cloroformo. Se puede apreciar en la Figura 32. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 1-11-17 del segundo grupo después de la purificación, como la amplificación fue inhibida esta vez resultando tanto muestras como controles positivos y negativos en un solo punto de fusión de 78.94°C. con lo cual las muestras manipuladas fueron propensas a contaminación cruzada entre ellas.



**Figura 32.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 1-11-17 del segundo grupo después de la purificación.

Un segundo grupo de casos analizados para el ADN extraído por la técnica Invitrogen (Figura 33. Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 3-5-7-13 del segundo grupo después de la purificación revela un excesivo número de dímeros de cebadores y productos inespecíficos en cada una de las muestras analizadas, lo cual es debido a la presencia de diversos compuestos formados en la purificación con Fenol-Cloroformo y que en este caso intervinieron en la amplificación por PCR en Tiempo real.



**Figura 33.** Imagen de la amplificación del ADN HPV por PCR en tiempo real. Casos 3-5-7-13 del segundo grupo después de la purificación

### 4.3. Análisis Estadístico

Del total de muestras analizadas mediante PCR en tiempo real 28 casos (93.33%) fueron positivos, 2 casos (6.67%) fueron negativos. Mientras en el análisis patológico 21 casos positivos (70 %), y 9 casos negativos (30%). (Anexo 9. Comparación de resultados según Patología y PCR en tiempo real)

Al comparar las dos técnicas encontramos:

20 casos verdaderos positivos

1 caso verdadero negativo

8 casos falsos positivos

1 casos falso negativo

De acuerdo a la prueba de Ji cuadrado  $X^2$  y con un nivel de confianza del 95%, se determinó que las dos pruebas de detección (PCR en tiempo real y el análisis histopatológico) guardan relación ( $0.408 < 3.841$ )

Al evaluar la calidad de la detección por PCR en tiempo real nos dio como resultado un 95.23% de sensibilidad y un 11.11% de especificidad.

Además se pudo calcular el valor predictivo positivo (probabilidad de que un paciente detectado como enfermo por la técnica este realmente enfermo) en 71.42% mientras que el valor predictivo negativo (probabilidad de que un paciente detectado como sano por la técnica esté realmente sano) se valoró en un 50%.

La prevalencia de casos detectada por la PCR en tiempo real o Prevalencia aparente es de un 93.33%, pero la prevalencia real (detectada por Histopatología) resulta del 70% de los casos analizados.

Para calcular la tendencia de esta prueba para detectar casos positivos o negativos, se utilizó la Razón de Verosimilitud resultando un cociente de 1.07 lo cual favorece a la detección de casos positivos (pacientes enfermos). (Anexo 10. Análisis Ji cuadrado  $X^2$ ).

## 5. DISCUSIÓN

En la toma de muestras citológicas es de gran importancia conocer que el mismo método de resistencia a la desecación que desarrolla el HPV previa a la re-infección intervienen en la calidad de toma de muestras, por lo que se forma una escama cornificada (paraqueratinización) que protege a las células infectadas impide la extracción adecuada de estas células <sup>[23]</sup>, es decir la poca precisión y fuerza aplicada para raspar la zona lesionada impidió en dos casos la extracción de células para el análisis subsiguiente.

Después de re-suspender las células y extraer el ADN, el protocolo Wizard incluye un proceso de purificación de ADN en el que se eliminan las proteínas contaminantes mediante lisis de las mismas y re-suspensión del ADN con Isopropanol. Mientras el protocolo de extracción de Invitrogen se basa en una lisis rápida de las células suspendidas, el producto obtenido aunque con mayor cantidad de ADN presenta gran cantidad de contaminantes razón por la cual fue necesario en esta investigación su purificación orgánica con Fenol – Cloroformo.

La no amplificación del ADN extraído mediante el protocolo Invitrogen demuestra, la incompatibilidad de los reactivos usados en la extracción y purificación con los reactivos propios del master mix para la amplificación en PCR tiempo real, debido a que las mismas muestras amplificaron en PCR convencional y la concentración y purificación de estas estuvieron dentro de los rangos normales.

La sensibilidad resultante en este análisis molecular 95.23% fue mayor en comparación a los análisis realizados por Schneider en el año 2000, obteniendo el 89.4% de sensibilidad en su estudio, debido a la variación en el número de muestras analizadas, cabe recordar que el estudio de Schneider analizó 114 pacientes. Mientras el análisis aquí presentado fue el resultado de 30 pacientes.

La especificidad del trabajo no se compara a lo esperado (93.9 %) debido a la presencia de falsos positivos en comparación a los resultados patológicos. En este punto se debe estimar el hecho de que existe cerca de un 10% de casos positivos que pueden pasar como patologías sanas y libres de infección por HPV en la revisión patológica debido a la consideración de anomalías morfológicas celulares en la muestra, mientras tanto en el análisis molecular identificamos la presencia del virus (presencia latente del virus), exista o no un cambio celular perceptible según las consideraciones patológicas.

