

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Estudio piloto de la incidencia de Papilomavirus en biopsias de cuello uterino
en el hospital SOLCA de Quito.

Diana Carolina Muñoz Sandoval

Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en
Procesos Biotecnológicos.

Quito

Mayo de 2012

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de Autor

Diana Carolina Muñoz Sandoval

2012

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres

y hermanos por todas sus

enseñanzas y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis profesores, especialmente a Sonia Zapata, María de Lourdes Torres y Gabriel Trueba por su guía durante mi carrera y la realización de este proyecto. A mi familia por brindarme su apoyo incondicional. A mis amigos y compañeros de laboratorio con quienes he compartido innumerables momentos y han sido un gran respaldo durante todo este tiempo.

Resumen

El Virus de Papiloma Humano (VPH) relacionado con la infección de epitelio comprende más de 50 genotipos ampliamente distribuidos a nivel mundial. La asociación entre la infección de VPH y el desarrollo de cáncer de cuello uterino se encuentra alrededor del 99%, y en un porcentaje importante con cáncer de vulva, vagina, pene y orofaringe. En este estudio se caracterizó los genotipos de VPH presentes en 63 biopsias de lesiones cervicales de alto grado tipo II y tipo III y lesiones cancerosas provenientes de pacientes que acudieron al servicio ginecológico de SOLCA núcleo Quito entre los meses de Octubre y Diciembre del 2012. Los resultados muestran que el 87% de las muestras estuvieron infectadas con VPH y los genotipos de mayor prevalencia fueron: VPH-58, 16 y 52, todos considerados de alto riesgo. Los datos obtenidos en este estudio difieren de algunos estudios que señalan a los genotipos 16 y 18 como los más prevalentes en cáncer cervical. Estos resultados sugieren que los genotipos asociados a cáncer en el Ecuador son diferentes, sin embargo un estudio con un número mayor de muestras es necesario para confirmar estos hallazgos. El aporte principal de esta investigación es la discrepancia encontrada de los genotipos asociados con cáncer en comparación con las estadísticas mundiales.

Abstract

There are more than 50 different genotypes of Human Papillomavirus (HPV) associated with mucous membrane infections worldwide and 99% of cervical cancer and a large proportion of, vulvar, penis, and oropharynx cancers are associated to HPV infection. This study characterized HPV genotypes found in 63 biopsies with high-grade squamous intraepithelial lesions and cancerous lesions from patients attending the gynecological service at SOLCA Hospital in Quito between October and December 2011. The results show that 87% of the samples were HPV positive and the most common genotypes were: HPV-58, 16 and 52, all of them considered as high risk types. The prevalence of these genotypes differed from most reports which indicate that genotypes 16 and 18 as the most commonly associated with cervical cancer. These results may indicate that Ecuador has different genotypes associated to cancer; however a larger number of samples will be necessary to confirm this finding. The main contribution of this research is to find a discrepancy in the genotypes associated to cancer in Ecuador when compared with those of the rest of the world.

Tabla de contenido

1.	Introducción.....	1
1.1	Generalidades del Virus de Papiloma Humano (VPH).....	1
1.1.1	Estructura.....	1
1.1.2	Clasificación.....	2
1.2	Biología del virus.....	4
1.2.1	Infección.....	4
1.2.2	Replicación.....	5
1.3	Integración Viral.....	7
1.4	Patogénesis.....	8
1.4.1	Rol del VPH en carcinogénesis.....	8
1.4.2	Manifestaciones patológicas.....	11
1.5	Epidemiología del VPH.....	13
1.6	Tratamiento y Prevención.....	15
1.6.1	Manejo de mujeres con diagnóstico histológico de NIC I precedido por ASCUS, ASCH o LSIL.....	16
1.6.2	Manejo de mujeres con diagnóstico con neoplasia intraepitelial cervical (NIC II, III).....	17
1.7	Diagnóstico.....	18
2.	Justificación.....	19
3.	Objetivos:.....	21
3.1	Objetivo General:.....	21
3.2	Objetivos específicos:.....	21
4.	Área de Estudio.....	21
5.	Materiales.....	22
5.1	Muestras.....	22
5.2	Extracción de ADN.....	22
5.3	Amplificación de ADN.....	22
5.4	Electroforesis de ADN.....	23
5.5	Análisis Estadístico.....	23
6.	Métodos.....	23
6.1	Recolección de muestras.....	23
6.2	Extracción de ADN.....	24
6.3	Control Positivo de ADN.....	25
6.4	Detección de papiloma virus.....	25

6.5	Genotipificación.....	25
6.6	Electroforesis de ADN.....	26
6.7	Análisis Estadístico.....	26
7.	Resultados.....	26
7.1	Recolección de muestras.....	26
7.2	Control positivo de ADN.....	26
7.3	Detección de VPH.....	27
7.4	Genotipificación de VPH.....	27
8.	Discusión.....	28
8.1	Genotipificación de VPH.....	28
8.2	Detección de VPH.....	31
9.	Conclusiones.....	33
10.	Recomendaciones.....	34
11.	Bibliografía.....	35
12.	Tablas.....	41
13.	Figuras.....	53
14.	Anexos.....	57

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1 Clasificación de los genotipos de papilomavirus en 5 supergrupos en base a su relación filogenética. Modificado de McCance, 2009.....	41
Tabla 2 Clasificación de los genotipos de papillomavirus de acuerdo al tropismo de su infección, oncogenicidad y enfermedades que causan. Modificado de Krämer, Kretzschma, & Krickberg, 2010.....	42
Tabla 3 Casos de cáncer atribuibles a infecciones por VPH en el año 2002 a nivel mundial en países desarrollados y en vías de desarrollo. Modificado de Parkin & Bray, 2006.....	42
Tabla 4 Frecuencias de los diferentes tipos de lesiones de cuello uterino encontrados en muestras colectadas en el Hospital Solca núcleo Quito de Octubre a Diciembre del año 2011.	43
Tabla 5 Porcentaje de casos VPH positivos por tipo de lesión presentes en muestras colectadas en el Hospital SOLCA núcleo Quito de Octubre a Diciembre del año 2011.	43
Tabla 6 Frecuencias de los resultados de la amplificación con los primers My09-My11 en las muestras de lesiones cervicales.....	44
Tabla 7 Frecuencias de los 18 genotipos analizados en las muestras colectadas, número de casos y porcentajes respectivos.	44
Tabla 8 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-16 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	45
Tabla 9 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-18 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	45
Tabla 10 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-31 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	45
Tabla 11 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH- 59 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	46
Tabla 12 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-45 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	46
Tabla 13 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-33 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	46
Tabla 14 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-6/11 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	47
Tabla 15 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-58 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	47
Tabla 16 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-52 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	47
Tabla 17 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-56 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	48
Tabla 18 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-35 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	48
Tabla 19 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-43 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	48
Tabla 20 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-44 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	49
Tabla 21 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-68 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	49

Tabla 22 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-39 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	49
Tabla 23 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-66 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.	50
Tabla 24 Frecuencias de los casos de coinfecciones en las muestras colectadas de acuerdo al número de genotipos presentes.	50
Tabla 25 Descripción de los genotipos presentes en coinfecciones y tipo de lesión en el que fueron encontrados.	50
Tabla 26 Resumen de los casos positivos para el genotipo de VPH-58 de acuerdo al tipo de lesión en el que se encontraron y su presencia en coinfecciones.	51
Tabla 27 Resumen de los casos positivos para el genotipo de VPH-16 de acuerdo al tipo de lesión en el que se encontraron y su presencia en coinfecciones.	51
Tabla 28 Resumen de los casos positivos para el genotipo de VPH-52 de acuerdo al tipo de lesión en el que se encontraron y su presencia en coinfecciones.	51
Tabla 29 Frecuencia de los genotipos detectados en muestras negativas para la amplificación del gen L1 del virus de papiloma humano.	52

Figura 1 Reconstrucción en 3D de una partícula viral de un papiloma virus humano a partir de microfotografía por microscopio crioelectrónico. Tomada de Murray <i>et al.</i> , 2009.	53
Figura 2 Disposición de los genes en el genoma del virus de papiloma humano, donde se distinguen los genes tempranos (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7) y los genes tardíos (L1 y L2). Tomada de Alonso & Lazcano, 2005.	53
Figura 3 Árbol filogenético de 118 tipos de papilomavirus. Los números son tipos de VPH, c-números a candidatos de tipos. Las abreviaciones indican papilomavirus de animales, BPV (bovine papilomavirus), COPV (canine oral papilomavirus), CRPV (cottontail rabbit papilomavirus), DPV (deer papilomavirus), EcPV (horse papilomavirus), EEPV (european elk papilomavirus), FcPV (chaffinch papilomavirus), FdPV (cat papilomavirus), HaOPV (hámster oral papilomavirus), MnPV (African rat papilomavirus), OvPV (ovine papilomavirus), PePV (African grey parrot papilomavirus), PsPV (porpoise papilomavirus), RPV (reindeer papilomavirus), ROPV (rabbit oral papilomavirus). Los géneros se encuentran señalados con semicírculos. Tomada de Hans-Ulrich, 2007.	54
Figura 4 Ilustración del proceso de infección por VPH en el cuello uterino desde la apariencia de un epitelio escamoso normal, su infección por el virus, desarrollo de neoplasias y posterior progreso a cáncer. Tomada de Murray <i>et al.</i> , 2009.	55
Figura 5 Organización del origen de replicación en VPH 11. Se representa la región desde el nucleótido 7500 al 100. La caja TATA representada es la que se encuentra dentro del promotor de E6, y Sp1 ejemplifica un lugar de unión de factores de transcripción. Tomada de Liu & Melendy, 2002.	55
Figura 6 Representación del ensamblaje y actividad helicasa de la proteína E1. La proteína E2 se une en forma de dímeros en sus sitios de unión, recluta a E1 que se ensambla en su sitio de unión como una complejo dihexamérico, los dos dímeros funcionan juntos como una helicasa bidireccional. Ante la presencia de una topoisomerasa I, RPA y ATP, se logra la separación en de la doble cadena en simples cadenas. Tomada de Chow & Broker, 2006.	55

Figura 7 Función de la proteína Retino blastoma (Rb) en el ciclo celular. En mitad de G1: Rb inhibe la actividad de E2F y detiene el ciclo celular. En G1 tardía: Rb fosforilada libera a E2F. Tomada de Berk & Lodish, 2005.....	56
Figura 8 Edad Promedio de la tasa de incidencia de cáncer cervical a nivel mundial, en el Ecuador se observa una edad estandarizada de incidencia menor a los 30 años. Tomada de WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010.	56

Índice de Anexos

Anexo 1 Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen β -actina	57
Anexo 2 Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa del gen L1, que codifica para la proteína mayor de la cápside.	57
Anexo 3 Condiciones para la PCR anidada, primera amplificación correspondiente a los genes E6/E7.	58
Anexo 4 Condiciones para la segunda amplificación de la PCR anidada, de los cuatro grupos (Coctel 1, 2, 3 y 4) por PCR múltiple.....	58
Anexo 5 Descripción de los primers utilizados, condiciones de amplificación y tamaño del fragmento amplificado de todas las PCRs realizadas.	59

1. Introducción

1.1 Generalidades del Virus de Papiloma Humano (VPH)

1.1.1 Estructura

Los virus de papiloma humano pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, las partículas virales de forma icosaédrica (72 capsómeros) miden aproximadamente 55nm de diámetro y no poseen envoltura, como se indica en la Figura 1 (Romero, 2007). Su genoma es de ADN bicatenario circular de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) y codifica entre 9 y 10 genes de acuerdo al tipo de virus, 7 u 8 de expresión temprana y 2 tardíos (Figura 2) (Murray *et al.*, 2009; McCance, 2009). Todos los genes están codificados en la cadena positiva y las regiones de control se encuentran en el extremo 5'. Los virus de papiloma se replican en epitelio escamoso, mucosa genital, oral y conjuntival (Murray *et al.*, 2009).

Los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7 codifican proteínas no estructurales que regulan las funciones virales (Alonso & Lazcano, 2005). El gen E1 es el regulador de la replicación y transcripción viral, codifica la proteína E1, que funciona como una ATPasa dependiente de ADN y como helicasa dependiente de ATP. E2 interviene en la repartición del ADN episomal durante la división celular. E4 codifica una proteína que se une e interrumpe la red de queratina del citoplasma, permitiendo la formación de coilocitos y se expresa mayormente en células diferenciadas. E5 codifica una pequeña proteína capaz de unirse a varias proteínas de membrana, como receptores de factores de crecimiento e interviene en la transformación celular. La proteína E6 se une a la proteína p53 del ciclo celular y la marca para su degradación, impidiendo que la replicación de ADN se detenga y por ende el ciclo celular. De

igual forma la proteína E7 inactiva a Rb impidiendo la proliferación celular, cuya función se describirá más adelante. En los dos casos el ciclo celular se detiene en la fase G1 y no pasa a la fase S (Murray *et al.*, 2009).

Por otro lado, los genes tardíos L1 y L2 codifican las proteínas estructurales, necesarias para el ensamblaje de las partículas víricas. L1 codifica la proteína mayor de la cápside y L2 la proteína menor (Robboy *et al.*, 2009).

La familia *Papillomaviridae* está conformada por diferentes tipos de virus, caracterizados por la divergencia en la secuencia del gen L1. Un genotipo difiere de otro cuando existe un mínimo de 10% de divergencia nucleotídica. Por otro lado, cuando la diferencia se encuentra entre el 2 y 10% se considera un subtipo de virus. En aislados independientes del mismo tipo de VPH que poseen una variación de alrededor del 2% se habla de una variante intratipo (Hans-Ulrich, 2007). Algunas variantes han evolucionado con determinados grupos poblacionales en regiones geográficas específicas (Hans-Ulrich, 2007). Adicionalmente, se ha encontrado diferentes variantes de un mismo tipo con propiedades biológicas y patogénicas diferentes, por ejemplo los variantes de VPH16 (Hans-Ulrich, 2007).

