



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE:

Dra. Carola Otth Lagunas
Instituto de Microbiología Clínica
Facultad de Medicina

PROFESOR CO-PATROCINANTE:

Dra. Gloria León
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

“IDENTIFICACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO ASOCIADO A CITOLOGÍA
ASCUS DE CERVIX UTERINO EN MUJERES DEL HOSPITAL CLÍNICO REGIONAL
VALDIVIA”

Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
**Grado de Licenciado en Ciencias
Biológicas.**

ALEJANDRO ANDRÉS BARRIENTOS BARRÍA
VALDIVIA-CHILE
2006

*Tal vez estés a punto de terminar tu vida, pero
nunca te des por vencido.*

J.R. Razo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres, Reiner y Juana, a mis hermanos Víctor y Lorena, por su cariño y amor que me han dado en mi vida.

Especialmente agradezco a la Fundación DAEL, por haber financiado el arancel de mi carrera durante todos estos años. También a las Sras. Inés Flores, María Inés Salas y Srta. Silvia Cárcamo, por haber gestionado la obtención y renovación de esta beca durante mi carrera.

De corazón, agradezco a las doctoras Carola Otth, Gloria León y Maritza Navarrete, por la confianza, enseñanza, dedicación y apoyo que me dieron durante el transcurso de mi tesis y en la corrección de ésta.

A mi directora de escuela, Dra. Gladys Ruiz, por todo el apoyo y confianza durante toda mi formación de estudiante en la carrera.

A todos mis amigos, por los consejos y apoyo que me dieron durante mi vida de estudiante en Valdivia, además a todas las personas que me enseñaron y ayudaron en los laboratorios de los Institutos de Bioquímica y Microbiología Clínica durante la realización de mi tesis.

Le doy gracias a Claudio Méndez y a los doctores Gustavo Monti y Carla Rosenfeld, por haberme aconsejado y ayudado en el análisis estadístico de mis resultados de tesis.

Finalmente a los proyectos que financiaron esta tesis, Mecesup AUS0107, Coldas Hantavirus y Coldas Citomegalovirus.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	v
Índice de gráficos	vi
Glosario	vii
1. Resumen	1
1.1 Abstract	2
2. Introducción	3
2.1 Antecedentes generales del cáncer cervix uterino	3
2.2 El virus papiloma humano	7
2.3 Hipótesis de trabajo	12
2.4 Objetivo general	12
2.4.1 Objetivos específicos	13
3. Materiales y métodos	14
3.1 Población de estudio	14
3.2 Análisis estadístico	14
3.3 Estandarización de la técnica PCR-RFLP	15
3.4 Técnicas de extracción y detección de ADN de HPV	15
3.4.1 Extracción de ADN de células cervicales	16
3.4.2 Reacción en cadena de la polimera (PCR)	17
3.4.3 Visualización de los productos de PCR de HPV y del gen de β -globina, por electroforesis en geles de agarosa	19

3.4.4	Identificación del genotipo de HPV	20
3.4.5	Visualización del patrón de bandas originado por la digestión con endonucleasas, por electroforesis en geles de poliacrilamida	21
3.4.6	Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata	22
4.	Resultados	26
4.1	Estandarización del método PCR-RFLP	26
4.2	Reacción de amplificación del gen que codifica para β -globina	28
4.3	Reacción de amplificación de ADN de muestras de pacientes con citología ASCUS	29
4.4	Genotipificación de productos de PCR de HPV de muestras de pacientes con citología ASCUS	30
4.5	Genotipos de HPV encontrados en muestras de pacientes con citología ASCUS	32
4.6	Distribución de PAP atípicos de pacientes con citología ASCUS y su asociación con HPV	34
4.7	Asociación de HPV con los estados de progresión de NIEs	35
4.8	Distribución de NIEs, según genotipos de HPV, en pacientes con citología ASCUS	39
4.9	Características sociodemográficas, ginecológicas y obstétricas de pacientes con citología ASCUS	40
5.	Discusión	47
5.1	Conclusiones	57

6. Literatura citada	58
7. Anexo	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Reactivos utilizados para preparar la mezcla de la reacción de amplificación	17
Tabla 2: Composición final de la mezcla de reacción de PCR	18
Tabla 3: Componentes de la mezcla de reacción de PCR para la detección del gen que codifica para β -globina	18
Tabla 4: Enzimas de restricción y concentraciones para la digestión del producto de amplificación	20
Tabla 5: Reactivos para la digestión del producto de amplificación.	20
Tabla 6: Secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo	21
Tabla 7: Patrones de RFLP de HPV mucosotrópicos originados con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI, <i>Dde</i> I, <i>Hae</i> III, <i>Hinf</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Rsa</i> I y <i>Sau</i> 3AI	23
Tabla 8: Genotipos de HPV y prevalencia de infección en las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004)	33
Tabla 9: Distribución de genotipos de HPV asociados con PAP atípicos en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004)	35

Tabla 10: Número de muestras positivas, negativas y su asociación con la presencia o ausencia de neoplasia intraepitelial cervical en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004)	36
Tabla 11: Número de tipos de HPV's asociados con los grados de NIEs en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004)	40
Tabla 12: Características sociodemográficas de las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004)	44
Tabla 13: Características ginecológicas y obstétricas de las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004)	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva de sensibilidad de la reacción de PCR del ADN de HPV 18 de la línea celular HeLa	27
Figura 2: Patrones de digestión del producto de PCR de ADN de HPV 18 de células HeLa en: gel de agarosa (A) gel de poliacrilamida (B)	28
Figura 3: Reacción de amplificación del gen de β -globina de muestras de pacientes con citología ASCUS	29
Figura 4: Reacción de amplificación del ADN de muestras de pacientes con citología ASCUS	30
Figura 5: Digestión del producto de PCR de HPV 16	31
Figura 6: Digestión del producto de PCR de HPV 58	31
Figura 7: Digestión del producto de PCR de HPV 11	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Porcentajes de genotipos de HPV en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia Valdivia (2004)	34
Gráfico 2: Distribución de grupos de edad de pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004), según NIE	37
Gráfico 3: Distribución de NIEs en grupos de edad de pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004), según HPV	38
Gráfico 4: Distribución de grados de NIEs en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004), según HPV	39
Gráfico 5: Distribución de grupos de edad de pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004), según HPV	41

GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APS: Persulfato de amonio.

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfatos.

EDTA: Acido etelindiaminotetracético.

EtOH: Etanol.

H1: Células escamosas atípicas de significado indeterminado que incluyen reparación atípica y sospecha de lesión intraepitelial de bajo grado por HPV y NIE I.

H2: Células escamosas atípicas sugerentes de lesión intraepitelial de alto grado por NIE II y III o carcinoma *in situ* y/o carcinoma invasor.

H3: Células glandulares atípicas de significado indeterminado sugerentes de origen endocervical o endometrial activo.

H4: Células glandulares atípicas sugerentes de neoplasia maligna (Adenocarcinomas *in situ* o invasor) endocervical, endometrial o no definida.

HAc glacial: Ácido acético glacial.

HCHO: Formaldehído.

HeLa: Línea celular proveniente de adenocarcinoma de cervix uterino.

HPV: Virus papiloma humano.

HSIL: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

LSIL: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.

M: Molar.

mA: Miliamperes.

min: Minuto (s).

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

NaOH: Hidróxido de sodio.