Además este análisis evidenció no solo la presencia del virus sino la localización específica de la lesión ya sea endocervical o exocervical debido a la división en la toma y manejo de muestras, resultando 10.71% de casos en los cuales solo se encontró infección por HPV solo en la región exo-cervical.

Según los datos analizados el 73.33% de lesiones patológicas positivas para HPV se deben a la presencia *in situ* del virus.

## **6. CONCLUSIONES**

1. La sensibilidad de la PCR en Tiempo real en este estudio fue mayor que la presentada por Schneider et al. en el año 2000

2. La especificidad de la PCR en Tiempo real en este estudio fue menor que la presentada por Schneider et al. en el año 2000, debido a la presencia de falsos positivos.

3. La PCR en Tiempo real pudo detectar la presencia del virus en 8 casos, los cuales no presentaban anomalías celulares detectadas por patología.

4. El protocolo de extracción de ADN Wizard de Promega fue efectivo en la detección del genoma viral del HPV.

5. El protocolo de extracción de ADN Invitrogen no fue compatible para la amplificación con PCR en tiempo real.

6. La detección molecular del virus del Papiloma Humano mediante PCR en Tiempo real es posible, siempre y cuando se maneje con precaución cada uno de los procesos en especial el mantener la muestra adecuada y compatible con la reacción de amplificación.

7. Al analizar las dos técnicas estadísticamente se concluye que los dos tipos de pruebas para la detección del HPV están relacionadas.

8. La información obtenida tanto por la técnica de detección del HPV por PCR en Tiempo real así como el análisis histopatológico se complementan y es muy útil en investigación y decisión terapéutica.

9. La PCR en tiempo real tan solo es un paso en el camino de la investigación genética del HPV que en un futuro cercano nos conducirá a la detección precoz y tratamiento eficaz del Cáncer Cérvico uterino.

## 7. GLOSARIO

**ADN.-** Acido Desoxirribonucleico. Es el material genético de casi todos los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo de las células. Es un ácido nucleico compuesto de dos tiras llamadas nucleótidos. Las dos tiras se disponen en espiral formando una doble hélice y unidas entre sí por enlaces de hidrógeno entre las bases de nucleótidos. La información genética está contenida en secuencia a lo largo de la molécula; la cual puede hacer copias exactas de sí misma por un proceso denominado replicación, pasando de este modo la información genética a las células hijas, cuando las células se dividen.

**CANCER.-** Nombre de las enfermedades en las cuales células anormales se multiplican sin control. Las células cancerosas pueden invadir los tejidos vecinos y pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Hay varios tipos principales de cáncer. El carcinoma es el cáncer que empieza en la piel o en los tejidos que revisten o cubren los órganos internos. El sarcoma es el cáncer que empieza en el hueso, el cartílago, la grasa, el músculo, los vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén. La leucemia es el cáncer que comienza en el tejido que elabora la sangre, como la médula ósea, y hace que se produzca un gran número de glóbulos anormales y que entren en el torrente sanguíneo. El linfoma y el mieloma múltiple son cánceres que empiezan en las células del sistema inmunitario.

**CANCER CERVICO UTERINO.-** Es un cáncer que comienza en el cuello uterino, la parte inferior del útero (matriz) que se abre en la parte superior de la vagina. Los cánceres cervicales comienzan en las células de la superficie del cuello uterino. Existen dos tipos de dichas células: escamosas y columnares. La mayoría de los cánceres de cuello uterino provienen de las células escamosas. El desarrollo del cáncer cervical generalmente es muy lento y comienza como una afección precancerosa llamada displasia. Casi todos los cánceres cervicales son causados por el virus del papilomas humano (VPH), un virus común que se disemina a través de las relaciones sexuales.

**CÁPSIDE.-** La cápsida o cápside vírica es una estructura proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros. En el interior de esta cápside se encuentra siempre el material genético del virus. Puede estar rodeada por una envoltura. Cada capsómero puede estar constituido por una o varias proteínas distintas. El término nucleocápside se refiere al material genético envuelto en su cápside.

**CARCINOMA.-** Cáncer de los tejidos epiteliales con tendencia a difundirse.

**COILOCITO.-** células con halo peri nuclear blanquecina cuyas cambios morfológicos son debidos a la infección por HPV.

**CONDILOMA.-** Es una enfermedad causada por el Virus Papiloma Humano. Se caracteriza por el crecimiento de verrugas blandas en los genitales o en la región anal, o sea que crece entre los muslos y la parte interna de las nalgas, en el pene o en la vagina.