1.1.2 Clasificación

Existen más de 100 tipos de virus de papiloma. En base a la similitud de sus secuencias genómicas se los ha clasificado en 5 supergrupos: A, B, C, D y E (Tabla 1) (Murray *et al.*, 2009).

El grupo A incluye los tipos de virus que infectan el área genital, mientras que aquellos que se encuentran en lesiones de piel formando verrugas y displasias dérmicas en genitales, manos y pies pertenecen al grupo B. Es importante destacar que existe una alta especificidad del

virus-hospedador y los virus de interés en este estudio se sitúan en el supergrupo A (Romero, 2007). De todos estos tipos, más de 40 infectan epitelio y mucosa que reviste el tracto anogenital y otras áreas (Steben & Duarte-Franco, 2007). Es así que, también se los puede clasificar en base al tropismo que poseen hacia determinados tejidos, como se puede observar en la Tabla 2.

Una clasificación basada en el análisis de las secuencias de los distintos tipos de VPH indica que los tipos que infectan y producen lesiones en un mismo tipo de tejido pueden no estar relacionados filogenéticamente (Figura 3).

Dentro de los virus de papiloma humano que infectan el tracto genital se encuentran tipos de bajo y alto riesgo de progresión a cáncer, estos son:

Bajo riesgo: 6, 11, 42, 43, 44.

Alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 41, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 y 68 (Muñoz *et al.*, 2003).

Los tipos de bajo riesgo están relacionados con condiloma acuminado y lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) en muy pocas ocasiones se han encontrado en lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) o en carcinoma invasor. Por otro lado, los tipos de alto riesgo se encuentran en varios tipos de lesiones intraepiteliales e invasoras, en epitelio escamoso y glandular (Alonso & Lazcano, 2005).

1.2 *Biología del virus*

1.2.1 Infección

El receptor celular para la entrada del VPH no es conocido aún, sin embargo se ha podido observar que el sulfato de heparina facilita el anclaje del virus en algunos tipos celulares. (Laimins & Lee, 2007)

El virus infecta a las células basales a través de heridas en el epitelio estratificado, a continuación los viriones migran al núcleo y sus genomas se establecen allí como plásmidos extracromosomales (entre 20 a 100 copias por célula infectada). Los genes de expresión temprana estimulan la proliferación celular para ayudar a la replicación del virus. (Laimins & Lee, 2007)

En las células basales la replicación viral está limitada por E2, sin embargo a medida que las células avanzan hacia la superficie del epitelio maduran y durante esta maduración las proteínas E6 y E7 intervienen en el ciclo celular lo que permite la replicación viral y el ensamblaje de los viriones. La diferenciación celular marca el cambio de expresión de genes tempranos a genes tardíos con lo cual la replicación viral es promovida. (Robboy *et al.*, 2009)

Dado que únicamente en las capas superficiales se da la expresión de los genes tardíos y por tanto el ensamblaje de los viriones, las partículas virales se desprenden junto con las células muertas de estas capas superficiales (Figura 4) (Murray *et al.*, 2009).

1.2.2 Replicación

La replicación del VPH atraviesa tres etapas. Primero, el ADN se replica en la capa epidérmica basal y supra-basal del epitelio hasta generar entre 50 y 100 copias del virus por célula. Luego, una fase de mantenimiento donde el genoma viral se replica, acorde al ciclo de la célula hospedadora. Durante estas fases, el ADN viral se mantiene de forma episomal en el núcleo celular. Finalmente, junto con la diferenciación celular, se incrementa el número de copias del genoma viral y la expresión de genes tardíos para el ensamblaje de partículas virales (Liu & Melendy, 2002).

El origen de replicación del virus se encuentra dentro de la región reguladora (URR) o región grande de control (LCR) localizada en la región no codificante más grande del genoma del virus, y se sobrepone al promotor principal de E6, como se observa en la Figura 5 (Liu & Melendy, 2002). Para la replicación de la forma episomal del virus solo se requieren la expresión de los genes E1 y E2 y de la célula hospedadora se aprovechan factores como: la ADN polimerasa α , ADN polimerasa δ , PCNA (factor de procesividad de ADN pol), RFC (factor de colocación de PCNA), RPA (proteína de unión a cadena simple de ADN) y topoisomerasas I y II (Chow & Broker, 2006). Se ha observado que la expresión de E1 y E2 está regulada por el grado de diferenciación de las células del epitelio cervical (Liu & Melendy, 2002) y se sabe que la proteína de reconocimiento inicial del ori es E2 que es indispensable para reclutar a E1 (helicasa de ADN).

En la secuencia del origen de replicación se encuentra el sitio de unión de la proteína E1 (E1BS), y éste a su vez se encuentra flanqueado por varias copias del sitio de unión para la proteína E2 (E2BS) (Chow & Broker, 2006). E2BS es una secuencia palindrómica a la que se

une la proteína E2 formando dímeros (Chow & Broker, 2006). La secuencia de unión de la proteína E1 es palindrómica, rica en AT y altamente conservada, la unión de este elemento no es indispensable para la replicación de la mayoría de virus (Chow & Broker, 2006). De esta forma para muchos tipos de VPH, con excepción de VPH-1, solo se requiere la unión de E2 para la replicación. La mayoría de virus cuenta con cuatro copias de E2BS en la región URR y la replicación se ve incrementada con el número de proteínas E2 que se unan a E2BS (Liu & Melendy, 2002).

La expresión del gen E2, es regulada a niveles transcripcional y post-transcripcionales, los ARN mensajeros de E2 provienen de un transcrito primario policistrónico que puede ser originado a partir de uno o más promotores. La proteína E2 tiene tres dominios: amino terminal, carboxi terminal de dimerización y un sitio de unión al ADN (Chow & Broker, 2006).

La familia de proteínas E2 presenta un alto grado de polimorfismo, entre los diferentes tipos de virus, sin embargo guarda alta especificidad y afinidad por E2BS, a diferencia de E1 (Chow & Broker, 2006). Además, E2 regula la replicación, transcripción y persistencia del genoma viral en células basales del epitelio.

En la mayoría de papilomavirus el dominio amino de E2 interactúa con el dominio helicasa de E1. La replicación viral se inicia cuando la proteína E1 desenvuelve la doble cadena de ADN dejando al descubierto las secuencias *ori*, luego recluta a RPA (proteína de unión a simple cadena para estabilizar las cadenas), e interactúa con la polimerasa de ADN α , como se puede observar en la Figura 6 (Chow & Broker, 2006).

En algunos genotipos, como VPH-11 y VPH-16, la proteína E2 compite con E1 por la subunidad p70 de la polimerasa lo que permite desplazar a E2 del complejo de inicio de replicación y dar comienzo a este proceso (Chow & Broker, 2006).

1.3 Integración Viral

La integración del genoma viral se relaciona con un aumento en la expresión de los genes virales y el crecimiento celular, asociándose más frecuentemente con cáncer cervical que con neoplasias intraepiteliales cervicales (Lukaszuk, *et al.* 2003).

La integración del virus comúnmente fragmenta los marcos de lectura (orfs), de los genes E1 y E2 y da lugar a un aumento en la expresión de los genes E6 y E7 debido a la falta de supresión por parte del gen E2. Normalmente E2 se fragmenta en el extremo amino, sin afectar la zona “visagra”, que otorga flexibilidad a la proteína (Cheung *et al.*, 2006). La ruptura de gen E2 libera la inhibición del promotor viral que controla los oncogenes E6 y E7, de esta forma los genes virales integrados podrían activar oncogenes celulares o inactivar genes supresores de tumores celulares, de igual manera secuencias celulares podrían actuar sobre el promotor que controla la transcripción de E6 y E7 o estabilizar sus transcritos, lo que aumentaría su nivel de expresión y potencial oncogénico (Vinokurova *et al.*, 2008). En lesiones pre cancerosas y cáncer se ha encontrado que los lugares de integración se ubican en sitios de transcripción activa y de fragilidad cromosomal, aun cuando esto no parece ser el mecanismo esencial en la carcinogénesis (Vinokurova *et al.*, 2008).

Los genotipos 16 y 18 presentes en cáncer cervical, se encuentran integrados al genoma de la célula hospedadora en un alto porcentaje comparado con una baja frecuencia en lesiones pre cancerosas de alto grado y muy rara vez en lesiones tempranas (Vinokurova *et al.*, 2008).

Se piensa que la integración del genoma viral es una consecuencia de la inestabilidad cromosomal producida por la expresión de oncogenes virales en células del epitelio basal en replicación y no la causa de ello, por ejemplo los oncogenes de los genotipos 16, 18 y 45 pueden causar mayor inestabilidad que los genotipos 31 y 33. Adicionalmente, es importante tomar en cuenta que la integración no siempre está asociada con el desarrollo de cáncer (Vinokurova *et al.*, 2008).

1.4 Patogénesis

1.4.1 Rol del VPH en carcinogénesis

De manera general, el cáncer asociado a VPH tiene relación con la integración del virus, que causa la sobre expresión de los oncogenes E6 y E7 y la interrupción de genes celulares. Sin embargo, la transformación celular y el desarrollo de neoplasias pueden darse en ausencia de integración (Krämer, Kretschma, & Krickberg, 2010). Se estima que la relación del papilomavirus humano y el desarrollo de cáncer es mayor a 99,7% (Krämer, Kretschma, & Krickberg, 2010).

La expresión de los genes virales es inhibida en las células basales infectadas, de forma que el virus se mantiene en ellas sin replicarse, permitiendo la diferenciación celular y pérdida posterior de la capacidad de dividirse (Alonso & Lazcano, 2005). Los genotipos de alto riesgo

promueven la proliferación de keratinocitos e inducen la resistencia a los estímulos de diferenciación (Mahy & Marc, 2010).

Por otro lado, los genes E6 y E7 codifican proteínas que inactivan genes supresores de tumores y modulan la regulación del ciclo celular. E6 activa la subunidad catalítica de la telomerasa como un paso importante para la inmortalización celular. Las proteínas E6 y E7 inducen efectos en la inestabilidad cromosomal, mitosis y aneuploidías que contribuirán con el desarrollo de tumores. Las proteínas E6 y E7 de genotipos de bajo riesgo tienen menor afinidad por las proteínas celulares y bajo potencial de transformación celular (Mahy & Marc, 2010; Mok *et al.*, 2009). Aun cuando no se sabe con certeza los cambios en la expresión génica de la célula hospedadora se encontró que en infecciones con los genotipos 31 y 11, los genomas virales permanecieron de forma episomal, sin embargo 11 de los genes de respuesta a Interferón (IFN, proteína del sistema inmunitario) disminuyeron su expresión. De igual forma en un estudio donde se infectaron keratinocitos con retrovirus que portaban las secuencias de E6 y E7 del genotipo 16 se demostró una reducción en la expresión de estos genes. Por lo tanto, los cambios en la expresión génica podrían depender tanto del estado físico del genoma viral como del grado de diferenciación de los keratinocitos infectados, detectándose mayores cambios en células en proceso diferenciación que en aquellas en proliferación (Alazawi *et al.*, 2002).

Existen diferentes proteínas que controlan el ciclo celular, una de ellas es Rb, que inhibe la actividad de E2F deteniendo el ciclo en fase G1. De forma normal a medida que la célula recibe señales de mitógenos, Rb es fosforilada liberando a E2F permitiendo así que la célula entre en fase S, como se ilustra en la Figura 7 (Berk & Lodish, 2005). De igual forma, la

proteína p53 (supresora de tumores) incrementa su expresión cuando hay un daño en el ADN y detiene el ciclo celular en G1 hasta que se repare el daño, y en caso de no lograrse esta reparación, inhibe al gen bcl-2, que es un represor de la apoptosis (Maldonado, 2002).

La proteína E7 del virus inactiva y promueve la degradación de Rb en el proteosoma además interactúa con la ciclina A (involucrada en la fase S y transición de las fases G2 a M del ciclo celular) y p107 (proteína relacionada con Rb capaz de inhibir a E2F), lo que conduce a una falta de control en la proliferación celular. Asimismo, la proteína E6 se une a la proteína p53 propiciando su degradación con consecuencias similares a las producidas por la degradación de Rb en el ciclo celular (Alonso & Lazcano, 2005; Mok *et al.*, 2009).

La sobreexpresión de los genes E6 y E7 en lesiones de alto grado se puede deber a la pérdida del gen E2, que interviene en la regulación transcripcional de genes virales. De igual forma, en la mayoría de lesiones de alto grado el genoma viral está integrado desencadenando una expresión descontrolada de E6 y E7 y proliferación del virus (Alonso & Lazcano, 2005). Por el contrario, en las lesiones de bajo grado, las células presentan coilocitos, el genoma viral se mantiene de forma episomal y la proteína E2 está intacta (Alonso & Lazcano, 2005). Factores adicionales como predisposición genética y exposición a elementos mutágenos pueden contribuir al desarrollo de cáncer (Alonso & Lazcano, 2005).

A pesar del alto porcentaje de mujeres infectadas con VPH a nivel mundial, un pequeño grupo desarrollan una infección persistente que puede progresar a lesiones neoplásicas intraepiteliales cervicales (NIC) de diferente grado o cáncer (Ferenczy & Franco, 2002). Esta progresión depende tanto de las características genéticas e inmunitarias del hospedador como del genotipo viral causante de la infección (Wang & Hildesheim, 2003).