NH₄Ac: Acetato de amonio.

NIE: Neoplasia intraepitelial cervical.

PAP: Prueba de papanicolaou.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pmol: Picomol.

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

rpm: Revoluciones por minutos.

ST: Estándar de tamaño molecular de 100 pb.

Tampón PBS: NaCl 15 mM, NaH₂PO₄ 12 mM.

Tampón TBE: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0.

Tampón TE: Tris 20 mM, 1mM EDTA.

Temed: N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina.

Tris: Tris[hidroximetil]aminometano.

U: Unidad enzimática.

μl: Microlitros.

μM: Micromolar.

UV: Ultravioleta.

1. RESUMEN

En el mundo, cada año, son diagnosticadas unas 500.000 mujeres con cáncer cervix uterino, de las cuales fallecen alrededor de 270.000. En el 99.7% de los cánceres cervix uterinos está implicado el virus papiloma humano (HPV). La detección temprana de este virus en las células escamosas atípicas de significado indeterminado, podría prevenir el desarrollo de cáncer cervix uterino. Por esta razón se ha propuesto que las lesiones sugerentes de neoplasias de cervix uterino están asociadas a la presencia de HPV de alto riesgo oncogénico. Los objetivos de esta tesis fueron la implementación de una técnica de detección, genotipificación del virus HPV y su asociación con lesiones precursoras de cáncer y características sociodemográficas, ginecológicas y obstétricas de las mujeres atendidas en el Hospital Clínico Regional Valdivia. Se analizaron 108 muestras de mujeres con citología de células escamosas atípicas de significado incierto, mediante la técnica de PCR-RFLP con los partidores MY09/11 y las enzimas de restricción *Hinf* I, *Pst* I, *Sau* 3AI, *Rsa* I, *Hae* III, *Bam* HI y *Dde* I. La prevalencia de infección por HPV fue de 24% en mujeres con citología de células escamosas atípicas de significado indeterminado. Se encontró la presencia de los genotipos de HPV 16, 58, 31, 52, 18, 33, 11 y en coinfección 16 y 18. La mayoría de los genotipos de alto riesgo se encontraron presentes en lesiones intraepiteliales de grado I, II y III. De un total de 22 pacientes que presentaron neoplasias intraepiteliales cervicales, el 59% se relacionó con la presencia de HPV. Las características sociodemográficas de edad y educación mostraron diferencias estadísticamente significativas. Las pacientes jóvenes presentaron mayor prevalencia de infección por HPV que las de edad avanzada.

1.1 ABSTRACT

Worldly, 500.000 women are diagnosed with cervix uterine cancer. Of these, 270.000 die. Human papillomaviruses (HPV) are implicated in 99.7% of this type of cancer. Early HPV detection in atypical squamous cells with undetermined significance could prevent cervix uterine cancer development. Indeed, it has proposed that high grade oncogenic HPV is associated to lesions suggestive of cervix uterine neoplasia. In these respects, the aim of this thesis was threefold: firstly, to improve HPV detection and genotypification; secondly, to identify HPV association with cancer precursor lesions; finally, to associate HPV with gynecologic and obstetric features of women. On the whole, 108 samples from women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology were analysed by PCR-RFLP. Standard MY09/11 primers and digestion with *Hinf* I, *Pst* I, *Sau* 3AI, *Rsa* I, *Hae* III, *Bam* HI y *Dde* I were employed. The prevalence of HPV infection was 24%. In addition found were 16, 58, 31, 52, 18, 33, 11 as well as co-infection of genotype 16 and 18. The highest risk oncogenic genotypes were detected in I, II and III grade intraepithelial lesions. Out of 22 patients that presented cervical intraepithelial neoplasias, 59% were associated with HPV infection. Sociodemographic aspects such as age and education showed statistically significant differences. As an example, young patients presented higher HPV infection prevalence that old age patients.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes generales del cáncer cervix uterino.

Desde tiempos muy antiguos, el ser humano ha sido afectado por muchas enfermedades, entre las cuales están las de origen oncológico. El proceso oncogénico se caracteriza por una desregulación del ciclo celular con una proliferación descontrolada de células que comienzan a invadir un determinado tejido. En animales y personas de edad avanzada es frecuente la aparición de tumores cancerígenos, pero éstos son pequeños y localizados, como las verrugas, por lo que se clasifican como benignos. Generalmente, estos tumores están delimitados por una cápsula fibrosa y sus células se comportan como normales (Lodish *et al.*, 2002).

Por el contrario, las células que constituyen un tumor maligno expresan proteínas características del tejido del cual se originaron, la mayoría de ellas crece y se dividen más rápido que las normales. Algunos de estos tumores permanecen localizados y encapsulados durante un tiempo; sin embargo, la mayor parte de ellos invaden los tejidos circundantes y el sistema circulatorio, con lo cual se desarrollan en diferentes lugares del cuerpo produciendo una metástasis (Lodish *et al.*, 2002).

Entre los factores extrínsecos involucrados en el desarrollo de un cáncer está el tabaco, el cual se ha asociado a la formación de varios tipos de cáncer: estómago, esófago, páncreas, carcinoma de células escamosas cervicales, colorectal, entre otros (Wogan *et al.*, 2004).

Por otra parte, dentro de los agentes infecciosos asociados a cáncer, destacó el virus papiloma humano (HPV), el cual se asocia en un 2.5% y un 7.5% con el desarrollo de todos los tipos de cánceres en personas de países desarrollados y países en desarrollo, respectivamente (Bekkers *et al.*, 2004). El HPV está implicado en un 99.7% con el desarrollo de cáncer cervix uterino (Araya, 2006; Eileen, 2003), en un 80-90% con los carcinomas de células escamosas de piel, en 70% de los carcinomas anales, en 50% de los carcinomas de células basales de piel, en 25% de los carcinomas orofaríngeos y 10-20% de los carcinomas de esófago (Bekkers *et al.*, 2004).

Anualmente el cáncer cervix uterino afecta a cerca de 500.000 mujeres en el mundo (Nazzari *et al.*, 2003; Hernández-Girón *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2005; Araya, 2006), y cobra unas 270.000 vidas (Araya, 2006). En países en desarrollo, la incidencia de este tipo de cáncer llega hasta 40 por 100.000 mujeres (Franco *et al.*, 2001; Hernández-Girón *et al.*, 2005). En Argentina, la tasa de incidencia del carcinoma de cuello uterino, para el período 1996-2000, fue de 25.4 casos por 100.000 habitantes por año (Abba *et al.*, 2003). En Francia, la tasa de incidencia es de 10/100.000 y la de mortalidad, de 4.6/100.000 mujeres (Beby-Defaux A *et al.*, 2004). En Chile en el año 2003, se estimó una incidencia de 8.5 por 100.000 mujeres y se diagnosticaron 1.200 casos, de los cuales, anualmente, fallecen alrededor de 646 mujeres (Donoso y Cuello, 2006; Araya, 2006; Prieto, 2006).

El cáncer cervix uterino es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que inicialmente se manifiesta a través de lesiones intraepiteliales cervicales de evolución lenta y progresiva, que se pueden suceder en etapas: NIE I, NIE II y NIE III y carcinoma *in situ* (circunscrito a la superficie epitelial) y cáncer cervix

uterino invasor, en el que el compromiso traspasa la membrana basal (Alonso *et al.*, 2000; Piver, 2000; Nazzari *et al.*, 2003).