**DISPLASIA.-** Alteración del desarrollo de ciertos tejidos del organismo, que da lugar a malformaciones.

**DISQUERATOSIS.-** Alteración autosómica dominante lentamente progresiva de la queratinización que se caracteriza por la formación de pápulas de color rosado a bronceado que confluyen para formar placas. Estas lesiones oscurecen con el tiempo, y habitualmente se fusionan formando crecimientos papilomatosos y verrucosos malolientes. Microscópicamente, se caracteriza por queratinización prematura

**GENOMA.-** conjunto de cromosomas de una especie

**GENOTIPOS.-** Conjunto de factores hereditarios. Constitución genética de un organismo. Se opone a Fenótipo.

**NEOPLASIA.-** Término que denomina a un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal y descontrolado de un tejido. Estos pueden formar tumores y en ocasiones invadir órganos a distancia .

**PAPILOMA.-** Tumor pediculado benigno que se forma en las papilas de la piel o de las mucosas:

**PCR.- Reacción en Cadena de la Polimerasa.-** Es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis,<sup>1</sup> cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

**PCR EN TIEMPO REAL.-** Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original, o para identificar con una muy alta probabilidad, muestras de DNA específicas a partir de su temperatura de fusión

**VIRIÓN.-** Unidad estructural de los virus. Consta fundamentalmente de dos estructuras imprescindibles: Un ácido nucleico (ADN o ARN) y una envoltura proteica (cápside). A estas estructuras básicas se añade en algunos casos una envoltura lipídica (peplos) y/o espículas de glucoproteína.

**VIRUS.-** Entidad biológica que cuenta con la capacidad de auto replicarse al utilizar la maquinaria celular de su hospedero.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. BASEMAN, J. and L.A. Koutsky. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology (United Kingdom)* 32S (2005):S16–S24.
2. BIOPAP QTS. Kit para diagnóstico de *Papillomavirus Humano* (HPV) anogenital en muestras de cérvix Manual de Uso. 2004.Biotools. (España).
3. BOSCH, F., A Lorincz, N. Muñoz, C.J.L.M. Meijer and K. V. Shah. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology (The Netherlands)* 55(1):244–265
4. BRINK, A.A., G. D. Zielinski, R. D. M. Steenbergen, P. J. F. Snijders and C. J. L. M. Meijer. 2005. Clinical relevance of human papillomavirus testing in cytopathology. *Cytopathology; (The Netherlands)* 16 (1):7-12
5. BRYAN J.T. and D.R. Brown. 2000. Association of the human papillomavirus type 11 E1(E4) protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology* 277:262–9.
6. CULP, T.D., N.D. Christensen, 2004. Kinetics of *in vitro* adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology (United States)* 319:152–61.
7. CUSCHIERI, K. and H. Cubie. 2005. The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *Journal of Clinical Virology (United Kingdom)* 32S (2005): S34–S42
8. DAWSON B. y R. G. Trapp. 2002. Bioestadística médica, tercera edición, Editorial El Manual Moderno. Vol1:289-294
9. DOORBAR John. 2005. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology (United Kingdom)* 32S:S7–S15.
10. FLORIN L., C. Sapp, R.E. Streeck, and M. Sapp. 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *Journal of Virology (United States)* 76:10009–14.
11. GAZAPO E., R.M. Gazapo y A. Catarla. 2005. Utilidad clínica de la determinación de beta-2-microglobulina. (España).
12. GRAVITT, P. E., C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C. M. Wheeler, F. Coutlée, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D. R. Scott, and R. J. Apple. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology. (United States)*38:357–361.

13. HARRISON H. 1995. Principios de Medicina Interna. 15ª Edición., Madrid- España. Vol 1: 1319-1321
14. INNOGENETICS, Belgium 2004, INNO-LIPA HPV Genotyping v2 manual, 1-24
15. LI M., P. Beard, P.A. Estes, M.K. Lyon, R.L. Garcea. 1998. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *Journal of Virology (United States)* 72:2160–7.
16. MOLIJN, A., B. Kleter, and W. Quint., 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology* 32S :S43–S51.
17. MUÑOZ, N., FX Bosch, and S. Chichareon, 2003. Epidemiologic classification of human Papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine (England)* 348(6): 518–527.
18. National Cancer Institute. Entendiendo la vacuna del HPV [en línea]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/entendiendo/vacuna-VPH/allpages/print>
19. OZBUN M.A. and C. Meyers. 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*;72:2715–22.
20. PROMEGA, USA 2005, Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Promega Corporation. 1-20
21. PUERTAS, M. 1999. Genética Fundamentos y Perspectivas. Segunda Edición. Madrid-España. Vol 1: 215-218
22. ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS, Germany 2000. PCR Applications Manual, 2<sup>nd</sup> Edition. Roche Molecular. 25-489
23. RODEN R.B., D.R. Lowy, J.T. Schiller. 1997. Papillomavirus is resistant to desiccation. *Journal of Infectious Diseases. (United States)* 176:1076–1079.
24. SCHNEIDER, A., H. Hoyer, B. Lotz, S. Leistritz, R. Kuhne-heid, I. Nindl, B. Muller, J. Haerting and M. Durst, 2000. Screening for High grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high risk HPV