1.4.2 Manifestaciones patológicas

La mayoría de infecciones por VPH son asintomáticas y temporales, se estima que el 70% de infecciones nuevas se resuelven de forma espontánea en el transcurso de 1 año y 90% en el transcurso de 2 años. Sin embargo, en algunos casos la infección persiste, pasa por diferentes tipos de lesión y en un período de 12 a 15 años se desarrolla cáncer cervical (Steben & Duarte-Franco, 2007).

Se debe considerar que aún cuando un alto porcentaje de las infecciones nuevas de VPH se autoresuelven en un período de máximo 2 años, la persistencia de 2 a 3 años de la infección por el mismo genotipo de VPH puede dar lugar al desarrollo de lesiones de alto grado y posteriormente continuar su progreso hacia el desarrollo de cáncer (Steben & Duarte-Franco, 2007). Esta asociación es más fuerte en infecciones con genotipos de alto riesgo (Kjaer *et al.*, 2002).

En el cuello del útero pueden desarrollarse diferentes tipos de lesiones y tumores, descritos a continuación:

- a) Lesiones escamosas intraepiteliales (LEI).- Involucran la proliferación de células anormales, sin polaridad celular ni maduración del citoplasma, se clasifican de acuerdo a la proporción en que se encuentren estas células con respecto a células normales.
- b) Pólipos endocervicales.- Son tumores benignos formados por tejido conectivo.
- c) Neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC).- este tipo de neoplasias son causadas de forma general por la infección con genotipos de papiloma virus de alto riesgo. Se

presentan, principalmente en mujeres entre 20 y 30 años de edad. El desarrollo de cáncer a partir de una NIC tarda en promedio 12 años (Mitchell *et al.*, 2007).

Basado en la proporción de epitelio ocupado por células de tipo basal no diferenciadas las NICs se clasifican en:

NIC I.- Se caracteriza por la presencia de células superficiales atípicas y la maduración epitelial en las diferentes capas se mantiene (Mitchell *et al.*, 2007). Además existe hiperplasia del tejido, engrosamiento de las capas basales y parabasales, se observan coilocitos y células superficiales con alargamiento del núcleo y una zona perinuclear clara (Von Knebel & Wentzensen, 2007).

NIC II.- Caracterizada por la presencia de células atípicas en las capas superficial y basal así como disminución en la maduración del epitelio (Mitchell *et al.*, 2007). Las características nucleares atípicas son más notorias y las células inmaduras en división se ubican sobre la mitad del primer tercio del epitelio donde ya inicia la maduración celular (Von Knebel & Wentzensen, 2007).

NIC III.- Se define por la presencia de células atípicas en todas las capas celulares y no se observa maduración celular (Mitchell *et al.*, 2007). Se visualiza un reemplazo de células inmaduras en los dos tercios inferiores del epitelio (Von Knebel & Wentzensen, 2007).

- d) Carcinoma *in situ*.- Se observa crecimiento desmedido de células del epitelio escamoso estratificado, todo el epitelio se encuentra sustituido por células inmaduras con núcleo anormales (Von Knebel & Wentzensen, 2007).

- e) Carcinoma invasor.- Las células anormales se extienden más allá del cérvix (Mitchell *et al.*, 2007).

Para unificar la terminología de citología correspondiente a lesiones en cuello uterino usada hasta 1988, se creó la nomenclatura Bethesda en la cual una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG o LSIL en inglés) corresponde a una NIC I. Del 60 al 80% de este tipo de lesiones presentan regresión espontánea en aproximadamente 2 años, un 25% persisten, del 10 al 15% progresan a lesiones de alto grado y el 1% a cáncer (Alonso & Lazcano, 2005).

Asimismo, las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG o HSIL en inglés) involucran la proliferación de células parabasales atípicas, cuando la proliferación involucra a 2/3 del total de la zona epitelial corresponde a una NIC II, y si es total, excepto en la zona superficial, se trata de una NIC III (Sellors & Sankaranarayanan, 2003).

1.5 Epidemiología del VPH

Los datos mundiales indican una prevalencia de VPH (11,4%) en mujeres con citología normal (WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010). De igual forma, se ha encontrado el virus en diferentes mucosas como cérvix, vulva, vagina, ano y orofaringe de mujeres y hombres sobre todo en edades comprendidas entre los 20 y 30 años (Burchell *et al.*, 2006).

Se ha establecido que existe una relación importante entre el virus de papiloma humano (VPH) y diferentes tipos de cáncer, entre los que se encuentran cáncer de cuello uterino, pene, vagina,

boca, entre otros. El mayor número de casos de cáncer atribuibles a infecciones por VPH son los de cuello uterino (Tabla 3) (Parkin & Bray, 2006).

En Sudamérica, la incidencia del cáncer de cuello uterino se ubica en el segundo lugar y representa el 24,6% del total de casos. Además, como se puede observar en la Figura 8, la edad promedio para la incidencia es menor a 30 años en Ecuador, Colombia y Brasil y menor de 56.3 para Venezuela, Perú y Bolivia. De esta forma, constituye la segunda causa de muerte en mujeres de todo rango de edad y la primera en mujeres jóvenes (15 a 44 años) (WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010).

La distribución de los diferentes genotipos de VPH, puede variar de acuerdo a la situación geográfica y población, así como el tipo de lesión presente en el cuello uterino. De acuerdo a la OMS, los tres genotipos con mayor prevalencia a nivel mundial son 16, 51 y 31 en lesiones de bajo grado, 16, 31 y 58 en lesiones de alto grado y 16, 18 y 58 en casos de cáncer escamocelular. Es importante mencionar que existen discrepancias en cuanto a estos datos, como los publicados en el estudio de Schiffman *et al.* (2007) donde el genotipo 33 ocupa el tercer lugar y el 58 el quinto. Por otro lado, los datos de Sudamérica muestran que los genotipos 16, 11, 6 tienen una mayor prevalencia en lesiones de bajo grado, mientras que 16, 51 y 18 en lesiones de alto grado y los genotipos 16, 18 y 31 en casos de cáncer escamocelular (World Health Organization, 2007).

En lo que respecta al Ecuador, no se dispone de datos publicados por la OMS sobre la prevalencia e incidencia de VPH. Sin embargo, algunas investigaciones realizadas por diferentes grupos revelan diferentes hallazgos en los genotipos de alto riesgo más prevalentes. En un estudio realizado con cepillados cervicales en mujeres mayores a 18 años que asistían a

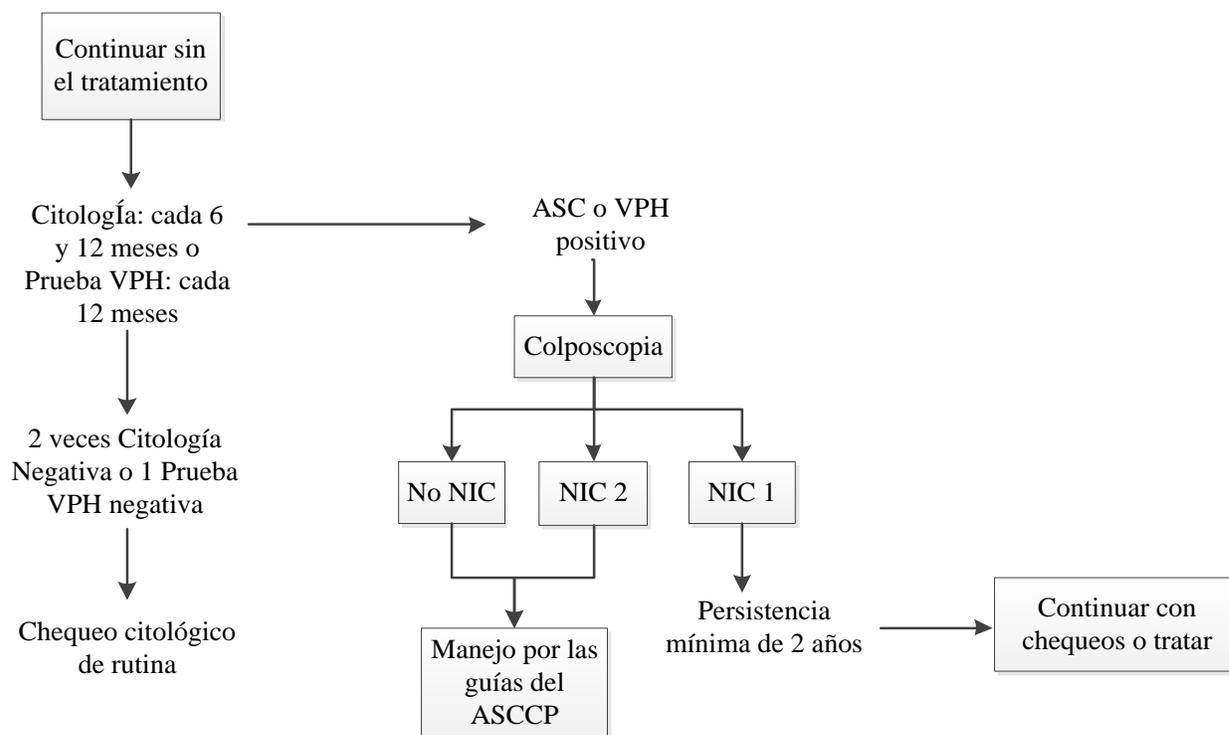
consulta en SOLCA de Santa Elena, los genotipos de alto riesgo de mayor prevalencia encontrados fueron 16, 52, 31, 39, 58 y 59, y de bajo riesgo 71 y 62 (Brown *et al.*, 2009). En otro estudio realizado por el Instituto de Colposcopia e Histeroscopia en Quito en muestras parafinadas con diagnóstico de cervicitis crónica, NIC I, II y III, se encontró que los genotipos con mayor frecuencia fueron 16, 81, 31, 53, 56 y 58, de los cuales el genotipo 16 era el más común en condiciones neoplásicas como no-neoplásicas (Tornesello *et al.*, 2008).

Por otro lado, en un estudio realizado en SOLCA Cuenca se encontró que los genotipos con mayor prevalencia en células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) a partir de muestras parafinadas fueron 16 (19.23%) y 52 (15.38%) seguidos con un porcentaje igual de los genotipos 43, 56 y 68 (11.54%) (Picón *et al.*, 2006). Asimismo en un estudio de lesiones anogenitales a partir de cepillados cervicales, biopsias y tejido parafinado se encontró que los genotipos más comunes fueron 6, 66, 16, 31 y 44 (González-Andrade & Sánchez, 2009).

En resumen, los datos ecuatorianos no guardan concordancia entre sí y se obtuvieron a partir de estudios realizados en poblaciones con diagnóstico definido que no muestran cifras reales de la prevalencia e incidencia de los genotipos circulantes en la población.

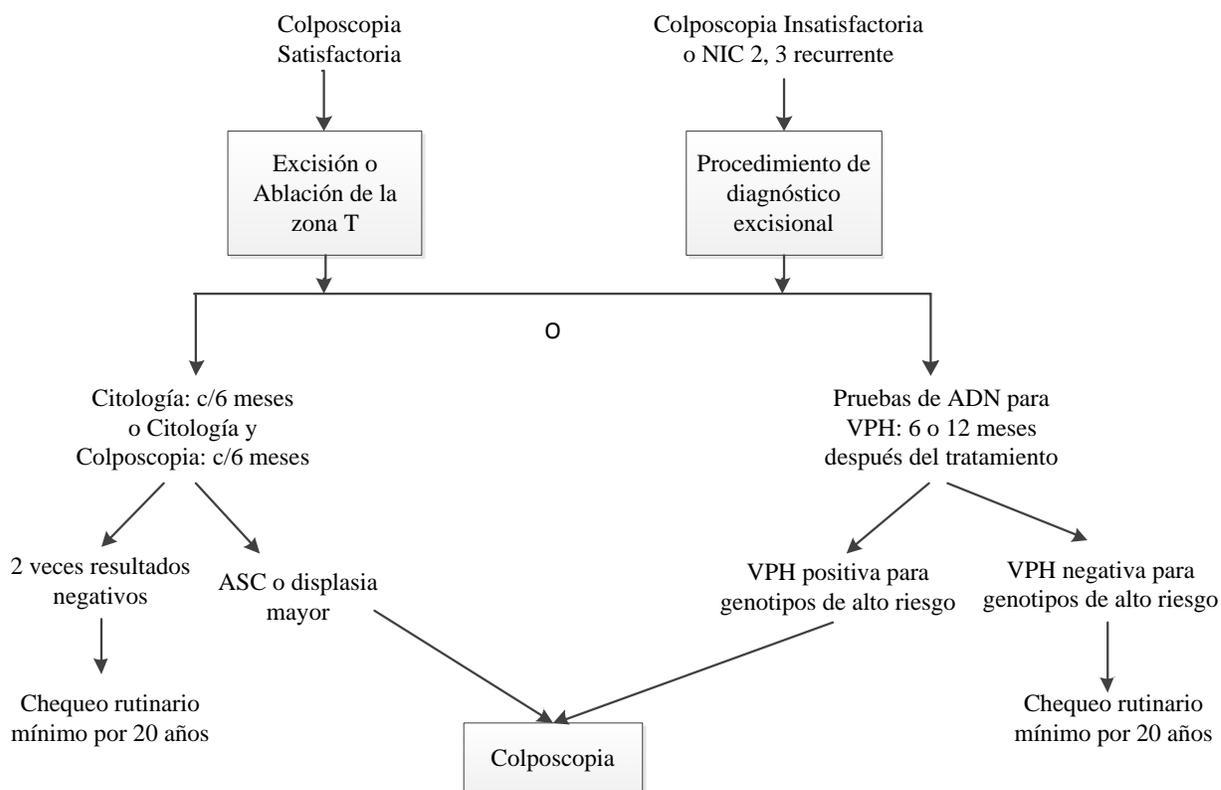
1.6 Tratamiento y Prevención

El tratamiento que se da a los diferentes tipos de lesiones se basa en diferentes guías publicadas a nivel internacional por la Sociedad para las Enfermedades del Tracto Genital Bajo (ASCCP). A continuación se muestran algunos de los algoritmos que sirven para determinar el procedimiento a seguir en cada caso.