En Chile, el cáncer cervix uterino constituye la primera causa de muerte en mujeres en edades comprendidas entre 20 y 44 años y la sexta, en el grupo entre 45 y 64 años (Solís, 2004; Montes *et al.*, 2006).

De acuerdo a las edades de prevalencia global, la NIE I se ubica entre 15 y 30 años, la NIE II entre 30 a 34 años y la NIE III de 35 a 49 años (Serman, 2002). Se ha estimado que el riesgo de desarrollar un cáncer invasor, presentando una NIE I, es del 1%; en el caso, de NIE II del 1.5% y en la lesión NIE III, del 15% (Bekkers *et al.*, 2004).

El sistema de clasificación Bethesda considera los estados de progresión de las lesiones intraepiteliales cervicales en dos tipos: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), que incluye, células ASCUS, NIE I y lesiones secundarias a infecciones por HPV; y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL), que incluye NIE II, NIE III y carcinoma *in situ* (Tamayo, 2002).

Citológicamente las células ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado), son células que no son claramente normales ni displásicas y se encuentran en un epitelio cervical normal entre un 1.5% y 5% (Piver, 2000). Sin embargo, las células ASCUS pueden desarrollar una displasia cervical en un 25% a 50% de los casos, y la mitad de éstas, una lesión de alto grado (Piver, 2000).

En el año 2005 en nuestro país, el Ministerio de Salud modificó el informe de PAPs atípicos en las mujeres, los que se pueden observar con mayor detalle en la sección ANEXO de esta tesis. A partir de julio del año 2005, comenzó a regir la nueva clasificación para el reporte de los PAP atípicos que los clasifica en H1, H2, H3 y H4. La

definición para cada uno de ellos, es la siguiente, **H1**: Células escamosas atípicas de significado indeterminado que incluyen reparación atípica y sospecha de lesión intraepitelial de bajo grado por HPV y NIE I. **H2**: Células escamosas atípicas sugerentes de lesión intraepitelial de alto grado por NIE II y III o carcinoma *in situ* y/o carcinoma invasor. **H3**: Células glandulares atípicas de significado incierto sugerentes de origen endocervical o endometrial activo. **H4**: Células glandulares atípicas sugerentes de neoplasia maligna (Adenocarcinomas *in situ* o invasor) endocervical, endometrial o no definida (Muñoz, 2005).

Varios estudios sugieren que las mujeres sexualmente activas se infectarán por HPV en aproximadamente 2 años de haber comenzado su inicio sexual (Bekkers *et al.*, 2004; Conejero *et al.*, 2004). Además, en esta población de estudio, se estima que el riesgo de contraer una infección genital por HPV durante la vida sexual es del 80%, se producirán verrugas genitales en un 5%, citologías cervicales anormales en un 35%, algún tipo de NIE en un 25% y carcinomas invasores, en el 1% (Bekkers *et al.*, 2004). Por otra parte, en mujeres con citología cervical normal, la prevalencia de contraer cualquier tipo de HPV es dependiente de la edad, con un 20% para las edades entre 20 y 25 años, con un 6% para edades superiores a, 30 años (Bekkers *et al.*, 2004).

2.2 El virus papiloma humano.

El virus papiloma humano (HPV) es un agente infeccioso epiteliotrófico y mucosotrópico perteneciente al orden Caudovirales, de la familia *Papovaviridae*, género *Papillomavirus*. No posee envoltura, mide alrededor de 55 nm de diámetro, tiene una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, posee una doble hebra de ADN de 7800 pb a 7900 pb (zur Hausen, 1996; Eileen, 2003; Bekkers *et al.*, 2004). El genoma viral se puede dividir en tres regiones principales: la temprana que está compuesta por los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que sintetizan las proteínas de alto poder oncogénico, asimismo las de estructura y función viral. La región tardía está constituida por los genes L1 y L2, que codifican para las proteínas que forman la cápside viral. La tercera región corresponde a la región reguladora (URR) de la transcripción de las regiones temprana y tardía (Andújar, 2004; Bekkers *et al.*, 2004; Evans y Kaslow, 1997; zur Hausen, 1996; Hagiwara *et al.*, 2005).

La proteína E1, participa en la replicación del ADN viral (Andujar, 2004; Tamayo, 2002; Rivera *et al.*, 2006); E2, en la replicación del ADN viral y en la regulación de la expresión de las proteínas E6 y E7 (Eileen, 2003; Fuente, 2003; Rivera *et al.*, 2006); E4, interacciona con el citoesqueleto y puede estar involucrada en la maduración celular (Eileen, 2003; Fuente, 2003) y E5, está asociada a la membrana celular y estimula la proliferación de celular (Fuente, 2003; Rivera *et al.*, 2006).

En el caso de E6 de HPV16, su función es alterar el ciclo celular. Esta proteína se une a la proteína p53 estimulando su degradación, en un proceso dependiente de ubiquitina y de la proteína asociada a E6 (E6-AP). La disminución de la cantidad de

p53, estimula el ciclo celular y la actividad mitótica (Andújar, 2004). Funcionalmente, p53 impide el paso inadecuado de las células en fase G1 a la fase S, al haber un daño en el ADN provocado por agentes físicos o químicos. Al ocurrir un daño celular, p53 aumenta su actividad y vida media; con lo cual se detiene el ciclo celular para que se lleve a cabo la reparación del ADN o de lo contrario, induce el proceso de apoptosis celular (Martínez, 2001). La pérdida de un punto de control, como el nombrado anteriormente, podría dar lugar a una desregulación celular que conocemos como cáncer. Mathews y col. sugieren que la pérdida de la función de la proteína p53 conduce a la tumogénesis, ya que al menos, en la mitad de todos los tumores humanos examinados, se ha encontrado mutaciones del gen que codifica para p53 (Mathews *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2002).

Por otro lado, E7 codifica para una fosfoproteína nuclear que se une a la proteína retinoblastoma (Rb). Esta proteína, análoga a p53, regula el ciclo celular. La proteína E7 disocia el complejo E2F-Rb, liberándose E2F, ejerciendo una acción positiva en el ciclo celular del epitelio afectado (Andújar, 2004).

La región tardía del genoma viral, consta de dos regiones codificantes, L1 y L2, que generan las proteínas que forman la cápside del virus. El gen L1, codifica una proteína que se encuentra en los diferentes virus papiloma humano, siendo la proteína con mayor poder inmunogénico. El gen L2, codifica proteínas de menor tamaño y de mayor variabilidad entre los virus papiloma humano. En ambas transcripciones, L1 y L2, están reguladas por factores de transcripción que se producen en las células epiteliales más diferenciadas de la capa superficial del cérvix. Por otra parte, la secuencia del gen que codifica para la proteína L1 presenta regiones de alta variabilidad entre los distintos

genotipos del virus. Esta característica del gen L1 ha sido utilizada para la genotipificación de HPV (Andújar, 2004).

Es importante resaltar, que la infección por HPV es una de las enfermedades de transmisión sexual más común (Conejero *et al.*, 2004; Eileen, 2003; Hernández-Girón *et al.*, 2005; Schiffman *et al.*, 2005; Touzé *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2006). Además, no sólo los adultos pueden infectarse con el virus, también los niños pueden adquirirlo, por transmisión vertical (Rice *et al.*, 2000).