- routine cytology or colposcopy. *International Journal of Cancer (United States)* 89(1):529-34.
25. SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CANCER, Guayaquil. 2000. Registro nacional de Tumores Cáncer en Guayaquil 1997-2000, Sociedad de Lucha contra el Cáncer Sede Nacional Instituto Oncológico Nacional Dr. Juan Tanca Marengo Guayaquil-Ecuador. 523-615.
  26. STEENBERGEN R.D.M., J. de Wilde, S.M. Wilting, A.A.T.P. Brink, P.J.F. Snijders, and C.J.L.M. Meijer. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *Journal of Clinical Virology (United Kingdom)* 32S:S25–S33.
  27. SZUHA Ka´ roly, E. Sandhaus, S.M. Kolkman-Uljee, M. Lemaitre, and J.C. Truffert. 2001. A Novel Strategy for Human Papillomavirus Detection and Genotyping with SybrGreen and Molecular Beacon Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Pathology (United States)* 159,5: 256-259.
  28. TAKUMA F., N. Masumoto, M. Saito, N. Hirao, S. Niimi, M. Mukai, A. Ono, S. Hayashi, K. Kubushiro, E. Sakai, K. Tsukazaki, and S. Nozawa, 2005. Comparison Between *In Situ* Hybridization and Real-time PCR Technique as a Means of Detecting the Integrated Form of Human Papillomavirus 16 in Cervical Neoplasia. *Diagnostic Molecular Pathology (United States)* 14 (2):102-108.
  29. VAN DEN BRULE A.J.C., N. Fransen-Daalmeijer, L.M. Schouls, C.J.L.M. Meijer and P.J.F. Snijders. 2001. GP5+/6+ PCR followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology. (United States)* 40,3:779–787.
  30. WALBOOMERS, J.M., M.V. Jacobs, M.M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, J. Peto, C.J.L.M. Meijer and N. Muñoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology (The Netherlands)* 189(1):12-19
  31. WILSON V.G., M. West, K. Woytek, and D. Rangasamy. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes (United States)* 24:275–90.
  32. ZAZOVE, P., BD Reed, L Gregoire, DW Gorenflo, WD Lancaster. 1998. Low False-Negative rate of PCR Analysis for detecting Human Papillomavirus – Related Cervical lesions. *Journal of Clinical Microbiology (United States)* 36(9):2708-2713.

33. ZHANG P., M. Nouri, J.L. Brandsma, T. Iftner, and B.M. Steinberg. 1999. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit Papillomavirus latency following UV activation. *Virology (United States)* 263:388–94.
34. ZIELINSKI G. Denise, P.J.F. Snijders, L. Rozendaal, N.F. Daalmeijer, E. K.J. Risse, F.J. Voorhorst, N.M. Jiwa, H.C. van der Linden, F.A. de Schipper, A.P. Runsink and C.J.L.M. Meijer. 2003. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma *in situ* and adenocarcinoma of the cervix. *Journal of Pathology (United States)* 201: 535–543.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Imagen de la base datos Access utilizada en el levantamiento de información

	Nu	Nombre Paciente	Historia Clinica	Nu	Condicion de la toma	Lugar de la toma	Diagnostico Presuntivo
+	1		1984-3042	2	Cotonete/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical leve+HPV
+	2		2002-1568	2	Cotonete/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical Moderada
+	3		2005-3115	2	Cotonete/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical Moderada
+	4		SHC	2	Cotonete/Citobrush	Exo/Endocervix	No existe registro
+	5		SHC	2	Cotonete/Citobrush	Exo/Endocervix	No existe registro
+	6		2005-2950	2	Cotonete/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical leve+Conc
+	7		2004-4159	1	Cotonete	Mucosa Vulvovag	Displasia Cervical leve+HPV
+	8		SHC	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical leve+HPV
+	9		2004-6032	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical leve+HPV
+	10		2005-3279	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical leve+HPV
+	11		06176-2005	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	No existe registro
+	12		SHC	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical leve+HPV
+	13		2003-2437	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cuello Uterino
+	14		SHC	1	Citobrush	Endocervical	No existe registro
+	15		SHC	2	Espatula/Citobrush	Endocervix/muc	Displasia Cervical leve+HPV
+	16		SHC	1	Citobrush	Endocervical	
+	17		2005-3762	1	Espatula	Mucosa Vulvovag	
+	18		2005-3731	1	Citobrush	Endocervical	HPV+Displasia Cervical leve
+	19		2005-4112	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	HPV+Displasia Cervical leve
+	20		2005-4581	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	Carcinoma de Cel escamosa
+	21		SHC	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	No existe registro
+	22		2005-4611	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	Carcinoma de Cel escamosa
▶	+		2005-4363	1	Citobrush	Endocervical	Pap II+HPV
+	24		2005-4600	2	Espatula/Citobrush	Exo/Endocervix	Displasia Cervical leve