1.6.1 Manejo de mujeres con diagnóstico histológico de NIC I precedido por ASCUS.ASCH o LSIL

(ASCCP, 2007)

1.6.2 Manejo de mujeres con diagnóstico con neoplasia intraepitelial cervical (NIC II, III)



(ASCCP, 2007)

El manejo en el hospital SOLCA Quito varía acorde a las condiciones de cada caso, pero se intenta mantener los esquemas aquí mostrados. En casos con diagnóstico de Carcinoma *in situ*, o invasor se remite a los pacientes al área de oncología para su tratamiento (Leopoldo Tinoco, comunicación personal, Octubre 14, 2011).

Por otro lado, el desarrollo de vacunas para prevenir las infecciones por VPH en el tracto genital ha sido difícil tanto por la gran cantidad de genotipos que existen como debido a que la inmunoglobulina A (IgA), es la principal línea de defensa en mucosas y su producción es inducida solo de manera temporal, por lo que sería necesario una administración repetida de la vacuna para mantener la inmunidad en un nivel efectivo (Institute, n. f.).

Actualmente, en el mercado existen dos vacunas, una de ellas es Gardasil® producida por Merck & Co., que protege contra la infección de los genotipos 16, 18, 6 y 11, y previene displasias cervicales de alto grado (NIC 2 y 3), lesiones displásicas vulvares de alto grado (VIN 2 y 3) y verrugas genitales (Bronchud *et al.*, 2008). La otra vacuna es Cervarix® de GlaxoSmithKleine, contra los genotipos 16 y 18. Tanto Gardasil® como Cervarix® requieren 3 dosis de aplicación en intervalos de 6 meses, y han sido aprobadas para su uso en mujeres y hombres entre 9 y 26 años (Institute, n. f.).

1.7 Diagnóstico

Para el diagnóstico de infecciones causadas por VPH existen algunas pruebas aprobadas por la F. D. A. (Food and Drug Administration) de Estados Unidos, entre éstas se encuentran:

- a) Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test: es una prueba del grupo QIAGEN para laboratorio aprobada en el 2003 y usada para mostrar la presencia de ADN de VPH en muestras de papanicolau. Utiliza sondas para varios tipos de VPH de alto riesgo y anticuerpos que reconocen estas sondas para determinar si la muestra es positiva o no para genotipos de alto riesgo de VPH (FDA, Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test - P890064 S009 A004, 2009).
- b) El ThinPrep® Pap Test: es una prueba de Cytoc Corporation de papanicolau líquido aprobada en el 2007 para VPH, *Chlamydia* y *Gonorrhoea* (Hologic, 2010).
- c) Cervista™ HPV 16/18: es una prueba de Third Wave Technologies aprobada en el 2009 que identifica los genotipos VPH-16 y VPH-18 en muestras cervicales. Requiere el aislamiento del ADN de un raspado cervical a partir del cual se reconocerá los

genotipos de VPH mediante sondas específicas (FDA, Cervista™ HPV 16/18 - P080015, 2009).

- d) COBAS AMPLICOR™ marca de Roche Diagnostics Corporation: es un kit para detectar 14 genotipos de VPH de alto riesgo junto con un control interno de β -globina. Esta prueba utiliza PCR para amplificar la secuencia blanco y posterior a esto usa hibridación para la detección de los genotipos (Roche, 2012).
- e) Linear Array ® HPV Genotyping Test: es una prueba de Roche capaz de detectar 37 genotipos de VPH de bajo y alto riesgo, utiliza PCR e hibridación para los 37 genotipos, aun no ha sido aprobada por la FDA (Roche Molecular Systems Inc, 2012).

En el presente trabajo se determinó la presencia de VPH y su genotipificación en biopsias de cuello uterino con lesiones intraepiteliales de alto grado y cáncer colectadas entre los meses de Octubre y Diciembre del 2011 en el hospital SOLCA Quito. Además se caracterizó los genotipos presentes en las muestras para analizar prevalencias de cada genotipo y se buscó posibles relaciones entre genotipos y lesiones cervicales.

2. Justificación

El cáncer cervical, uno de los más comunes en países en vías de desarrollo, constituye la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial (Berumen *et al.*, 2001; Chen, Desalle, Schiffman, Herrero, & Burk, 2009). El principal factor de riesgo del cáncer cervical y de lesiones precancerosas es la infección con tipos específicos de virus de papiloma humano (VPH) (Chen, Terai, Fu, Herrero, & Burk, 2005; Yamada *et al.*, 1995; Berumen *et al.*, 2001).

En el 2008, el cáncer de cuello uterino constituyó el 9% del total de los casos nuevos de cáncer y el 8% de del total de muertes por cáncer en mujeres, de éstos más del 85% de casos pertenecieron a países en vías de desarrollo. La elevada incidencia en estos países se debe principalmente a la falta de chequeos periódicos por parte de la población que permitan la detección de lesiones precancerosas y estadíos iniciales de cáncer cervical. Es así como la detección temprana del VPH en mujeres de una zona rural de la India, logró reducir al 50% el riesgo de desarrollar cáncer cervical y muerte (Jemal *et al.*, 2011).

A nivel mundial, la mayoría de los casos de cáncer cervical reportados están asociados con los genotipos VPH-16 y 18 (Chen, Desalle, Schiffman, Herrero, & Burk, 2009; Xi *et al.*, 2006; De Boer *et al.*, 2005; Monroya *et al.*, 2010; Pande *et al.*, 2008). Dada la importancia de esta enfermedad en la salud pública de nuestro país, es preciso realizar un estudio de prevalencia de la infección de VPH en la población ecuatoriana. Como punto de partida se plantea la realización de un estudio piloto de los genotipos presentes en biopsias de lesiones de alto grado y cáncer en mujeres que acuden al servicio de Colposcopia de SOLCA núcleo Quito. Los resultados de este estudio van a permitir establecer la relación entre la infección con determinados genotipos de VPH y el tipo de lesión encontrada ó cáncer cervical en la población de estudio. De esta manera, se podrá plantear los parámetros de un proyecto a largo plazo, así como inferir si la vacunación brinda una protección efectiva contra los genotipos circulantes en nuestro país.

3. Objetivos:

3.1 Objetivo General:

- Caracterizar el virus de papiloma humano en biopsias de lesiones cervicales de alto grado y cáncer en pacientes que se realizaron evaluaciones ginecológicas en el Consultorio N#3 de SOLCA núcleo Quito entre los meses de Octubre y Diciembre del año 2011.

3.2 Objetivos específicos:

- Detectar la infección de VPH a través de la amplificación del gen que codifica la proteína mayor de la cápside (L1) del virus.
- Identificar los genotipos presentes en muestras positivas y negativas para L1, basado en el polimorfismo de los genes E6-E7 de 18 genotipos.
- Determinar los genotipos de mayor prevalencia en las muestras analizadas.
- Realizar análisis estadísticos que permitan determinar la relación entre la infección con VPH y el tipo de lesión encontrada.

4. Área de Estudio

Las muestras de lesiones cervicales utilizadas para este estudio fueron tomadas en el Consultorio #3 de Colposcopia del hospital SOLCA Quito entre Octubre y Diciembre del año 2011. La extracción de ADN de las mismas, así como su análisis molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales), Cumbayá - Ecuador.

5. Materiales

5.1 Muestras

Basado en el resultado del examen citológico previamente realizado a las pacientes que acudían al consultorio de Colposcopia #3 del hospital SOLCA Quito, se tomaron muestras de tejido de lesiones de alto grado (NIC II y III) y cáncer de cuello uterino.

5.2 Extracción de ADN

- CTAB Merck®
- Etanol Merck®
- PBS (NaCl₂ Merck®, KCl Merck®, KH₂PO₄ Merck®, Na₂HPO₄ J. T. Barker®)
- Acetato de Sodio 3M(CH₃COONa Merck®)
- Buffer TE (Ultrapure™ EDTA Invitrogen, Ultrapure™ Tris Invitrogen)
- Cloroformo Reactivos H.V.O
- Alcohol isoamílico Merck®
- Baño María Shel LAB®
- Microcentrífuga Eppendorf®

5.3 Amplificación de ADN

- Go Taq Promega®
- Ultra Pure distilled water DNase, RNase free GIFCO®
- Primers My09-My11, GP-E6-3F, GP-E6-5B, GP-E6-6B, y específicos para los genotipos 16, 18, 31 59, 45, 33, 6/11, 56, 58, 52, 35, 42, 43, 44, 68, 39, 51 y 66
- Mastercycler gradient Eppendorf®

- PTC-100™ Programmable Thermal Controller MJ Research Inc.
- Termociclador T-Personal Combi Biometra ®

5.4 *Electroforesis de ADN*

- Agarosa Invitrogen®
- Trackit 100bp Invitrogen®
- Cámara de Electroforesis CBS® Electrophoresis System
- Fotocomentador Kodak® Electrophoresis documentation and analysis system (EDAS)

290

5.5 *Análisis Estadístico*

- Paquete estadístico SPSS ®

6. Métodos

6.1 Recolección de muestras

Previa a la realización del proyecto se contó con la aprobación del Departamento de Docencia de SOLCA núcleo de Quito y del Comité de Bioética de la USFQ para la realización de esta investigación (ver información suplementaria).

Las muestras fueron tomadas a partir de biopsias o conizaciones que se realizaba a las pacientes como parte del tamizaje de las citologías que se realizan. La selección de muestras se realizó basado en el resultado del papanicolau, incluyendo en el estudio únicamente las

muestras con diagnóstico presuntivo de NIC II y III, cáncer (CA) in situ y CA invasor (Tabla 4).

De las muestras seleccionadas, una parte de tejido de exocervix fue enviada al Laboratorio de Histopatología Anatómica de SOLCA para obtener el diagnóstico definitivo y la otra parte fue conservada en alcohol al 100% para realizar el estudio en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ.

6.2 *Extracción de ADN*

Para la extracción de ADN a partir del tejido se llevó a cabo un protocolo de dos días de duración. Durante el primer día se cortó y maceró el tejido, se lo lavó con 1mL de PBS 1X y centrifugó por 5min a 3000rpm. Después se descartó el PBS y se repitió el lavado con PBS con el objetivo de eliminar la sangre asociada a la muestra. A continuación se añadió 700µL de CTAB e incubó en baño maría a 65°C por 2 horas. Luego se adicionó 700µL de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 min a 13000rpm, para finalmente recuperar 700µL del sobrenadante que se colocaron en un microtubo nuevo junto con 700µL de etanol absoluto (100%) (a temperatura de hielo) y 50µL de acetato de sodio, esta mezcla se dejó a 4°C toda la noche.

En el segundo día se centrifugó por 10min a 13000rpm, luego de descartar el sobrenadante, se colocó 1000µL de etanol al 75% y se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó por 10min a 13000rpm, nuevamente se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar los residuos de alcohol a temperatura ambiente para finalmente resuspender el ADN extraído en 50µL de TE y almacenar a -20°C.

6.3 Control Positivo de ADN

Una amplificación de β -actina fue realizada en todas las muestras analizadas. El volumen final de reacción fue de 20 μ l bajo las condiciones presentadas en el Anexo 1.

6.4 Detección de papiloma virus

Para la detección del virus en las muestras, se utilizaron primers específicos MY-09/MY-11 que amplifican un fragmento de 450 pb del gen L1 que codifica para una de las proteínas de la cápside viral (Manos *et al.*, 1989). Todas las reacciones se ajustaron a un volumen final de 25 μ l, y las condiciones se indican en el Anexo 2.

6.5 Genotipificación

Para determinar el genotipo de VPH, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada múltiple (Sotlar *et al.*, 2004) en todas las muestras incluyendo las negativas para L1. El primer paso consistió en la amplificación de los genes E6 y E7 gracias a una combinación de tres sondas de secuencias consensuadas degenerativas (GP-E6-3F, GP-E6-5B y GP-E6-6B) que amplificaron un fragmento de 630pb. Luego se llevó a cabo una segunda amplificación con sondas específicas para 18 genotipos organizados en 4 PCRs múltiples o cocteles (Sotlar *et al.*, 2004) (Anexo 3 y 4). Coctel 1 detectó los genotipos VPH-16, 18, 31, 59 y 45, Coctel 2 genotipos VPH-33, 6/11, 56, 58 y 52, Coctel 3 genotipos VPH-35, 42, 43 y 44 y Coctel 4 genotipos VPH-68, 39, 51 y 66. De esta manera, se realizaron un total de 5 PCRs por cada muestra, las condiciones de cada reacción y amplificación se encuentran detalladas en el Anexo 5.

6.6 *Electroforesis de ADN*

Todos los productos de PCRs se corrieron en geles de agarosa al 2% que contenían 0.01% de bromuro de etidio, a 80V por 1 hora. Además, se utilizaron estándares de tamaño Invitrogen® de 100pb para determinar el tamaño de la banda de los productos amplificados.

6.7 *Análisis Estadístico*

Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS®. Se realizaron pruebas de frecuencias, tablas cruzadas y pruebas chi cuadrado.