En la actualidad, se sabe que existen alrededor de 100 tipos de HPVs (Hagiwara *et al.*, 2005; Jordens *et al.*, 2000; Touzé *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2006) que infectan células del epitelio basal del revestimiento superficial o profundo de los tejidos (Eileen, 2003). Entre ellos, se encuentran los epidermatróficos que infectan la piel de manos y pies; los mucosotróficos infectan las mucosas del revestimiento de la boca, garganta, tracto respiratorio y anogenital, tanto masculino como femenino. Con respecto a los virus que infectan el tracto anogenital, se conocen los genotipos: 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 y 61 (Eileen, 2003).

De acuerdo a las lesiones que causan estos virus, se clasifican en HPVs que producen lesiones de bajo riesgo oncogénico y HPVs de alto riesgo oncogénico. Asociados con infecciones genitales de bajo riesgo oncogénico, se describen los genotipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 y 81, se encuentran principalmente relacionados a condilomas (verrugas genitales) y displasias leves (Abba *et al.*, 2003). Los genotipos de HPV de bajo riesgo oncogénico: 6, 11, 40, 42, 43 y 44, han sido asociados a citología ASCUS, condilomas acuminados, y NIE I (Bekkers *et al.*, 2004).

Los genotipos de alto riesgo oncogénico, se asocian con las lesiones displásicas moderadas, severas y cáncer invasor cervix uterino, éstos son, el 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58, los cuales se encuentran en el 95% de los carcinomas escamosos (Andujar, 2004). Del mismo modo, los genotipos 16, 18 y 31 se encuentran en más del 80% de los cánceres cervicales escamosos (Bekkers *et al.*, 2004).

Mundialmente, los genotipos de HPV más frecuentes son el 16 y 18, representando el 50% y 14% de los casos, respectivamente. En cambio en Chile, el genotipo 16 se asocia con el 20%, el 56 con el 12%, seguidos del 33, 58, 45, 59 y 18 con un 4% (Conejero *et al.*, 2004). En un estudio realizado con mujeres de la región metropolitana se encontró que los HPV de alto riesgo oncogénico más comunes eran los genotipos: 16, 56, 31, 58, 59, 18 y 52 (Ferrecchio *et al.*, 2004).

En relación a la persistencia del genoma viral en la célula infectada, cuando los genotipos infectantes son 6 u 11, el ADN viral se mantiene de forma episomal en el núcleo, con producción de viriones. También puede existir coilocitosis caracterizada por la presencia de células con halo perinuclear blanquecino. En cambio, en el caso del genotipo 16 o del 18, el ADN viral se integra al genoma celular, expresándose las proteínas E6 y E7 y provocando una proliferación celular descontrolada (Alonso *et al.*, 2000; Conejero *et al.*, 2004; Fuente, 2003). El genoma de HPV en lesiones de bajo grado se encuentra en estado episomal y al aumentar los grados de NIE es más común encontrarlo integrado al genoma celular. Esto último debido al riesgo que son progresiones de lesiones infectadas que van en aumento; y a que los genotipos involucrados en éstas son de alto grado oncogénico (Eileen, 2003; Bekkers *et al.*, 2004).

Entre las técnicas moleculares para la detección de ADN de HPV en pacientes infectadas, la más utilizada, por su sensibilidad y especificidad, es la reacción en cadena de la polimerasa. Existen diferentes metodologías para la detección de HPV por PCR, las cuales se diferencian por los partidores que se emplean (SPF₁₀, MY09/11 y GP5+/GP6+), detectando genotipos de alto riesgo hasta en un 99.7% de los cánceres cervicales (Bekkers *et al.*, 2004). Los partidores degenerados MY09/11 reconocen una secuencia homóloga de los virus papiloma humano en la región variable L1 de los distintos genotipos de HPVs (Manos *et al.*, 1989; Fernández-Contreras *et al.*, 2000; Husnjak *et al.*, 2000). Esto último posibilita la amplificación de la secuencia de L1 de más de 25 genotipos de HPV que infectan la región genital (Husnjak *et al.*, 2000). Los distintos genotipos de HPV se diferencian, porque presentan un perfil de RFLP diferente al digerir el producto de la amplificación (450 pb) con distintas enzimas de restricción (Bernard *et al.*, 1994).

Finalmente, es importante destacar, que el realizar una detección temprana de HPVs de alto grado oncogénico, asociado a una citología con células ASCUS, representa un gran valor predictivo. Esto último debido a que el virus papiloma humano podría inducir el desarrollo de NIE I, NIE II, NIE III y carcinoma *in situ*.

2.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

De acuerdo a los antecedentes recién expuestos se plantea que “Las lesiones sugerentes de neoplasias cervix uterinas están asociadas con la presencia de HPV de alto riesgo oncogénico”

2.4 OBJETIVO GENERAL

Detectar y tipificar virus papiloma humano de alto y bajo grado oncogénico en mujeres que presentan PAP atípico (ASCUS) del Hospital Clínico Regional Valdivia; analizar su asociación con lesiones preinvasoras e invasoras de cáncer cervix uterino.

2.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Implementar el método de PCR-RFLP para la genotipificación de HPV.

- 2.- Detectar y tipificar HPV de alto y bajo grado oncogénico, por el método de PCR-RFLP, en mujeres del Hospital Clínico Regional Valdivia que presentan PAP atípico (ASCUS).

- 3.- Constatar la asociación entre la presencia de HPV de alto grado oncogénico, con el desarrollo de lesiones precursoras y preinvasoras de cáncer cervix uterino en las pacientes en estudio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Población de estudio.

Se realizó un estudio transversal con 108 mujeres que presentaron PAP atípico (ASCUS) en los consultorios de la provincia de Valdivia, en el año 2004. Todas participaron voluntariamente en el estudio, siendo derivadas al Hospital Clínico Regional Valdivia en el mismo año. En el hospital se les realizó nuevamente un PAP, una extracción de muestra de células cervicales para el análisis de ADN de HPV, una colposcopia y respondieron un cuestionario con preguntas tales como: edad, años de estudio, estado civil, procedencia, tabaquismo, edad de primera relación sexual, número de parejas sexuales en la vida de la mujer y número de partos.

3.2 Análisis Estadístico.

Se efectuó la prueba de Chi cuadrado en el programa INSTAT versión 3.33 para observar si las mujeres que resultaron HPV positivas y negativas, presentaban o no diferencia estadísticamente significativa con respecto a las variables de edad, años de estudios, estado civil, procedencia, tabaquismo, edad de primera relación sexual, número de parejas sexuales en la vida de la mujer y número de partos.

3.3 Estandarización de la técnica PCR-RFLP.

La implementación del procedimiento de extracción de ADN de HPV y el de PCR-RFLP se realizó con la línea celular HeLa, que también se utilizó como control positivo. Esta línea celular proviene de células de adenocarcinoma de cervix uterino, extraídas en el año 1951 de la paciente Henrietta Lacks (Grey *et al.*, 1952) y en este estudio se utilizó de control positivo, porque posee copias del ADN de HPV 18 integrado a su genoma (Boshart *et al.*, 1984). Con esta línea celular se realizó una curva de sensibilidad; para ello, se efectuó el conteo de células HeLa en cámara de Neubauer, luego se hizo una dilución seriada de las células y de cada una de las diluciones se extrajo el ADN, para amplificar una alícuota por la reacción en cadena de la polimerasa.