Registro: 23 de 41

\* Los nombres de los pacientes en este estudio han sido protegidos.

## **Anexo 2. Protocolo de Extracción de ADN**

### **Kit de extracción ADN WIZARD-PROMEGA**

1. Separar las células a utilizar y resuspender en 1ml de solución de lisis celular. Utilizar tubos eppendorf de 1.5 ml
2. Centrifugar a 13,000-16,000x g por 10 segundos
3. Remover el sobrenadante y agregar 600ul de Solución de lisis nuclear. Pipetear generosamente para lisar.
4. Añadir 3ul de Solución RNAsa y mezclar la muestra por inversión de 2-5 veces.
5. Incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Refrigerar de 5 a 10 minutos
7. Añadir 200 µl de solución de Precipitación de lisis
8. Dar vórtex por 20 segundos vigorosamente
9. Centrifugar por 3 minutos a 13,000-16,000x g. las proteínas precipitadas formaran un pellet al fondo del tubo
10. Recuperar el sobrenadante cuidadosamente y pasarlo a un nuevo tubo eppendorf previamente etiquetado.
11. Añadir 600ul de isopropanol
12. Invertir la muestra suavemente hasta que la medusa del ADN se observe
13. Centrifugar por 1 minuto a 13,000-16,000x g
14. Retirar el sobrenadante tener cuidado de no llevarse la medusa y agregar 600 ul de Etanol al 70%
15. Centrifugar por 1 minuto a 13,000-16,000x g
16. Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no perder la medusa de ADN
17. Dejar evaporar el Etanol a temperatura ambiente o baño maría seco a 37°C
18. Añadir 100ul de Solución Rehidratante de ADN
19. Incubar la muestra a 65°C por una hora.
20. Congelar la muestra de 2-8°C

### **Anexo 3. Protocolo de Extracción de ADN Invitrogen - INNOGENETICS**

#### **Extracción de ADN a partir de células cervicales**

1. El ADN puede ser extraída de raspados cervicales colectados en agua, solución salina, PBS o metanol conteniendo soluciones como PerservCyt y AutoCyte
2. Efectuar vórtex o mezcla rigurosa para extraer células del cepillo citológico por 15 segundos.
3. Transferir 1 ml de solución células resuspendidas a un tubo eppendorf evitando contaminación entre las muestras.
4. Centrifugar las muestras a 13000 rpm por 15 segundos.
5. Descartar el sobrenadante usando una punta de micropipeta desechable con filtro para cada tubo de reacción. Tapar cada tubo.
6. Añadir 1 ml de agua destilada y dar vórtex rápidamente para resuspender las células.

#### **Extracción de ADN usando proteinasa K**

##### Preparación de la solución de digestión

1. Proteinasa K (400ug/ml) 400 µg/ml en agua desionizada, alicuotar y almacenar a 20°C.
2. Triton X-100 6 % (v/v) en agua desionizada, alicuotar y almacenar a 20°C.
3. Solución de Digestión: Mezclar cantidades de Proteinasa K (400ug/ml) y 6% Triton X-100 inmediatamente antes de ser usado.

#### **Protocolo**

1. Pipetear 50 µl de solución de Digestión en tubos eppendorf y añadir 150 µl de células suspendidas.
2. Dar vórtex rápidamente
3. Incubar 1 hora a 56°C
4. Dar vórtex rápidamente
5. Inactivar la Proteinasa K por 10 minutos a 95°C
6. Dar vórtex rápidamente
7. Utilizar 5 µl ADN en PCR.