7. Resultados

7.1 *Recolección de muestras*

De un total de 80 muestras colectadas, 17 presentaron cervicitis crónica o LIEAG NIC I confirmado por el diagnóstico histopatológico posterior que invalidó el diagnóstico citológico inicial, siendo el criterio considerado para la toma de muestras, por lo que no fueron incluidas en el análisis de los resultados aquí encontrados. Las 63 muestras restantes presentaron diagnóstico de NIC II, NIC III, cáncer in situ o cáncer invasor (Tabla 4). Adicionalmente, por solicitud del médico tratante y las pacientes se analizaron 4 muestras que correspondieron a: cáncer de vulva in situ (CAVU in situ), Neoplasia intraepitelial de vulva tipo I y II (VIN I y VIN II) y cáncer invasor de lengua.

7.2 *Control positivo de ADN*

Todas las muestras (84) dieron amplificación positiva para el gen de la β -actina.

7.3 *Detección de VPH*

De las 63 muestras incluidas en el estudio, 66.7% fueron positivas para la amplificación del gen L1 del VPH. Al analizar la presencia del virus por lesión se encontró que los porcentajes de muestras positivas por lesión fue para NIC II 69,2%, NIC III 87,5%, CA in situ 93,8% y CA invasor 100% (Tabla 5).

De las 21 muestras negativas para L1, posteriormente 61.9% fueron positivas para la prueba de genotipificación (Tabla 6), por lo que el total de muestras positivas para VPH fue de 87.3%.

Por otro lado, en las muestras excluidas del análisis presentado en este estudio 70.6% fueron positivas para la amplificación de L1, y 2 fueron positivas a la genotipificación.

7.4 *Genotipificación de VPH*

Los tres genotipos de mayor frecuencia fueron VPH-58 (48.8%), 16 (31.7%) y 52 (18.5%), como se puede ver en la Tabla 7.

La frecuencia de los genotipos encontrados con respecto al tipo de lesión se indica en las Tablas 8-23. En resumen se encontró que los genotipos 16, 52 y 58 están presentes en cáncer y NIC III. Los genotipos 6/11, 43, 68 y 66 están presentes en cáncer, NIC III y NIC II. Los genotipos 18, 33 y 44 están presentes únicamente en NIC III. El genotipo 31 presente en cáncer y NIC II. Los genotipos 59, 45 y 35 están presentes en cáncer in situ y los genotipos 56 y 39 están presentes en LIEAG (NIC II y NICIII).

El porcentaje de coinfección con 2 genotipos fue del 27,8 % y con 3 genotipos del 9.3% (Tabla 24). Todas las coinfecciones presentaron combinaciones únicas de genotipos, con la excepción de 2 casos (Tabla 25).

Además, los genotipos de mayor frecuencia VPH-58, VPH-16 y VPH-52 se encontraron junto a otros genotipos virales (coinfección) en el 45%, 38,5% y 37,5% de los casos respectivamente (Tablas 26, 27 y 28).

Finalmente, en las muestras negativas para la amplificación de L1 se encontraron los siguientes genotipos 16, 59, 58, 52, 52, 39 y 66 de alto riesgo y 6/11 y 43 de bajo riesgo (Tabla 29). Una sola muestra positiva para L1 no pudo ser genotipificada por el método utilizado, lo que indica que se trata de un genotipo diferente a los 18 analizados.

En cuanto a las muestras excluidas del análisis estadístico los genotipos más frecuentes fueron VPH-43 seguido de VPH-6/11 y VPH-66, pero también se encontraron genotipos 58, 56, 35, y 39. Asimismo, se encontraron coinfecciones con 2 genotipos (1 caso), 3 (2 casos) y 4 (1 caso).

8. Discusión

8.1 Genotipificación de VPH

Los resultados de la genotipificación de VPH en muestras del Hospital de SOLCA-Quito revelan que el genotipo más frecuente en lesiones cancerosas y precancerosas fue el 58, seguido del 16 y del 52, todos ellos considerados de alto riesgo. Estos datos discrepan con los datos publicados a nivel mundial mencionados anteriormente, así como los presentados por estudios previos realizados en Ecuador donde el genotipo de mayor prevalencia en distintos tipos de lesiones fue VPH-16 (Brown *et al.*, 2009; Picón *et al.*, 2006; Tornesello *et al.*, 2008).

A nivel mundial los genotipos 58 y 52 han sido menos asociados con carcinogénesis que los genotipos 16 y 18 (An *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2000; López-Revilla, Martínez-Contreras, & Sánchez-Garza, 2008). Sin embargo, reportes de Asia y el suroeste de África señalan que el genotipo 58 es uno de los más frecuentes junto con 16 y 45 (Li *et al.*, 2009; Clifford *et al.*, 2005; Clifford *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito a otros genotipos frecuentemente asociados a cáncer, por ejemplo el genotipo 31 en Europa, 33 en Centro y Sudamérica y 39, 51, 52, 59, 66 en América del Norte (Clifford *et al.*, 2005; Clifford *et al.*, 2003).

Por otro lado, de los 29 casos de monoinfecciones (un solo genotipo), 10 se encontraron en CA *in situ* y el 60% de casos correspondió al genotipo 58, 5 casos de CA invasor (2 casos de VPH genotipos 16 y 58). También se encontró infecciones únicas con genotipos de bajo riesgo, el genotipo VPH-6/11 en 3 casos de LIEAG NIC III y en un caso de LIEAG NIC II y para el genotipo VPH-43 un caso de LIEAG NIC III. La presencia de VPH-6/11 en una monoinfección en muestras con citología anormal ha sido reportada en otras ocasiones como en el estudio de Panotopoulou *et al.* (2007).

En cuanto a coinfecciones, se halló que un 37.1% de muestras contenía más de un genotipo de VPH, lo cual no conlleva mayor riesgo de cáncer (Giorgi Rossi *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2000). El método de genotipificación utilizado permitió encontrar coinfecciones de hasta 4 genotipos y se han reportado coinfecciones con hasta 6 genotipos en muestras con citología normal (Méndez *et al.*, 2005) y con 7 genotipos en una NIC I (Conesa-Zamora *et al.*, 2009).

Además, se encontró que las combinaciones de genotipos en las coinfecciones son muy diversas en la mayoría de casos, lo cual corrobora el estudio de Thomas *et al.* (2000), donde no existe una asociación predeterminada entre genotipos, ni mayor probabilidad de encontrar

juntos a ciertos genotipos que a otros. En un estudio a largo plazo en pacientes con citología normal realizado en Colombia se encontró que las coinfecciones se daban tanto con genotipos clasificados dentro del mismo grupo filogenético A7 (genotipos 18, 39, 45, 59, 68) y A9 (genotipos 16, 33, 35, 52, 58) (De Villiers *et al.*, 2004) como con genotipos perteneciente a diferentes grupos. Sin embargo, se encontró que existe una mayor tendencia en las coinfecciones con genotipos de VPH pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos (Méndez *et al.*, 2005), resultados similares a los hallados en este estudio. Además, de acuerdo a Méndez *et al.* (2005) ciertos genotipos podrían aumentar la probabilidad de infección con otro, por ejemplo una infección previa con genotipo 16 incrementó la probabilidad de una infección posterior con genotipo 58.

Al tener una alta prevalencia del genotipo 58 en nuestra población de estudio, se podría pensar que la vacunación reduciría la infección con el genotipo VPH-16 y por ende la posibilidad de una infección posterior por el genotipo VPH-58, mas no debido a una protección cruzada de la vacuna, ya que si se ha encontrado la existencia de protección cruzada parcial para los genotipos VPH-31 y 45 pero casi nula para VPH-33, 52 y 58 (Monie, Hung, Roden, & Wu, 2008).

En cuanto a los cuatro casos adicionales, la muestra con cáncer invasor de lengua fue positiva para los genotipos VPH-6/11 y 68. La asociación entre cáncer de lengua y VPH ya ha sido descrita por algunos estudios, principalmente asociado a los genotipos 16 y 18 (Shiboski, Schmidt, & Richard, 2005; Jemal *et al.*, 2011). Se considera que entre el 15 y 20% de cáncer en cabeza y cuello (entre los que se incluyen los de lengua) se encuentra asociado el virus de papiloma humano (WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010).

Asimismo en las lesiones de vulva 2 de las 3 muestras fueron positivas para VPH-16. Se estima que la prevalencia de VPH en cáncer de vulva es de 40.5% y de 76% en neoplasia intraepitelial de vulva (WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010).

Una limitante en este trabajo fue el número reducido de muestras (n=63) por lo que la determinación de Odds Ratio y riesgo relativo (asociación de un genotipo y tipo de lesión) no tuvieron significancia estadística ($p < 0.05$).

8.2 Detección de VPH

Se obtuvo un alto porcentaje (87.3%) de muestras infectadas con virus de papiloma humano. El análisis por tipo de lesión indica que el 96.2% de casos con cáncer y el 81.1% de lesiones de alto grado (LIEAG) fueron positivas para VPH. Las cifras encontradas son mayores a los datos reportados por la OMS, 70.9% en casos de cáncer y 51.1% en LIEAG (WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010).

Por otro lado, los resultados son comparables a los datos publicados en un estudio realizado en Costa Rica donde se encontró 88% en cáncer y 89% en LIEAG (Herrero *et al.*, 2000). Esta mayor concordancia con nuestro estudio puede deberse a que el estudio de Costa Rica fue realizado en una población rural, que en su mayoría no accede a chequeos ginecológicos periódicos ni a exámenes de detección de VPH, situación similar a la mayoría de pacientes que formaron parte de nuestra población de estudio.

El análisis de las muestras negativas para la amplificación del gen L1 del VPH indica que el 61,9% de estas muestras fue positivo para la prueba de genotipificación. Esto puede deberse a

la fragmentación del gen L1 durante la integración del virus dentro del genoma de las células hospedadoras (De Villiers, 1992; Shikova *et al.*, 2009). Otra explicación que justifica este hallazgo podría ser que existe una alta variación de las secuencias de L1 que dificulta el alineamiento de los primers My-09 y My-11 (Lee *et al.*, 2009). Adicionalmente, existen reportes que demuestran que la amplificación de L1 en determinados genotipos no es muy eficaz como en el caso del genotipo 59 (Qu *et al.*, 1997), y del genotipo 43 (Speich *et al.*, 2004). Dentro de las muestras negativas para L1 se encontraron tanto genotipos de alto riesgo (16, 59, 58, 52, 39 y 66) como de bajo riesgo (6/11 y 43), lo que confirma que existen factores adicionales a la integración viral que dificultan la amplificación del gen L1 y sería interesante profundizar el estudio a este nivel para identificar las variables que intervienen en la detección del VPH de alto y bajo riesgo.

Mediante este estudio se reafirma la importancia de llevar a cabo trabajos similares en nuestro medio, tanto para incrementar el conocimiento de la situación de diversas enfermedades como para su posible prevención y control. Los resultados expuestos en este trabajo como un alto porcentaje de muestras positivas para infección de VPH en lesiones intraepiteliales de alto grado y cáncer, mayor prevalencia de genotipo VPH-58 y un elevado porcentaje de coinfecciones permiten tener un punto de partida para emprender estudios a largo plazo cuyos resultados puedan ser empleados en el desarrollo de programas de salud acordes a nuestra realidad.

9. Conclusiones

En concordancia con la literatura, se encontró mayor prevalencia de genotipos de alto riesgo de papiloma virus en la población de estudio, en comparación con la presencia de genotipos de bajo riesgo. Los genotipos encontrados con mayor frecuencia en LIEAG NIC II, LIEAG NIC III, CA in situ y CA invasor fueron VPH-58, 16 y 52, todos pertenecientes al grupo de alto riesgo.

En la población de estudio se encontró un porcentaje de coinfecciones de genotipos de papiloma virus correspondiente al 37.1%, que abarca muestras con 2 y 3 genotipos diferentes en una misma lesión. Las combinaciones de genotipos presentes en coinfecciones no fueron únicas, es así como se encontraron 13 combinaciones diferentes con 2 genotipos y 5 con 3 genotipos.

La amplificación del gen L1, que codifica para la proteína mayor de la cápside viral, resultó ser eficiente en un 66.7% para la detección de VPH. Para incrementar la sensibilidad es necesario complementar con la búsqueda de otras regiones conservadas del virus, por ejemplo se pueden utilizar primers Gp5+/Gp6+ de una región del gen L1 o primers E6/E7 de una zona entre los dos oncogenes (Bartlett & Roulston, 2004).

Los resultados de este estudio apoyan la implementación del diagnóstico de VPH en el Ecuador como una medida de control y prevención del cáncer de cérvix y otros órganos junto a la vigilancia del paciente infectado. Además la importancia de un manejo adecuado de acuerdo a los lineamientos internacionales para cada caso por parte de los médicos tratantes.

En base a todo lo analizado, se puede concluir que la utilidad de una prueba de VPH para diagnóstico justifica su costo, al evitar tratamientos posteriores más costosos y el impacto social del cáncer en mujeres jóvenes.

10. Recomendaciones

Es necesario realizar un estudio prospectivo a largo plazo para tener datos reales de los genotipos circulantes en la población. Además, sería muy interesante realizar un estudio de variantes intratipo de los genotipos de mayor prevalencia (58, 16 y 52) encontrados en este trabajo.

De igual forma, sería útil analizar en todas las muestras, sobre todo en las negativas para la amplificación del gen L1, si el genoma viral se encuentra integrado en el de las células hospedadoras, para lo cual se debe trabajar en la estandarización de métodos de laboratorio. Al igual que la genotipificación de la muestra cuyo genotipo no corresponde a los 18 analizados.

Junto al estudio de características de los virus deberían estudiarse los determinantes del hospedador e incurrir en un estudio sobre las interacciones de éste y los genotipos virales, para entender otros factores involucrados en la persistencia del virus y su evolución hacia el desarrollo de cáncer.