3.4 Técnicas de extracción y detección de ADN de HPV.

A cada muestra se le extrajo el ADN. Posteriormente se realizó la reacción de PCR con los partidores degenerados MY09/11, para la detección del producto de 450 pb. Las muestras que originaron un producto de amplificación para el genoma de HPV, se digirieron con diferentes endonucleasas de restricción (*Bam* HI, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I y *Sau* 3AI), con el propósito de conocer el genotipo de HPV causante de la infección. Como control interno de la reacción de PCR, se amplificó una región del gen que codifica para β -globina. Algunas muestras analizadas en este estudio, fueron confirmadas en los laboratorios de referencia: Laboratorio de Biología Molecular Aplicada perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la

Universidad Nacional de Misiones, Republica de Argentina; y en el Instituto Malbrand, Argentina.

3.4.1 Extracción de ADN de células cervicales.

La muestra extraída de la lesión cervical se resuspendió en un tubo falcon de 15 ml conteniendo 4 ml de tampón PBS 1x, y se continuó con el siguiente protocolo: Se le agregó 2 ml de PBS 1x, luego se centrifugó por 3 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se eliminó por inversión. El sedimento se resuspendió en 500 µl de tampón de extracción (10 mM Tris (pH 8.3), 0.45% Tween-20, 0.45% Igepal CA-630, 100 µg/ml Proteinasa K) y luego se incubó durante 60 minutos a 56° C. A continuación se adicionó un volumen de fenol saturado/ cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1), para extraer los ácidos nucleicos, se agitó por inversión 3 minutos y se centrifugó para separar las fases, 5 minutos a 13.000 rpm en una microfuga. La fase superior se traspasó a un tubo estéril y se le adicionó un volumen de mezcla cloroformo/ isoamílico (24:1). Después de agitar por 3 minutos, se microcentrifugó por 5 minutos a 13.000 rpm. Nuevamente se recuperó la fase superior la que se traspasó a un tubo limpio y el ADN se precipitó agregando 1/10 de volumen de 7.5 M NH₄Ac y dos volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión. La muestra se dejó toda la noche a – 20° C. El ADN se recuperó por centrifugación a 4° C durante 30 minutos a 13.000 rpm; el sobrenadante se eliminó por inversión y el tubo se dejó escurrir para evaporar el etanol. El sedimento de ADN se lavó con 200 µl 70% etanol y se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm. Una vez eliminado el etanol, el sedimento se dejó secar al aire y luego se

resuspendió en 60 µl de tampón TE estéril (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Finalmente, la muestra se guardó a -20° C hasta su utilización.

3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ADN de las muestras extraídas se amplificó para detectar la presencia del fragmento de 450 pb de la secuencia consenso L1 del genoma viral (Manos *et al.*, 1989). La secuencia nucleotídica de los partidores es (5' → 3'):

MY 11: GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG

MY 09: CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC

Código degenerado: M = A + C

R = A + G

W = A + T

Y = C + T

Tabla 1: Reactivos utilizados para preparar la mezcla de la reacción de amplificación.

Master Mix	Volumen 1X (µl/tubo)	Concentración final
Agua	53,2	
Tampón 10X PCR (s/MgCl ₂)	10	10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl
MgCl ₂ 50 mM	5	2,5 mM MgCl ₂
Mezcla dNTPs 2 mM	12	240 µM c/u
Partidores MY 09 (50µM)	2	1 µM (1pmol/µl)
Partidores MY 11 (50 µM)	2	1 µM (1pmol/µl)
Polimerasa Taq (5U/µl)	0,8	0,04 U/µl
Volumen final (µl)	85	

Tabla 2: Composición final de la mezcla de reacción de PCR.

Nº Tubo	1	2	3	4	5	C +	C -
Mezcla (µl)	85	85	85	85	85	85	85
Agua (µl)	-	-	-	-	-	-	15
ADN muestra	15	15	15	15	15	-	-
ADN HeLa	-	-	-	-	-	15	-
Vol. Final (µl)	100	100	100	100	100	100	100

El programa de amplificación utilizado fue: denaturación inicial a 94° C por 3 min., 35 ciclos de: denaturación a 94° C por 1 min., alineamiento a 55° C por 1 min., extensión a 72° C por 1 min. y extensión final a 72° C por 5 min.

Para el control interno de la reacción de PCR, se amplificó una secuencia de 268 pb del gen de β-globina utilizando los partidores PC 04 y GH20. La secuencia nucleotídica de los partidores es (5' → 3'):

PC 04: CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

GH20: GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

Tabla 3: Componentes de la mezcla de reacción de PCR para la detección del gen que codifica para β-globina.

Master Mix	Volumen 1X (µl/tubo)	Concentración Final
Agua	33,8	
Tampón 10X PCR (s/MgCl ₂)	5	10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl
MgCl ₂ 50 mM	0,3	1,5 mM MgCl ₂
Mezcla dNTPs 2 mM	5	200 µM c/u
Partidores PC04 (50µM)	0,2	1 µM (1pmol/µl)
Partidores GH20 (50 µM)	0,2	1 µM (1pmol/µl)
Polimerasa Taq (5U/µl)	0,5	0,05 U/µl
Volumen final (µl)	45	

El programa de amplificación para la detección del gen de β-globina fue el siguiente: denaturación inicial a 94° C por 2 min., 35 ciclos de: denaturación a 94° C por

1 min., alineamiento a 63° C por 1 min., extensión a 72° C por 1 min. y extensión final a 72° C por 5 min.

3.4.3 Visualización de los productos de PCR de HPV y del gen β -globina, por electroforesis en geles de agarosa.

Los productos de la reacción de amplificación, fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA, 20 mM acetato sodio pH 8.0). Las muestras se aplicaron al gel mezcladas con tampón de carga (0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol y TAE 6x) en un volumen final de 10 μ l (2 μ l tampón de carga + 8 μ l producto de PCR). La electroforesis se realizó a una corriente constante (50mA) durante una hora. Una vez finalizada la corrida, el gel se observó en un transiluminador UV a fin de visualizar la banda esperada (450 pb para el producto de PCR de HPV y de 268 pb para el gen que codifica para β -globina).

3.4.4 Identificación del genotipo de HPV.

Las muestras que originaron una banda de 450 pb, se digirieron con las enzimas de restricción *Hinf* I, *Pst* I, *Sau* 3AI, *Rsa* I, *Hae* III, *Bam* HI y *Dde* I, con el propósito de conocer el genotipo del virus (Tabla 8). Las condiciones de la digestión enzimática se señalan en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4: Enzimas de restricción y concentraciones para la digestión del producto de amplificación.

Enzima	Concentración	Volumen 1x	Concentración final	Tampón 10 x
Hinf I	20 U/ μ l	0.5 μ l	10 U/ μ l	Tampón H
<i>Pst</i> I	20 U/ μ l	0.5 μ l	10 U/ μ l	Tampón H
<i>Sau</i> 3AI	10 U/ μ l	1 μ l	10 U/ μ l	Tampón <i>Rsa</i> I
<i>Rsa</i> I	60 U/ μ l	0.16 μ l	10 U/ μ l	Tampón <i>Rsa</i> I
<i>Hae</i> III	20U/ μ l	0.5 μ l	10 U/ μ l	Tampón M
<i>Bam</i> HI	20 U/ μ l	0.5 μ l	10 U/ μ l	Tampón B
<i>Dde</i> I	10 U/ μ l	1 μ l	10 U/ μ l	Reactivo 3

Tabla 5: Reactivos para la digestión del producto de amplificación.