**Anexo 4. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de Muestras**

<b>Cuantificación de ADN extraído según Protocolo Wizard- Promega</b>		
<b>Casos</b>	<b>Concentración ug/ml</b>	<b>260/280</b>
1 cot	14,15	2,079
1 cit	17,25	1,747
3esp	14,1	2,103
3cit	13,45	2,556
4esp	15,95	3,636
4cit	16,35	3,425
5esp	25,15	3,259
5cit	22,95	3,456
6esp	11,05	2,158
6cit	17,9	1,947
7esp	No valido	0
7cit	No valido	0
8esp	No valido	0
8cit	No valido	0
9esp	12,22	1,626
9cit	23,7	1,495
10esp	22,55	1,973
10cit	19,25	2,679
11esp	25,6	1,865
11cit	17,15	2,781
12esp	21,95	2,568
12cit	31,05	2,739
13esp	17,95	2,895
13cit	23,85	2,587
14esp	24,6	1,831
14cit	1,3	0,582
15esp	18,7	1,865
15cit	2	0,567
16cit	30,05	1,653
17cit	22,5	1,534
17esp	19,39	3,214
18cit	16,35	2,975
18esp	1,95	0,537
19esp	16,25	2,226
19cit	21,82	2,601
20esp	80,8	1,952
20cit	17,84	1,856
21esp	25,95	1,853
21cit	32,35	1,778
22esp	23,2	1,534
22cit	21,9	1,132
23esp	80,8	2,614
23cit	17,7	3,256
24esp	1,85	0,775
24cit	2,59	0,537
25esp	23,2	1,526

25cit	21,8	1,652
26esp	13,7	1,952
26cit	22,58	1,596
27esp	2,88	0,995
27cit	2,46	1,573
28esp	19,27	1,679
28cit	25,64	2,865
29esp	27,17	1,961
29cit	21,95	1,987
30esp	31,15	1,958
30cit	37,93	2,465
31esp	28,35	2,98
31cit	34,62	2,831
32esp	68,75	2,582
32cit	30,05	3,665
<b>Promedio</b>	<b>21,99</b>	<b>1,96</b>

\*Cot: muestra tomada con cotonete

\*Esp: muestra tomada con espátula de Ayre

\*Cit: muestra tomada con cepillo citológico "citobrush"

**Anexo 5. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de Muestras obtenidas en la región Exocervical con Cotonete y Espátula de Ayre**

<b>Cuantificación de ADN extraído según Protocolo Wizard- Promega</b>		
<b>Casos</b>	<b>Concentración ug/ml</b>	<b>260/280</b>
1 cot	14,15	2,079
3esp	14,1	2,103
4esp	15,95	3,636
5esp	25,15	3,259
6esp	11,05	2,158
7esp	No valido	0
8esp	No valido	0
9esp	12,22	1,626
10esp	22,55	1,973
11esp	25,6	1,865
12esp	21,95	2,568
13esp	17,95	2,895
14esp	24,6	1,831
15esp	18,7	1,865
17esp	19,39	3,214
18esp	1,95	0,537
19esp	16,25	2,226
20esp	80,8	1,952
21esp	25,95	1,853
22esp	23,2	1,534
23esp	80,8	2,614
24esp	1,85	0,775
25esp	23,2	1,526
26esp	13,7	1,952
27esp	2,88	0,995
28esp	19,27	1,679
29esp	27,17	1,961
30esp	31,15	1,958
31esp	28,35	2,98
32esp	68,75	2,582
<b>Promedio</b>	<b>24.59</b>	<b>1.93</b>

\*Cot: muestra tomada con cotonete

\*Esp: muestra tomada con espátula de Ayre

**Anexo 6. Cuantificación del ADN HPV obtenido del primer grupo de Muestras obtenidas en la región Endocervical con Citobrush.**

<b>Cuantificación de ADN extraído según Protocolo Wizard- Promega</b>		
<b>Casos</b>	<b>Concentración ug/ml</b>	<b>260/280</b>
1 cit	17,25	1,747
3cit	13,45	2,556
4cit	16,35	3,425
5cit	22,95	3,456
6cit	17,9	1,947
7cit	No valido	0
8cit	No valido	0
9esp	12,22	1,626
9cit	23,7	1,495
10cit	19,25	2,679
11cit	17,15	2,781
12cit	31,05	2,739
13cit	23,85	2,587
14cit	1,3	0,582
15cit	2	0,567
16cit	30,05	1,653
17cit	22,5	1,534
18cit	16,35	2,975
19cit	21,82	2,601
20cit	17,84	1,856
21cit	32,35	1,778
22cit	21,9	1,132
23cit	17,7	3,256
24cit	2,59	0,537
25cit	21,8	1,652
26cit	22,58	1,596
27cit	2,46	1,573
28cit	25,64	2,865
29cit	21,95	1,987
30cit	37,93	2,465
31cit	34,62	2,831
32cit	30,05	3,665
<b>Promedio</b>	<b>19.95</b>	<b>2.00</b>

\*Cit: muestra tomada con cepillo citológico "citobrush"