11. Bibliografía

- Alazawi, W. *et al.* (2002). Changes in Cervical Keratinocyte Gene Expression Associated with Integration of Human Papillomavirus 16. *Cancer Research* 62, 6959-6965.
- Alonso, P., & Lazcano, E. (2005). *Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, Prevención y Control*. México: Editorial Médica Panamericana.
- An, H. *et al.* (2003). Correlation of Cervical Carcinoma and Precancerous Lesions with Human Papillomavirus (HPV) Genotypes Detected with the HPV DNA Chip Microarray Method. *Cancer* 97, 1672-1680.
- ASCCP. (2007). Algorithms for the guidelines for the Management of Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia or Adenocarcinoma in situ. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 11, 201-222.
- Bartlett, J., & Roulston, J. (2004). *Molecular Diagnosis of Cancer: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press.
- Berk, A., & Lodish, H. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Berumen, J. *et al.* (2001). Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study. *Journal of the National Cancer Institute* 93, 1325-1330
- Bronchud, M. *et al.* (2008). *Principles of Molecular Oncology*. New Jersey: Humana Press.
- Brown, C. *et al.* (2009). Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a private cancer screening control. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42, 629-636.
- Burchell, A. *et al.* (2006). Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 24, S3/52-S3/61.
- Chen, Z., Desalle, R., Schiffman, M., Herrero, R., & Burk, R. (2009). Evolutionary Dynamics of Variants Genomes of Human Papillomavirus Types 18, 45, and 97. *Journal of Virology* 83, 1442-1445.
- Chen, Z., Terai, M., Fu, L., Herrero, R., & Burk, R. (2005). Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 Lineages Based on Complete Genome Analyses. *Journal of Virology*, 79 7014-7023.

- Cheung, J. *et al.* (2006). Viral Load, E2 Gene Disruption Status, and Lineage of Human Papillomavirus Type 16 Infection in Cervical Neoplasia. *The Journal of Infectious Diseases* 194, 1706-1712.
- Chow, L., & Broker, T. (2006). Mechanisms and Regulation of Papillomavirus DNA Replication. En S. Campo, *Papillomavirus research: from natural history to vaccines and beyond* (págs. 53-72). Norfolk: Caister Academic Press.
- Clifford, G. *et al.* (2005). Human Papillomavirus Genotype Distribution in Low-Grade Cervical Lesions: Comparison by Geographic Region and with Cervical Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14, 1157-1164.
- Clifford, G. *et al.* (2003). Human Papillomaviruses Types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer* 88, 63-73.
- Conesa-Zamora, P. *et al.* (2009). Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. *BMC Infectious Diseases* 9, 124-130.
- De Boer, M. *et al.* (2005). Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *International Journal of Cancer* 114, 422-425.
- De Villiers, E. *et al.* (2004). Classification of Papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- De Villiers, E. M. (1992). Laboratory techniques in the investigation of human papillomavirus infection. *Genitourin Med*, 68, 50-54.
- FDA. (2009). *Cervista™ HPV 16/18 - P080015*. Recuperado el 30 de Enero de 2012, de FDA: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm134061.htm>
- FDA. (2009). *Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test - P890064 S009 A004*. Recuperado el 30 de Enero de 2012, de FDA: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm082556.htm>
- Ferenczy, A., & Franco, E. (2002). Persistent human papillomavirus infection and neoplasia. *Lancet Oncology* 3, 11-16.
- Giorgi Rossi, P. *et al.* (2011). Distribution of high and low risk HPV types by cytological status: a population based study from Italy. *Infectious Agents and Cancer* 6, 2-9.
- González-Andrade, F., & Sánchez, D. (2009). HPV genotyping in anogenital abnormal samples of Ecuadorian women. *Cancer Biomarkers* 5, 225-232.

- Hans-Ulrich, B. (2007). Phylogeny and Typing of Papillomaviruses. En R. y. Garcea, *The papillomaviruses* (págs. 29-45). New York: Springer.
- Herrero, R. *et al.* (2000). Population Based-Study of Human Papillomavirus infection and Cervical Neoplasia in Rural Costa Rica. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 464-474.
- Hologic. (2010). *FDA-approved*. Recuperado el 30 de Enero de 2012, de The ThinPrep Pap Test: http://www.thinprep.com/hcp/thinprep_difference/fda_approved.html
- IARC. (2010). *GLOBOCAN*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2011, de <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>
- Institute, N. C. (n. f.). *Human Papillomavirus (HPV) Vaccines*. Recuperado el 30 de Enero de 2012, de National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/prevention/HPV-vaccine>
- Instituto de Microbiología. Universidad San Francisco de Quito. (s.f.). Base de Datos.
- Jemal, A. *et al.* (2011). Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61, 69-90.
- Kjaer, S. *et al.* (2002). Type Specific Persistence Of High Risk Human Papillomavirus (Hpv) As Indicator Of HighGrade Cervical Squamous Intraepithelial Lesions In Young Women: Population BasedProspective Follow Up Study. *British Medical Journal* 325, 572-576.
- Krämer, A., Kretzschma, M., & Krickberg, K. (2010). *Modern Infectious Disease Epidemiology*. Londres: Springer.
- Laimins, L. & Lee, C. (2007). The Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomaviruses in Keratinocytes. En R. y. Garcea, *The papillomaviruses* (págs. 45-69). New York: Springer.
- Lee, S. *et al.* (2009). Validation of human papilloamviruses genotyping by signature DNA sequence analysis. *BMC Clinical Pathology* 9, 3-12.
- Li, Y. *et al.* (2009). Phylogeographic analysis of human papillomavirus 58. *Science in China Series C: Life Sciences* 52, 1164-1172.
- Liu, J. S., & Melendy, T. (2002). Human Papillomavirus DNA Replication. En D. McCance, *Human Papillomavirus* (págs. 53-70). Amsterdam: Elsevier.
- López-Revilla, R., Martínez-Contreras, L., & Sánchez-Garza, M. (28 de Febrero de 2008). *Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical*

intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Recuperado el 2 de Marzo de 2012, de Infectious Agents and Cancer: <http://www.infectagentscancer.com/content/3/1/3>

- Lukaszuk, K. *et al.* (2003). Human Papillomavirus Type 16 Status in Cervical Carcinoma Cell DNA Assayed by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 608-612.
- Mahy, B., & Marc, v. R. (2010). *Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology*. España: Elsevier.
- Maldonado, E. (2002). *Biología Molecular en Medicina*. México: Editorial Limusa.
- Manos, M. *et al.* (1989). Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7, 209-214.
- McCance, D. (2009). Papillomaviruses. En A. Zuckerman, J. Banatvala, & P. Griffiths, *Principles and practice of clinical virology* (págs. 807-822). Singapore: Wiley-Blackwell.
- Méndez, F. *et al.* (2005). Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types and Possible Implications for the prevention of Cervical Cancer by HPV Vaccines. *The Journal of Infectious Diseases* 192, 1158-1165.
- Mitchell, R. *et al.* (2007). *Compendio de Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional*. Madrid: Elsevier.
- Mok, S. *et al.* (2009). Molecular Basis of Gynecologic Diseases. En W. Coleman, & G. Tsongalis, *Molecular pathology: the molecular basis of human diseases* (págs. 465-485). Oxford: Elsevier.
- Monie, A., Hung, C. F., Roden, R., & Wu, T.-C. (2008). Cervarix™: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics: Targets & Therapy* 2, 107-113.
- Monroya, A. *et al.* (2010). Prevalence of human papillomavirus genotypes, and mucosal IgA anti-viral responses in women with cervical ectopy. *Journal of Clinical Virology* 47, 43-48.
- Muñoz, N. *et al.* (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine* 348, 518-527.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. Madrid: Elsevier.
- Pande, S. *et al.* (2008). Human Papillomavirus Type 16 Variant Analyses of E6, E7 and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North India. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1060-1066.

- Panotopoulou, E. *et al.* (2007). Prevalence of Human Papillomavirus Types 6, 11, 16, 18, 31, and 33 in a Cohort of Greek Women. *Journal of Medical Virology* 79, 1898-1905.
- Parkin, M., & Bray, F. (2006). Chapter 2: The Burden of HPV related Cancers. *Vaccine*, 24, S3/11-S3/25.
- Picón, G. *et al.* (2006). Detección del ADN del Virus del Papiloma Humano mediante PCR en pacientes con citología de ASC-US. Instituto del Cáncer SOLCA-Cuenca durante los años 2005-2006. *Revista Oncología* 16, 155-158.
- Qu, W. *et al.* (1997). PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1304-1310.
- Robboy, S. *et al.* (2009). *Pathology of the Female Reproductive Tract*. China: Churchill Livingstone ELSEVIER.
- Roche. (2012). *cobas 4800 HPV Test*. Recuperado el 31 de Enero de 2012, de sitio Web de Roche: http://www.roche.es/portal/roche-spain/cobas_HPV_test
- Roche Molecular Systems Inc. (2012). *LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test*. Recuperado el 31 de Enero de 2012, de Roche: <http://molecular.roche.com/assays/Pages/LINEARARRAYHPVGenotypingTest.aspx>
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Schiffman, M. *et al.* (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370, 890-907.
- Sellers, J. W., & Sankaranarayanan, R. (2003). *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual*. Lyon: IARC Press.
- Shiboski, C., Schmidt, B., & Richard, J. (2005). Tongue and Tonsil Carcinoma. *Cancer* 103, 1843-1849.
- Shikova, E. *et al.* (2009). *Detection And Typing of Human Papillomaviruses by PCR*. Recuperado el 2 de Marzo de 2012, de Biotechnol. & Biotechnol.: http://diagnosisp.com/dp/journals/view_pdf.php?journal_id=1&archive=0&issue_id=22&article_id=817
- Sotlar, K. *et al.* (2004). Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 3176-3184.
- Speich, N. *et al.* (2004). Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area. *Journal of Medical Microbiology* 53, 125-128.

- Steben, M., & Duarte-Franco, E. (2007). Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology* 107, S2-S5.
- Thomas, K. *et al.* (2000). Concurrent and Sequential Acquisition of Different Genital Human Papillomavirus Types. *The Journal of Infectious Diseases* 182, 1097-1102.
- Tinoco, L. (14 Octubre 2011). Comunicación personal.
- Tornesello, M. *et al.* (2008). A Pilot Study on the Distribution of Human Papillomavirus Genotypes and HPV-16 Variants in Cervical Neoplastic Lesions From Ecuadorian Women. *Journal of Medical Virology* 80, 1959-1965.
- Vinokurova, S. *et al.* (2008). Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Research* 68, 307-313.
- Von Knebel, M., & Wentzensen, N. (2007). *Disease Markers Human Papillomaviruses and Cervical Cancer* (Vol. 23). Amsterdam: IOS Press.
- Wang, S., & Hildesheim, A. (2003). Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *Journal of National Cancer Institute Monogr.* 2003, 35-40.
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer. (15 de Noviembre de 2010). *Human Papillomavirus and Related Cancers*. Recuperado el 28 de Noviembre de 2011, de HPV Information Centre: www.who.int/hpvcentre
- World Health Organization. (2007). *Data Query: WHO*. Recuperado el 30 de Noviembre de 2011, de sitio Web de WHO: <http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/DataQuerySelect.cfm>
- Xi, L. *et al.* (2006). Human Papillomavirus Type 16 and 18 Variants: Race-Related Distribution and Persistence. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 1045-1052.
- Yamada, T. *et al.* (1995). Human Papillomavirus type 16 lineages in the United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, L1 coding segments. *Journal of Virology* 69, 7743-7753.

12.Tablas

Tabla 1 Clasificación de los genotipos de papilomavirus en 5 supergrupos en base a su relación filogenética. Modificado de McCance, 2009.

Supergrupos																
Grupo A											B		C		D	E
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	1	2	1	1
32	3	61	2a	26	30	18	7	16	6b	34	5	4	B1	E1	B3	1a
42	10		27	51	53	45	40	31	11		8	48	B2	D1	B4	41
	28		57	69	56	39	43	33	13		9	50			B6	63
	29				66	59		35	44		12	60				Co
						68		52	55		14	65				Ro
						70		58	P1		d					Cr
								67			15					
								R1			17					
											19					
											20					
											21					
											22					
											23					
											24					
											25					
											36					
											37					
											38					
											47					
											49					

Tabla 2 Clasificación de los genotipos de papillomavirus de acuerdo al tropismo de su infección, oncogenicidad y enfermedades que causan. Modificado de Krämer, Kretzschma, & Krickberg, 2010.

Género	Tejido de tropismo	Tipos de VPH		Enfermedades
Alfa	Mucoso y cutáneo	Alto riesgo oncogénico	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82	Intraepiteliales: neoplasia cervical, cáncer anogenital y cáncer de cabeza y cuello
		Bajo riesgo oncogénico	6, 11, 42, 44, 51, 53, 83	Condilomatosis: acuminata, neoplasia intraepitelial, lesiones mucosas
		32, 42		Lesiones benignas (genitales y orales)
		3, 10, 28, 29, 78		Lesiones cutáneas más frecuentes que mucosas
		61, 72, 81, 83, 84, 62, 86, 87, 89		Lesiones benignas de mucosas
		2, 27, 57		Verrugas cutáneas comunes
		13, 26, 30, 34, 54, 71, 74, 53, 67, 69, 70, 85, 90, PcPV		Lesión de mucosas
		7, 40, 43, 91		Lesiones de mucosas y cutáneas
Beta	Cutáneo	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 36, 37, 38, 47, 80, 49, 75, 76		Asociado con epidermodisplasia verruciformis
Gamma	Cutáneo	4, 48, 50, 60, 65		Lesión cutánea
Mu	Cutáneo	1		Verruga plantar
Nu	Cutáneo	63		Verruga plantar

Tabla 3 Casos de cáncer atribuibles a infecciones por VPH en el año 2002 a nivel mundial en países desarrollados y en vías de desarrollo. Modificado de Parkin & Bray, 2006.