Reactivo	Volumen μ l
Agua	5
Tampón Enzima	2
Enzima 10 U/ μ l	0.5
Producto de PCR	12.5
Total	20

Tabla 6: Secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo.

Enzima	5' a 3'	3' a 5'
<i>Hinf</i> I	G/ANTC	CTNA/G
<i>Pst</i> I	CTGCA/G	G/ACGTC
<i>Sau</i> 3AI	N/GATCN	NCTAG/N
<i>Rsa</i> I	GT/AC	CA/TG
<i>Hae</i> III	GG/CC	CC/GG
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	CCTAG/G
<i>Dde</i> I	C/TNAG	GANT/C

N= G, A, T ó C

La digestión enzimática, en todos los casos se realizó a 37° C y por un tiempo de incubación de tres horas.

3.4.5 Visualización del patrón de bandas originado por la digestión con endonucleasas, por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida se prepararon al 5% (5 ml de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 6 ml TBE 5x, 18.57 ml de agua, 300 µl de 10% APS y 30 µl de Temed). Las muestras para cargar en el gel se prepararon mezclando 8 µl del producto de la digestión enzimática + 2 µl de tampón de carga. La electroforesis se realizó a corriente constante (40 mA) durante 3 horas.

3.4.6 Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.

El gel se sumergió en una solución de AgNO_3 1x en agitación durante 30 minutos o hasta la aparición de las bandas. La tinción se detuvo lavando el gel, el que luego se sumergió, en 100 ml de una solución de 3% NaOH y 1 ml 37% HCHO. Después de lavar con agua destilada, se sumergió en 100 ml de solución de fijación (287 ml EtOH y 3 ml HAc glacial). El patrón de bandas obtenido se comparó con el de la tabla 7.

Tabla 7: Patrones de RFLP de HPV mucosotrópicos originados con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I y *Sau* 3AI, descritos por Bernard *et al.*, 1994.

Tipo de HPV	<i>Bam</i> HI	<i>Dde</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI
HPV 6b 449 pb	449	382 67	217 124 108	234 215	449	161 149 72 67	366 63 20
HPV 11 449 pb	366 83	447 2	217 124 108	234 215	242 207	216 135 72 26	366 63 20
HPV 13 455 pb	372 83	326 67 62	204 127 124	240 215	213 242	175 135 73 72	372 63 20
HPV 16 452 pb	452	452	444 8	452	216 210 26	310 72 70	369 63 20
HPV 18 455 pb	372 83	432 23	455	455	242 213	135 125 85 72	372 63 20
HPV 26 455 pb	455	455	455	455	353 102	365 72 18	372 63 20
HPV 31 452 pb	452	283 167 2	328 124	237 215	216 210 26	380 72	369 63 20
HPV 31 b 452 pb	452	285 90 77	328 124	237 215	216 210 26	380 72	369 63 20
HPV 32 449 pb	366 83	320 108 21	317 124 8	234 215	449	216 161 72	366 63 20
HPV 33 449 pb	449	320 77 52	449	234 215	242 207	236 102 72 39	267 162 20
HPV 34 458 pb	458	211 151 88 8	324 124	458	253 179 26	186 161 96 15	438 20
HPV 35 452 pb	452	294 135 23	261 180 8	452	426 26	177 161 72 42	369 63 20
HPV 39 455 pb	455	324 131	455	355 100	330 125	260 123 72	249 123 63 20

Tipo de HPV	<i>Bam</i> HI	<i>Dde</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI
HPV 40 455 pb	240 132 83	297 158	447 8	455	455	365 90	240 132 63 20
HPV 42 449 pb	366 83	341 108	449	234 215	449	242 135 72	366 63 20
HPV 44 455 pb	455	297 112 46	223 124 108	455	455	222 161 72	405 30 20
HPV 45 455 pb	372 83	324 131	447 8	455	242 213	338 72 45	372 63 20
HPV 51 452 pb	237 215	362 90	379 73	452	452	380 72	237 132 63 20
HPV 52 449 pb	449	357 92	258 183 8	449	423 26	449	366 63 20
HPV 53 449 pb	449	206 158 85	232 217	368 81	449	449	342 87 20
HPV 54 452 pb	369 83	452	217 127 108	234 218	452	138 125 117 72	369 63 20
HPV 55 455 pb	455	112 111 101 85 46	215 124 108 8	215 207 33	455	165 161 72 57	405 30 20
HPV 56 449 pb	449	307 142	275 166 8	449	242 207	310 72 49 18	429 20
HPV 57 449 pb	449	211 142 50 46	449	449	296 153	449	328 38 33 26 24
HPV 58 449 pb	449	348 101	449	235 214	216 207 28	306 111 32	366 57 20 6
HPV 59 452 pb	452	452	396 56	452	426 26	452	402 24 20 6

Tipo de HPV	<i>Bam</i> HI	<i>Dde</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI
HPV 61 455 pb	455	455	212 211 24 8	455	455	185 180 72 18	372 63 20
HPV 62 449 pb	449	449	232 217	449	341 108	359 72 18	399 30 20
HPV 64 458 pb	375 83	211 151 87 9	334 124	367 91	253 179 26	186 161 72 39	375 63 20
HPV 66 449 pb	366 83	291 158	449	449	207 150 66 26	449	366 63 20
HPV 67 449 pb	449	307 92 50	266 183	234 215	423 26	310 72 67	366 63 20
HPV 68 455 pb	372 83	455	455	215 140 100	455	260 85 72 38	249 123 63 20
HPV 69 455 pb	372 83	455	223 183 49	455	455	365 72 18	372 33 30 20
HPV 83 452 pb	369 83	452	383 69	452	317 135	380 72	369 63 20
HPV 84 452 pb	452	220 142 90	346 106	214 106 95 37	452	310 142	369 63 20
HPV 70 455 pb	372 83	455	232 117 106	240 215	242 213	231 123 72 29	372 63 20

4. RESULTADOS

4.1 Estandarización del método PCR-RFLP.

Para cumplir con el primer objetivo planteado en el presente trabajo de tesis, se implementó la técnica de PCR-RFLP para la genotipificación de HPV. Las condiciones, secuencias de partidores y enzimas de restricción utilizados para dicha implementación se encuentran detallados en materiales y métodos. Luego de optimizar la reacción de PCR, se procedió a realizar un estudio de sensibilidad con ADN de HPV. Para ello se realizó una dilución seriada de una suspensión celular de células HeLa partiendo de una concentración de 8.5×10^6 células/ml hasta 1.3×10^4 células/ml. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos en la reacción de PCR para dichas diluciones con el producto de amplificación de 450 pb., donde se observa claramente la disminución progresiva de la intensidad de las bandas a medida que disminuye la concentración de células. Se destaca que, a una concentración celular de 13000 células/ml, aún es posible detectar genoma de HPV mediante esta técnica.