## **Anexo 7. Protocolo de purificación orgánica de ADN con Fenol-Cloroformo**

### **1) Extracción con fenol- cloroformo**

1. Obtener las muestras de ADN a ser purificadas , después de verificar en el cuantificador de ADN la concentración y pureza del ADN.
2. Descongelar las muestras de ADN en baño maria seco de ser necesario.
3. Transferir 400 ul de la muestra a ser purificada en un nuevo tubo eppendorff.
4. Agregar un volumen de fenol/ cloroformo- alcohol isoamílico (400 ul).
5. Dar vórtex y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
6. Recuperar la fase superior (acuosa).
7. Repetir los pasos de 4-6 de ser necesario.
8. A la fase acuosa agregar 0,1 volúmenes de Acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C).
9. Mezclar suavemente por inversión.
10. Dejar al menos dos horas (puede ser toda la noche) precipitando a -20°C.
11. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm y 4°C.
12. Tirar el sobrenadante y agregar 400 ul de etanol 70° frío.
13. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm.
14. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
15. Resuspender el pellet en 30ul de agua ultrapura.
16. Cuantificar el ADN obtenido.

## Anexo 8. Cuantificación del ADN HPV obtenido del segundo grupo de muestras

Cuantificación de ADN extraído según Protocolo Invitrogen-Innogenetics				
Casos	Primera Extracción		Producto Purificación	
	Concentración ug/ml	260/280	Concentración ug/ml	260/280
001 cit	32,45	0,616	NV	0
001 esp	4,95	0,607	28,50	1,676
002 cit	13,35	0,720	63,00	1,703
002 esp	37,55	0,655	16,00	1,882
003 cit	31,00	0,500	45,50	1,655
003 esp	35,15	0,618	58,50	1,625
004 cit	25,80	0,518	18,00	1,800
004 esp	20,65	0,523	16,50	1,737
005 cit	22,10	0,534	17,50	1,667
005 esp	27,75	0,557	18,00	1,565
006 cit	22,55	0,500	NV	0
006 esp	26,00	0,526	NV	0
007 cit	32,15	0,574	12,50	2,083
007 esp	32,75	0,581	12,50	1,667
008 cit	32,00	0,536	14,50	2,636
008 esp	91,20	0,785	23,50	1,808
009 cit	39,05	0,547	NV	0
009 esp	30,55	0,513	NV	2,500
010 cit	29,05	0,585	21,00	1,680
010 esp	26,35	0,498	NV	2,500
011 cit	21,55	0,545	28,50	1,390
011 esp	17,3	0,585	NV	2,400
012 cit	27,9	0,613	15,50	1,476
012 esp	16,95	0,538	14,50	1,611
013 cit	18,45	0,585	11,50	1,917
013 esp	24,85	0,705	NV	2,000
014 cit	13,95	0,547	18,00	1,500
014 esp	16,65	0,555	NV	2,500
015 cit	16,9	0,572	117,5	1,588
015 esp	13,35	0,596	NV	1,600
016 cit	32,35	0,534	20,50	1,640
016 esp	35,55	0,592	21,00	1,556
017 cit	34,7	0,627	26,00	1,521
017 esp	28,5	0,520	15,50	1,632
018 cit	16,7	0,543	21,00	1,556
018 esp	24,1	0,579	30,00	1,714
019 cit	14,05	0,531	37,50	1,500
019 esp	35,15	0,696	39,00	1,440
020 cit	14	0,465	15,00	1,250
020 esp	22,9	0,533	25,50	1,700
<b>Promedio</b>	30.62	0.575	27.32	1.761

\*Esp: muestra tomada con espátula de Ayre

\*Cit: muestra tomada con cepillo citológico "citobrush"

\*NV: muestra no valida para la cuantificación

### Anexo 9. Comparación de resultados según Patología y PCR en tiempo Real

Casos	Resultados		Lesión Patológica descrita
	PCR tiempo real	Patología	
1 esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve+HPV
1 cit	positivo		
2esp	positivo	positivo	Displasia Cervical Moderada+Cervicitis cronica
2cit	positivo		
3esp	positivo	positivo	Tipificación HPV 16
3cit	positivo		
4esp	positivo	positivo	Displasia leve + HPV
4cit	positivo		
5esp	positivo	positivo	Displasia leve + HPV
5cit	positivo		
6esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve+Condiloma viral +HPV
6cit	positivo		
7esp	NO	positivo	Displasia Cervical leve+HPV
7cit	ADN		
8esp	NO	positivo	Displasia Cervical leve+HPV
8cit	ADN		
9esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve+HPV
9cit	positivo		
10esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve+HPV
10cit	positivo		
11esp	positivo	negativo	Pap normal
11cit	positivo		
12esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve+HPV
12cit	positivo		
13esp	positivo	positivo	Displasia Cuello Uterino
13cit	positivo		
14esp	positivo	negativo	Pap normal
14cit	negativo		
15esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve+HPV
15cit	negativo		
16cit	positivo	negativo	Pap normal
17cit	positivo	positivo	HPV
17esp	positivo		
18cit	positivo	positivo	HPV+Displasia Cervical leve
18esp	negativo		
19esp	positivo	positivo	HPV+Displasia Cervical leve+cervicitis+lactobacillus
19cit	positivo		
20esp	positivo	positivo	Carcinoma de Células escamosas estadio 1 B1
20cit	positivo		
21esp	positivo	negativo	Pap normal
21cit	positivo		
22esp	positivo	positivo	Carcinoma de Células escamosas+ Displasia
22cit	positivo		
23esp	positivo	positivo	Pap II+HPV
23cit	positivo		