Sitio	Porcentaje atribuible a VPH	Países desarrollados			Países en vías de desarrollo		
		Cánceres totales	Atribuibles a VPH	Porcentaje respecto a todo cáncer	Cánceres totales	Atribuibles a VPH	Porcentaje respecto a todo cáncer
Cérvix	100	83400	83400	1.7	409400	409400	7.0
Pene	40	5200	2100	0.0	21100	8400	0.1
Vulva, vagina	40	18300	7300	0.1	21700	8700	0.1
Ano	90	14500	13100	0.3	15900	14300	0.2
Boca	3	91200	2700	0.1	183100	5500	0.1
Orofaringe	12	24400	2900	0.1	27700	3300	0.1
Total		5016100	111500	2.2	5827500	449600	7.7

Tabla 4 Frecuencias de los diferentes tipos de lesiones de cuello uterino encontrados en muestras colectadas en el Hospital Solca núcleo Quito de Octubre a Diciembre del año 2011.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulativo
CA in situ	16	19.3	19.3	19.3
CA invasor	10	12.0	12.0	31.3
CAVU in situ	1	1.2	1.2	32.5
CC	5	6.0	6.0	38.6
LIEAG NIC II	13	15.7	15.7	54.2
LIEAG NIC III	24	28.9	28.9	83.1
LIEBG NIC I	12	14.5	14.5	97.6
VIN I	1	1.2	1.2	98.8
VIN II	1	1.2	1.2	100.0
Total	83	100.0	100.0	

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical, VIN: Neoplasia intraepitelial de vulva.

Tabla 5 Porcentaje de casos VPH positivos por tipo de lesión presentes en muestras colectadas en el Hospital SOLCA núcleo Quito de Octubre a Diciembre del año 2011.

Tipo de Lesión	Número de Casos	VPH Positivos	Porcentaje
LIEAG NIC II	13	9	69.23%
LIEAG NIC III	24	21	87.50%
CA in situ	16	15	93.75%
CA invasor	10	10	100.00%
Total	63	55	87.3%

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 6 Frecuencias de los resultados de la amplificación con los primers My09-My11 en las muestras de lesiones cervicales.

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
My negativo, Genotipo detectado	13	20.6	20.6	20.6
My positivo, Genotipo detectado	41	65.1	65.1	85.7
My positivo, Genotipo no detectado	1	1.6	1.6	87.3
My negativo, Genotipo no detectado	8	12.7	12.7	100.0
Total	63	100.0	100.0	

Tabla 7 Frecuencias de los 18 genotipos analizados en las muestras colectadas, número de casos y porcentajes respectivos.

Genotipo	Casos	Porcentaje
16	13	31.71%
18	2	4.88%
31	4	9.76%
59	2	4.88%
45	1	2.44%
33	1	2.44%
6/11	7	17.07%
58	20	48.78%
52	8	19.51%
56	1	2.44%
35	1	2.44%
42	0	0.00%
43	6	14.63%
44	1	2.44%
68	5	12.20%
39	2	4.88%
51	0	0.00%
66	5	12.20%
Total	79	

Tabla 8 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-16 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G16		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	13	3	16
	CA invasor	6	4	10
	LIEAG NIC II	11	2	13
	LIEAG NIC III	20	4	24
Total		50	13	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 9 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-18 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G18		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	16	0	16
	CA invasor	10	0	10
	LIEAG NIC II	13	0	13
	LIEAG NIC III	22	2	24
Total		61	2	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 10 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-31 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G31		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	14	2	16
	CA invasor	9	1	10
	LIEAG NIC II	12	1	13
	LIEAG NIC III	24	0	24
Total		59	4	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 11 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH- 59 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G59		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	14	2	16
	CA invasor	10	0	10
	LIEAG NIC II	13	0	13
	LIEAG NIC III	24	0	24
Total		61	2	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 12 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-45 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G45		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	15	1	16
	CA invasor	10	0	10
	LIEAG NIC II	13	0	13
	LIEAG NIC III	24	0	24
Total		62	1	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 13 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-33 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G33		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	16	0	16
	CA invasor	10	0	10
	LIEAG NIC II	13	0	13
	LIEAG NIC III	23	1	24
Total		62	1	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 14 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-6/11 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G6_11		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	16	0	16
	CA invasor	9	1	10
	LIEAG NIC II	10	3	13
	LIEAG NIC III	21	3	24
Total		56	7	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 15 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-58 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G58		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	8	8	16
	CA invasor	7	3	10
	LIEAG NIC II	12	1	13
	LIEAG NIC III	16	8	24
Total		43	20	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 16 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-52 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G52		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	14	2	16
	CA invasor	9	1	10
	LIEAG NIC II	12	1	13
	LIEAG NIC III	20	4	24
Total		55	8	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 17 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-56 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G56		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	16	0	16
	CA invasor	10	0	10
	LIEAG NIC II	12	1	13
	LIEAG NIC III	24	0	24
Total		62	1	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 18 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-35 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G35		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	15	1	16
	CA invasor	10	0	10
	LIEAG NIC II	13	0	13
	LIEAG NIC III	24	0	24
Total		62	1	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 19 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-43 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G43		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	15	1	16
	CA invasor	9	1	10
	LIEAG NIC II	11	2	13
	LIEAG NIC III	22	2	24
Total		57	6	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 20 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-44 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G44		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	16	0	16
	CA invasor	10	0	10
	LIEAG NIC II	13	0	13
	LIEAG NIC III	23	1	24
Total		62	1	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 21 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-68 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G68		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	15	1	16
	CA invasor	9	1	10
	LIEAG NIC II	12	1	13
	LIEAG NIC III	22	2	24
Total		58	5	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 22 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-39 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G39		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	16	0	16
	CA invasor	10	0	10
	LIEAG NIC II	12	1	13
	LIEAG NIC III	23	1	24
Total		61	2	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 23 Distribución de los casos positivos para el genotipo de VPH-66 en los diferentes tipos de lesiones estudiadas.

		G66		Total
		negativo	positivo	
LESIÓN	CA in situ	15	1	16
	CA invasor	8	2	10
	LIEAG NIC II	12	1	13
	LIEAG NIC III	23	1	24
Total		58	5	63

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 24 Frecuencias de los casos de coinfecciones en las muestras colectadas de acuerdo al número de genotipos presentes.

Infeción	Número de casos	Porcentaje
1 Genotipo	34	62.96%
2 Genotipos	15	27.78%
3 Genotipos	5	9.26%
Total	54	100.00%

Tabla 25 Descripción de los genotipos presentes en coinfecciones y tipo de lesión en el que fueron encontrados.

Coinfecciones con 2 genotipos			Coinfecciones con 3 genotipos		
Tipo de Lesión	Genotipos detectados	Número de Casos	Tipo de Lesión	Genotipos detectados	Número de Casos
LIEAG NIC III	58, 43	1	LIEAG NIC II	6/11, 52, 43	1
LIEAG NIC III	16, 39	1	LIEAG NIC III	18, 44, 68	1
CA in situ	16, 59	1	CA in situ	68, 58, 31	1
CA invasor	16, 58	1	CA in situ	31, 45, 68	1
LIEAG NIC III	58, 52	2	CA invasor	31, 43, 66	1
LIEAG NIC III	16, 56	1			
CA in situ	59, 35	1			
CA invasor	68, 66	1			
LIEAG NIC III	58, 66	1			
LIEAG NIC III	18, 58	1			
CA invasor	16, 6/11	1			
LIEAG NIC III	6/11, 58	1			
NIC III, CA in situ	43, 66	2			
	Total	15	Total		5

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 26 Resumen de los casos positivos para el genotipo de VPH-58 de acuerdo al tipo de lesión en el que se encontraron y su presencia en coinfecciones.

Tipo de lesión	Número de casos	Número de coinfecciones
NIC II	1	1
NIC III	8	5
CA in situ	8	2
CA invasor	3	1
Total	20	9

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 27 Resumen de los casos positivos para el genotipo de VPH-16 de acuerdo al tipo de lesión en el que se encontraron y su presencia en coinfecciones.

Tipo de lesión	Número de casos	Número de coinfecciones
NIC II	2	1
NIC III	4	1
CA invasor	4	2
CA in situ	3	1
Total	13	5

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 28 Resumen de los casos positivos para el genotipo de VPH-52 de acuerdo al tipo de lesión en el que se encontraron y su presencia en coinfecciones.

Tipo de lesión	Número de casos	Número de coinfecciones
NIC II	1	1
NIC III	4	2
CA in situ	2	0
CA invasor	1	0
Total	8	3

CA: cáncer, CC: cervicitis crónica, LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado, NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 29 Frecuencia de los genotipos detectados en muestras negativas para la amplificación del gen L1 del virus de papiloma humano.

Genotipo identificado	Número de casos
16	2
59	1
6/11	2
58	5
52	3
43	2
39	1
66	1

13.Figuras

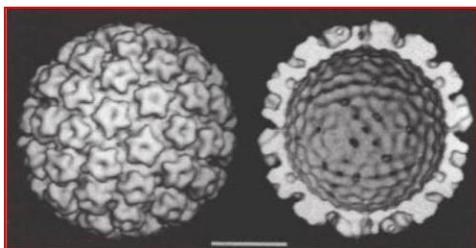


Figura 1 Reconstrucción en 3D de una partícula viral de un papiloma virus humano a partir de microfotografía por microscopio crioelectrónico. Tomada de Murray *et al.*, 2009.

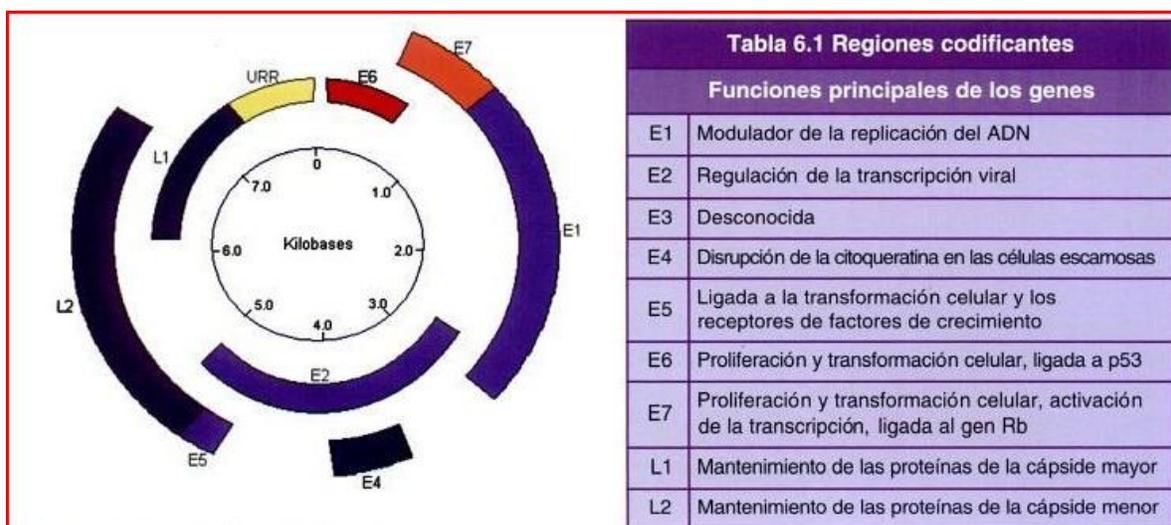


Figura 2 Disposición de los genes en el genoma del virus de papiloma humano, donde se distinguen los genes tempranos (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7) y los genes tardíos (L1 y L2). Tomada de Alonso & Lazcano, 2005.

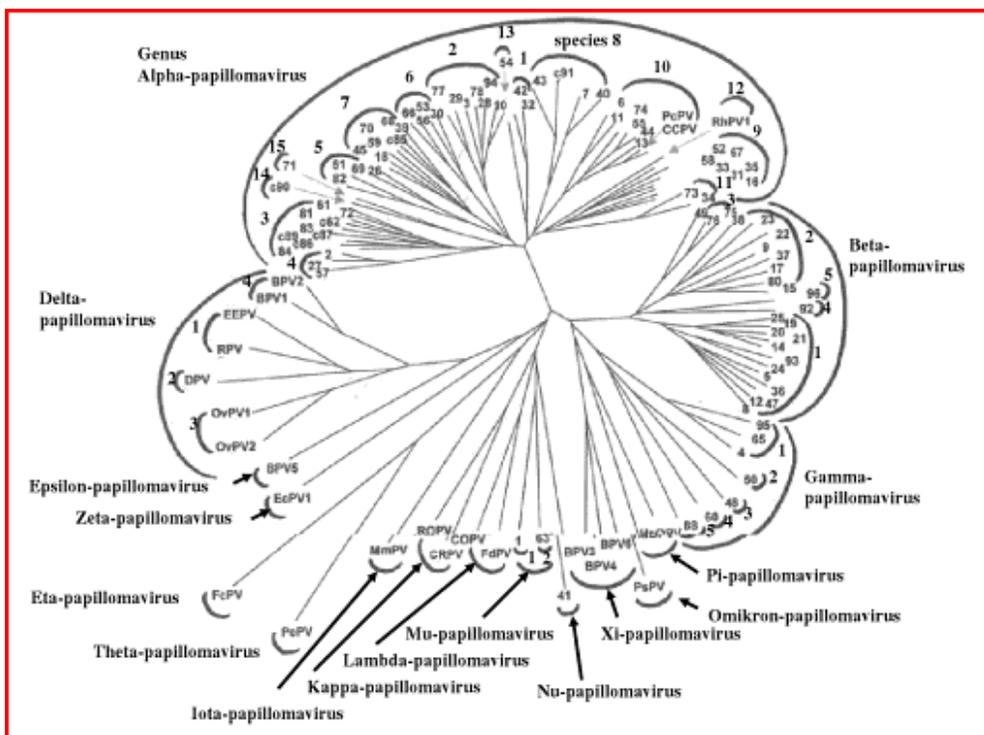


Figura 3 Árbol filogenético de 118 tipos de papilomavirus. Los números son tipos de VPH, c-números a candidatos de tipos. Las abreviaciones indican papilomavirus de animales, BPV (bovine papilomavirus), COPV (canine oral papilomavirus), CRPV (cottontail rabbit papilomavirus), DPV (deer papilomavirus), EcPV (horse papilomavirus), EEPV (european elk papilomavirus), FcPV (chaffinch papilomavirus), FdPV (cat papilomavirus), HaOPV (hámster oral papilomavirus), MnPV (African rat papilomavirus), OvPV (ovine papilomavirus), PePV (African grey parrot papilomavirus), PsPV (porpoise papilomavirus), RPV (reindeer papilomavirus), ROPV (rabbit oral papilomavirus). Los géneros se encuentran señalados con semicírculos. Tomada de Hans-Ulrich, 2007.