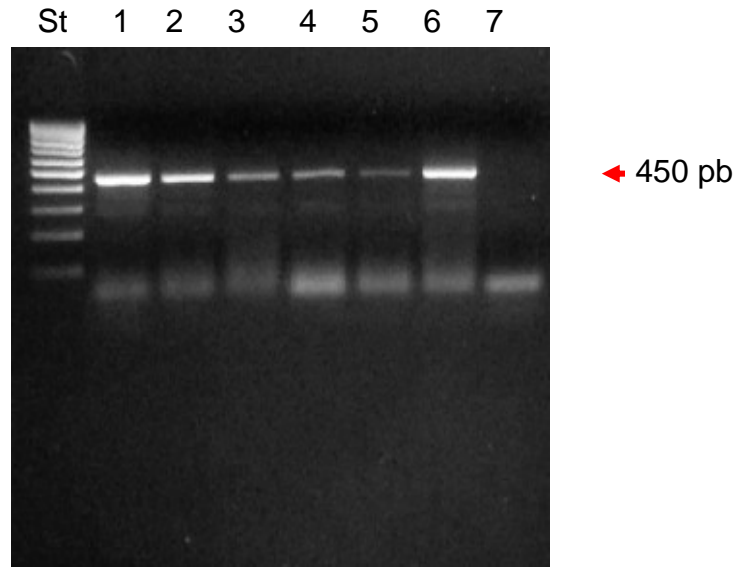


Figura 1: Curva de sensibilidad de la reacción de PCR del ADN de HPV 18 de la línea celular HeLa. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando el producto de amplificación de 450 pb. Carril St.: estándar de tamaño molecular escalera de 100 pb. Carriles del 1 al 5: diluciones seriadas de una muestra de células Hela (2.1×10^5 ; 1.1×10^5 ; 5.4×10^4 ; 2.7×10^4 ; 1.3×10^4 células/ml respectivamente). Carril 6: control positivo de células Hela. Carril 7: control negativo de la técnica.

De la misma forma, se optimizó el procedimiento para genotipificar HPV con el producto de amplificación de ADN de HPV 18 de células HeLa. Este fue digerido con las enzimas *Hinf I*, *Pst I*, *Sau 3AI*, *Rsa I*, *Hae III*, *Bam HI* y *Dde I*, originando un patrón de digestión que fue visualizado en un gel de poliacrilamida con tinción de nitrato de plata (Figura 2B); y en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 2A), con el fin de comparar la resolución y sensibilidad de ambas formas de visualizar el producto digerido.

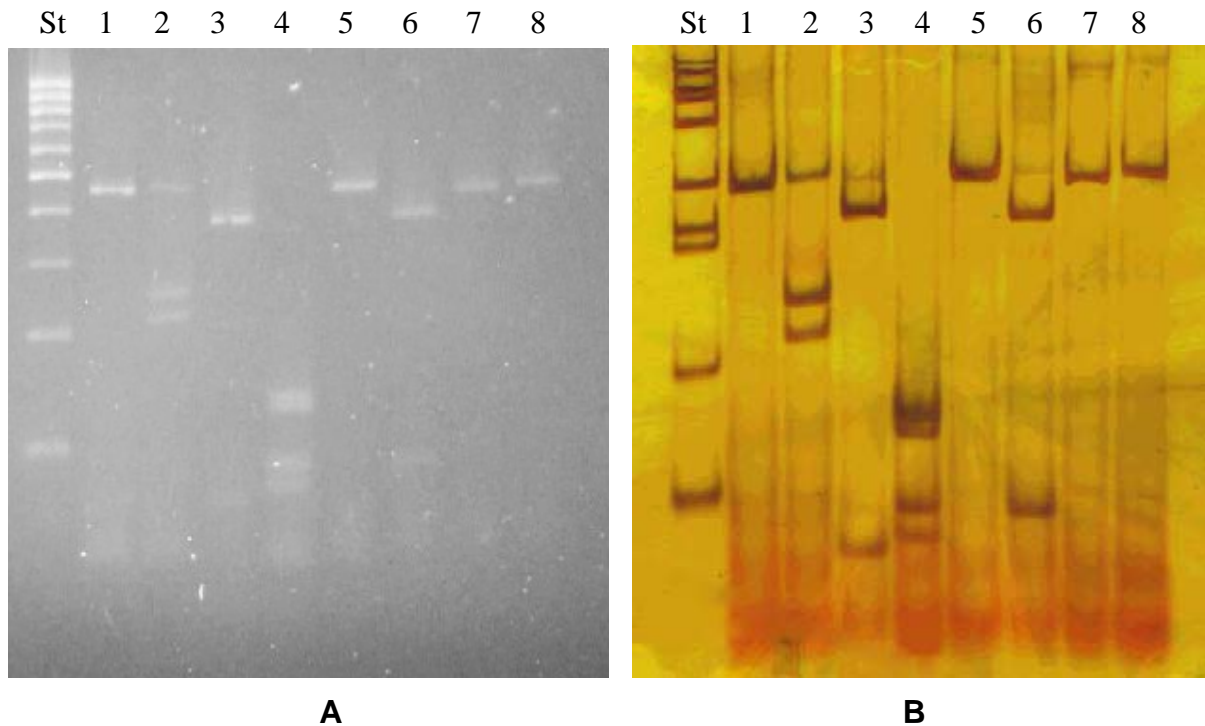


Figura 2: Patrones de digestión del producto de PCR de ADN de HPV 18 de células HeLa en: gel de agarosa (A) y gel de poliacrilamida (B). Carril St: estándar de tamaño molecular de 100 pb. Carriles del 1 al 7: patrones de digestión de las enzimas *Hinf* I (455 pb), *Pst* I (242 pb y 213 pb), *Sau* 3AI (372 pb, 63 pb y 20 pb), *Rsa* I (135 pb, 125 pb, 85 pb, 72 pb y 38 pb), *Hae* III (455 pb), *Bam* HI (372 pb y 83 pb), *Dde* I (432 pb y 83 pb). Carril 8: producto de PCR sin digerir.

4.2 Reacción de amplificación del gen que codifica para β -globina.

La estandarización de la reacción de PCR para el gen de β -globina, se realizó con el ADN de células HeLa, en un volumen final de reacción de 50 μ l y, una temperatura de reasociación de 55° C a 63° C. La reacción de PCR para el gen de β -globina se realizó como control de la reacción. En la figura 3, se observa la banda esperada, de 268 pb.

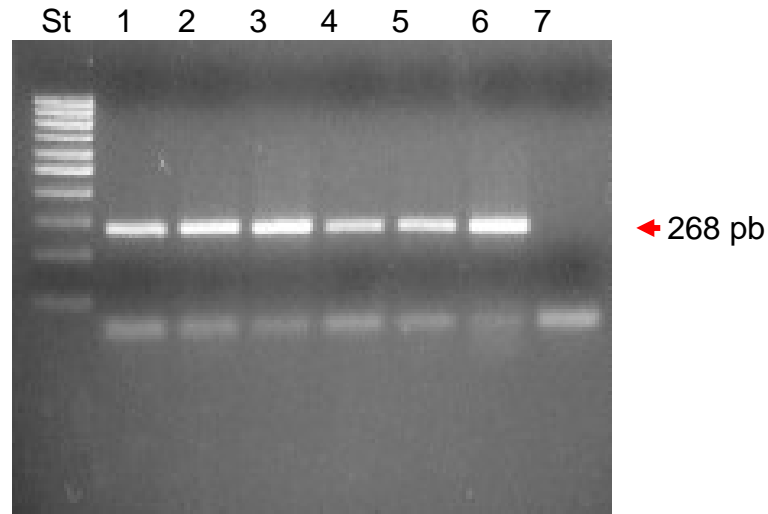


Figura 3: Reacción de amplificación del gen de β -globina de muestras de pacientes con citología ASCUS. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando el producto de amplificación del gen de β -globina corresponden a una banda de 268 pb. Carril St.: estándar de tamaño molecular escalera de 100 pb. Carriles del 1 al 5: producto de muestras. Carril 6: control positivo de la reacción. Carril 7: control negativo de la técnica.