24esp	negativo	positivo	Displasia Cervical leve
24cit	negativo		
25esp	positivo	negativo	Cervicitis crónica por Lactobacillus
25cit	positivo		
26esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve+Condiloma viral
26cit	positivo		
27esp	negativo	negativo	Pap normal
27cit	negativo		
28esp	positivo	negativo	Pap normal
28cit	positivo		
29esp	positivo	negativo	Pap normal
29cit	positivo		
30esp	positivo	negativo	Pap normal
30cit	positivo		
31esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve
31cit	positivo		
32esp	positivo	positivo	Displasia Cervical leve
32cit	positivo		

\*Cot: muestra tomada con cotonete

\*Esp: muestra tomada con espátula de Ayre

\*Cit: muestra tomada con cepillo citológico "citobrush"

## Anexo 10. Análisis Ji cuadrado $X^2$

**Hipótesis Nula:** NO existen diferencias significativas entre los dos tipos de pruebas de detección del Papilomavirus humano

**Nivel de confianza:** 95%  
 $p < 0,05$

**Frecuencias Teóricas (ft):**

$$ft_1 = \frac{28 \times 21}{30} = 19.6$$

$$ft_3 = \frac{2 \times 21}{30} = 1.4$$

$$ft_2 = \frac{28 \times 9}{30} = 8.4$$

$$ft_4 = \frac{2 \times 9}{30} = 0.6$$

**Cálculo Ji cuadrado  $x^2$**

$$X^2 = \sum \frac{(fc - ft)^2}{ft}$$

$$X^2 = \sum \frac{(20-19.6)^2}{19.6} \cdot \frac{(1-1.4)^2}{1.4} \cdot \frac{(8-8.4)^2}{8.4} \cdot \frac{(1-0.6)^2}{0.6}$$

$$X^2 = \sum \frac{(0.4)^2}{19.6} \cdot \frac{(-0.4)^2}{1.4} \cdot \frac{(-0.4)^2}{8.4} \cdot \frac{(0.4)^2}{0.6}$$

$$X^2 = \sum (0.081)(0.114)(0.019)(0.266)$$

$$X^2 = 0.4081 \text{ R//}$$

**Grados de Libertad:**

$$gl = (f - 1) \times (c - 1)$$

$$gl = (2 - 1) \times (2 - 1) = 1$$

$$X^2 \text{ Tabla} = 3.841$$

$$gl = 1$$

$$p < 0.05$$

**Resultado Obtenido  $< X^2$  Tabla**  
**0,408  $<$  3,841**

**Conclusión:** Se acepta Hipótesis Nula. Existe relación entre los dos tipos de pruebas para la detección del HPV

**Calculo de la Sensibilidad y Especificidad de la Prueba:**

$$\begin{aligned} \text{Sensibilidad} &= 100 \cdot A / (A + C) \\ &= 100 \cdot (20 / 21) \\ &= 95,2380952\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Especificidad} &= 100 \cdot D / (D + B) \\ &= 100 \cdot (1 / 9) \\ &= 11,11111111\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Valor predictivo de una prueba positiva (VP+)} &= 100 \cdot A / (A + B) \\ &= 100 \cdot 20 / (20 + 8) \\ &= 71,4285714 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Valor predictivo de una prueba negativa (VP-)} &= 100 \cdot D / (D + C) \\ &= 100 \cdot 1 / (1 + 1) \\ &= 50 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Prevalencia Aparente (P.ap)} &= 100 \cdot (A + B) / N \\ &= 100 \cdot (20 + 8) / 30 \\ &= 93,3333333 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Prevalencia real (P.real)} &= 100 \cdot (A + C) / N \\ &= 100 \cdot (20 + 1) / 30 \\ &= 70 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Razón de Verisimilitud} &= \text{Sensibilidad} / (1 - \text{Especificidad}) \\ &= 0,95 / (1 - 0,11) \\ &= 1,07 \end{aligned}$$

**Razón de Verisimilitud (LR) > 1**

**Conclusión:** Prueba favorece a la detección de casos positivos (enfermos)