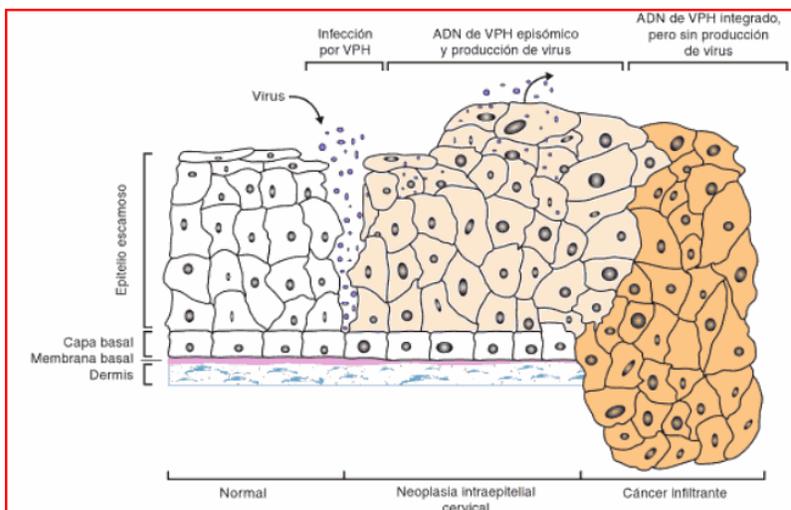


Figura 4 Ilustración del proceso de infección por VPH en el cuello uterino desde la aparición de un epitelio escamoso normal, su infección por el virus, desarrollo de neoplasias y posterior progreso a cáncer. Tomada de Murray *et al.*, 2009.

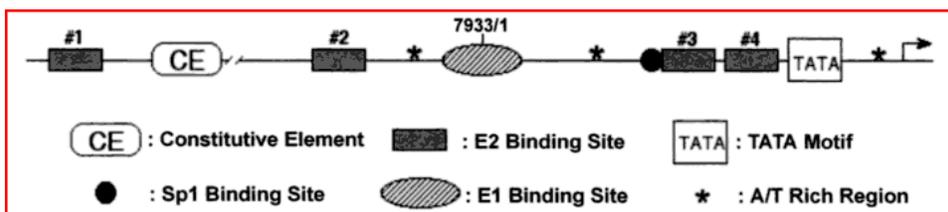


Figura 5 Organización del origen de replicación en VPH 11. Se representa la región desde el nucleótido 7500 al 100. La caja TATA representada es la que se encuentra dentro del promotor de E6, y Sp1 ejemplifica un lugar de unión de factores de transcripción. Tomada de Liu & Melendy, 2002.

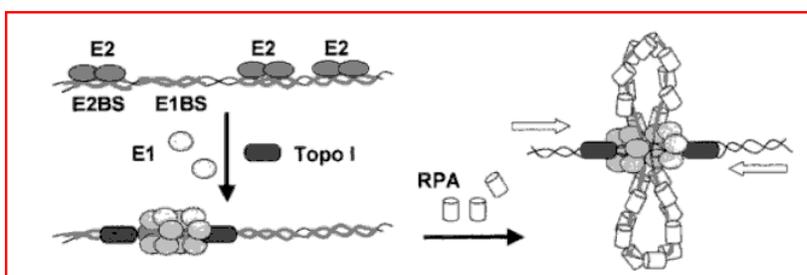


Figura 6 Representación del ensamblaje y actividad helicasa de la proteína E1. La proteína E2 se une en forma de dímeros en sus sitios de unión, recluta a E1 que se ensambla en su sitio de unión como un complejo dihexamérico, los dos dímeros funcionan juntos como una helicasa bidireccional. Ante la presencia de una topoisomerasa I, RPA y ATP, se logra la separación de la doble cadena en simples cadenas. Tomada de Chow & Broker, 2006.

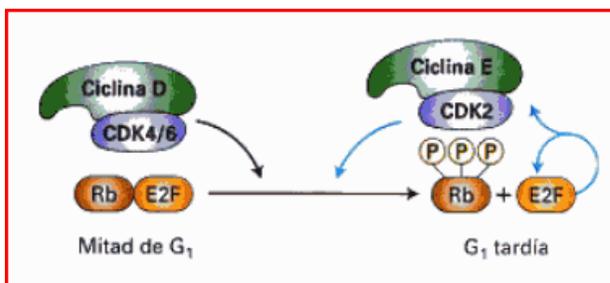


Figura 7 Función de la proteína Retino blastoma (Rb) en el ciclo celular. En mitad de G₁: Rb inhibe la actividad de E2F y detiene el ciclo celular. En G₁ tardía: Rb fosforilada libera a E2F. Tomada de Berk & Lodish, 2005.

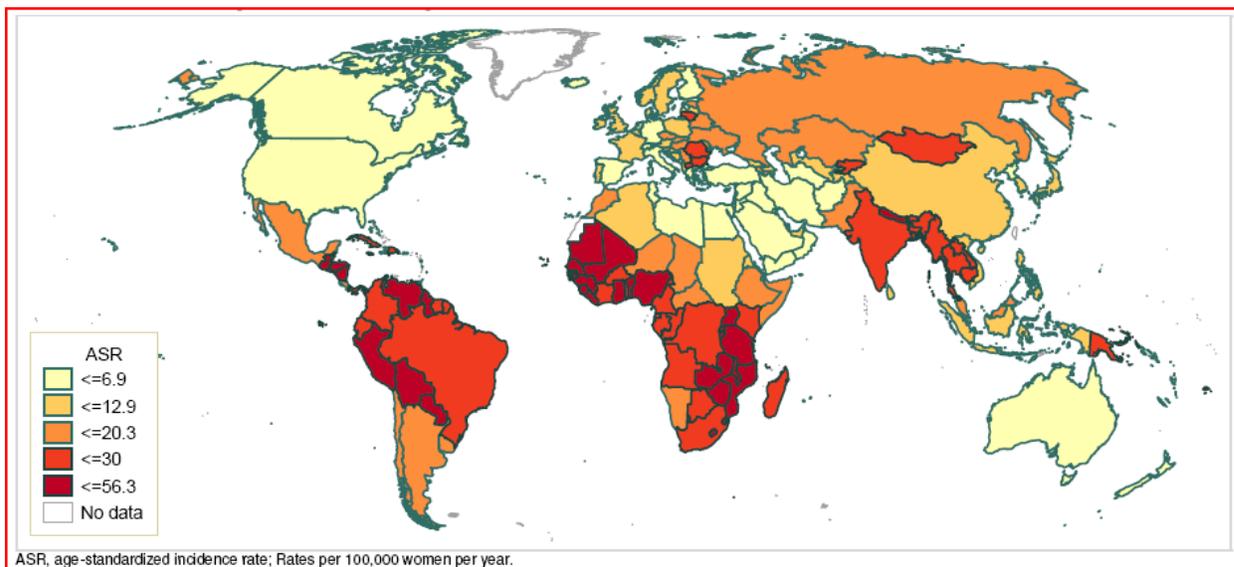


Figura 8 Edad Promedio de la tasa de incidencia de cáncer cervical a nivel mundial, en el Ecuador se observa una edad estandarizada de incidencia menor a los 30 años. Tomada de WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010.

14. Anexos

Anexo 1 Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen β -actina.

	Concentración en stock	Unidades	Concentración por reacción	Volumen por reacción (μL)
H2O				5.5
Buffer	5	X	1	4
MgCl₂	25	mM	3	2.4
dNTPS	2	mM	0.2	2
Primer F	0.01	mM	0.001	2
Primer R	0.01	mM	0.001	2
Taq	500	U	2.5	0.1
Muestra				2
Volumen final				20

Anexo 2 Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa del gen L1, que codifica para la proteína mayor de la cápside del virus de papiloma humano.

	Concentración en stock	Unidades	Concentración por reacción	Volumen por reacción (μL)
H₂O				9.4
Buffer	5	X	1	5
MgCl₂	25	mM	2.5	2.5
dNTPS	2	mM	0.2	2.5
Primer F	0.01	mM	0.0001	0.25
Primer R	0.01	mM	0.0001	0.25
Taq	500	U	2	0.1
Muestra				5
Volumen final				25

Anexo 3 Condiciones para la PCR anidada, primera amplificación correspondiente a los genes E6/E7.

	Concentración en stock	Unidades	Concentración por reacción	Volumen por reacción (µL)
H₂O				1.35
Buffer	5	X	1	4
MgCl₂	25	mM	3	2.4
dNTPS	2	mM	0.2	2
Mix E6/E7	0.01	mM	0.000075	0.15
Taq	500	U	2.5	0.1
Muestra				10
Volumen final				20

Anexo 4 Condiciones para la segunda amplificación de la PCR anidada, de los cuatro grupos (Coctel 1, 2, 3 y 4) por PCR múltiple.

	Concentración en stock	Unidades	Concentración por reacción	Volumen por reacción (µL)
H₂O				9.4
Buffer	5	X	1	4
MgCl₂	25	mM	2.5	2
dNTPS	2	mM	0.2	2
Coctel	0.01	mM	0.000075	1.5
Taq	500	U	2.5	0.1
Muestra				1
Volumen final				20

Anexo 5 Descripción de los primers utilizados, condiciones de amplificación y tamaño del fragmento amplificado de todas las PCRs realizadas.

Región amplificada	Primers	Tamaño de amplicón	Condiciones Termociclador
β-actina	β-actinaF: CGG AAC CGC TCA TTG CC β-actina R: ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA	289bp	94°C-2', (92°C-50'', 45°C-50'', 72°C- 50'')36, 72°C-2'.
Gen L1	My09: CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC My11: GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	450pb	94°C-3', (94°C-1', 50°C-1', 72°C-1')5, (94°C-1', 55°C-1', 72°C-1')41, 72°C-10'.
Genes E6/E7	GP-E6-3F: GGG W GK KAC TGA AAT CGG T GP-E6-5B: CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA GP-E6-6B: TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC	630pb	94°C-2', (92°C-50'', 45°C-50'', 72°C- 50'')36, 72°C-7'.
Genotipos: 16, 18, 31, 59 y 45.	16F: CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC 16R: CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	457pb	92°C-2', (92°C-30'', 56.5°C-30'', 72°C- 45'') 35, 72°C-2'.
	18F: CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA 18R: GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	322pb	
	31F: GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G 31R: CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	263pb	
	59F: AGG GGA ACT GCA AGA AAG 59R: TAT AAC AGC GTA TCA GCA GC	215pb	
	45F: GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG 45R: ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	151pb	
Genotipos 33, 6/11, 56, 58 y 52.	33F: ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA 33R: GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	398pb	92°C-2', (92°C-30'', 56.5°C-30'', 72°C- 45'') 35, 72°C-2'.
	6/11F: TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC 6/11R: TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	334pb	
	56F: GTG TGC AGA GTA TGT TTA TTG 56R: TTT CTG TCA CAA TGC AAT TGC	181pb	
	58F: GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC 58R: GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	274pb	

	52F: TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG 52R: CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	229pb	
Genotipos: 35, 42, 43 y 44.	35F: CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C 35R: CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G	358pb	92°C-2', (92°C-30'', 56.5°C-30'', 72°C- 45'') 35, 72°C-2'.
	42F: CCC AAA GTA GTG GTC CCA GTT A 42R: GAT CTT TCG TAG TGT CGC AGT G	277pb	
	43F: GCA TAA TGT CTG CAC GTA GCT G 43R: CAT GAA ACT GTA GAC AGG CCA AG	219pb	
	44F: TAA ACA GTT ATA TGT AGT GTA CCG 44R: TAT CAG CAC GTC CAG AAT TGA C	163pb	
Genotipos: 68, 39, 51 y 66.	68F: GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG 68R: GTT TAC TGG TCC AGC AGT GG	333pb	92°C-2', (92°C-30'', 56.5°C-30'', 72°C- 45'') 35, 72°C-2'.
	39F: GAC GAC CAC TAC AGC AAA CC 39R: TTA TGA AAT CTT CGT TTG CT	280pb	
	51F: GAG TAT AGA CGT TAT AGC AGG 51R: TTT CGT TAC GTT GTC GTG TAC G	223pb	
	66F: TTC AGT GTA TGG GGC AAC AT 66R: AAA CAT GAC CCG GTC CAT GC	172pb	