4.3 Reacción de amplificación de ADN de muestras de pacientes con citología ASCUS.

La reacción de PCR de ADN de las muestras, se llevó a cabo una vez finalizada la etapa de optimización de la técnica de PCR-RFLP, comenzándose a trabajar con muestras de pacientes seleccionadas para este estudio. A éstas se les extrajo el ADN, de acuerdo al método descrito en materiales y métodos. A continuación, se realizó la reacción de PCR con los partidores degenerados MY09/11, y el producto se fraccionó en un gel de agarosa (Figura 4).

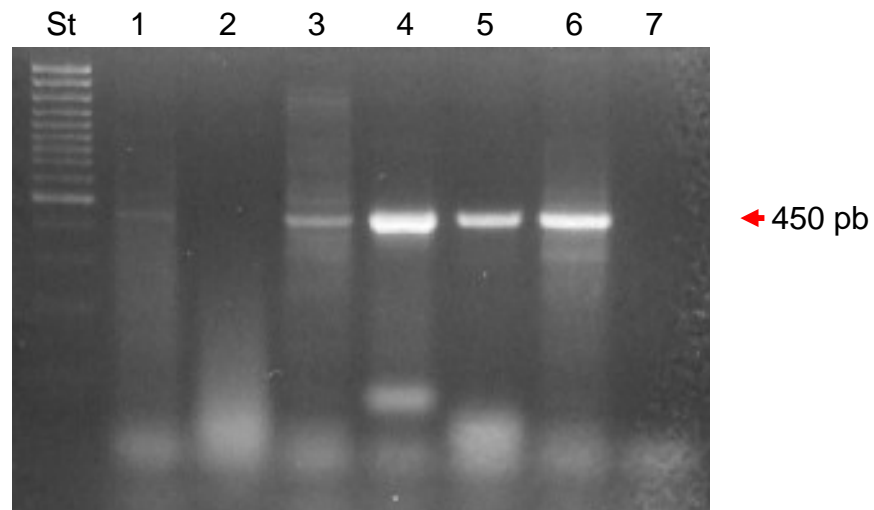


Figura 4: Reacción de amplificación del ADN de muestras de pacientes con citología ASCUS. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril St.: estándar de tamaño molecular escalera de 100 pb. Carriles 1, 3, 4 y 5 muestras positivas para HPV. Carril 2 muestra negativa para HPV. Carril 6: control positivo de la reacción. Carril 7 control negativo.

4.4 Genotipificación de productos de PCR de HPV de muestras de pacientes con citología ASCUS.

Las muestras de las pacientes que originaron el producto de amplificación esperado, se digirieron con las enzimas de restricción *Hinf I*, *Pst I*, *Sau 3AI*, *Rsa I*, *Hae III*, *Bam HI* y *Dde I*. En las figuras 2, 5, 6 y 7, se observa el resultado obtenido.

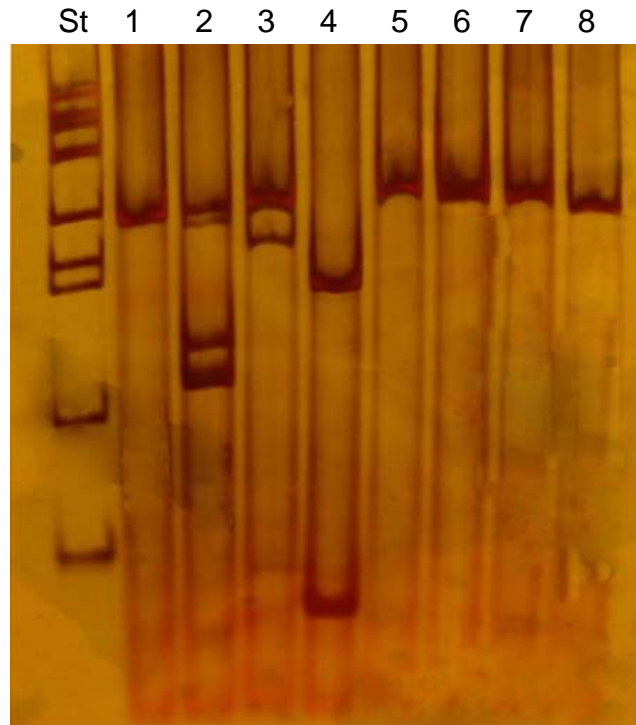


Figura 5: Digestión del producto de PCR de HPV 16. Electroforesis gel de poliacrilamida al 5%. Carril St: estándar de tamaño molecular de 100 pb. Carriles del 1 al 7: patrones de digestión enzimas *Hinf* I (452 pb), *Pst* I (216 pb y 210 pb), *Sau* 3AI (369 pb, 63 pb y 20 pb), *Rsa* I (310 pb, 72 pb y 70 pb), *Hae* III (444 pb), *Bam* HI (452 pb), *Dde* I (452 pb). Carril 8: producto de PCR sin digerir.

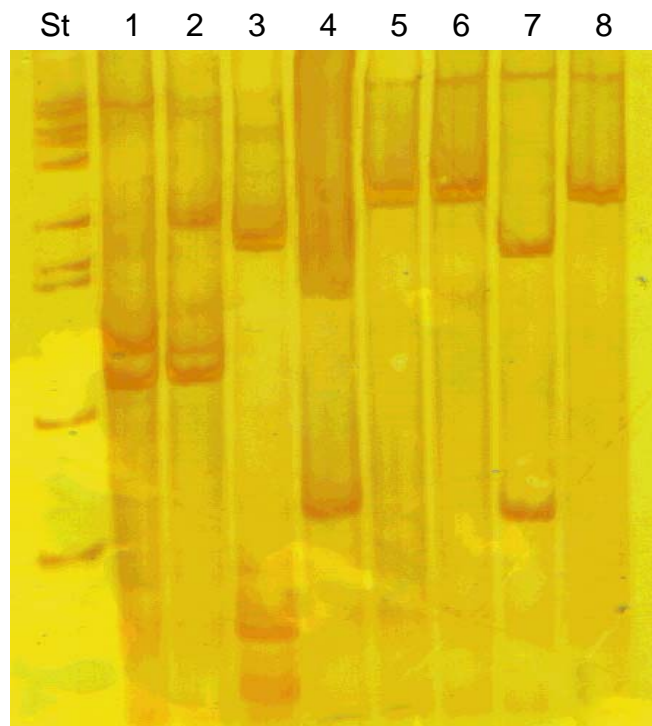


Figura 6: Digestión del producto de PCR de HPV 58. Electroforesis en gel poliacrilamida al 5%. Carril St: estándar de tamaño molecular de 100 pb. Carriles del 1 al 7: patrones de digestión enzimas *Hinf* I (235 pb y 214 pb), *Pst* I (216 pb y 207 pb), *Sau* 3AI (366 pb, 57 pb y 20 pb), *Rsa* I (306 pb, 111 pb), *Hae* III (449 pb), *Bam* HI (449 pb), *Dde* I (348 pb y 101 pb). Carril 8: producto de PCR sin digerir.

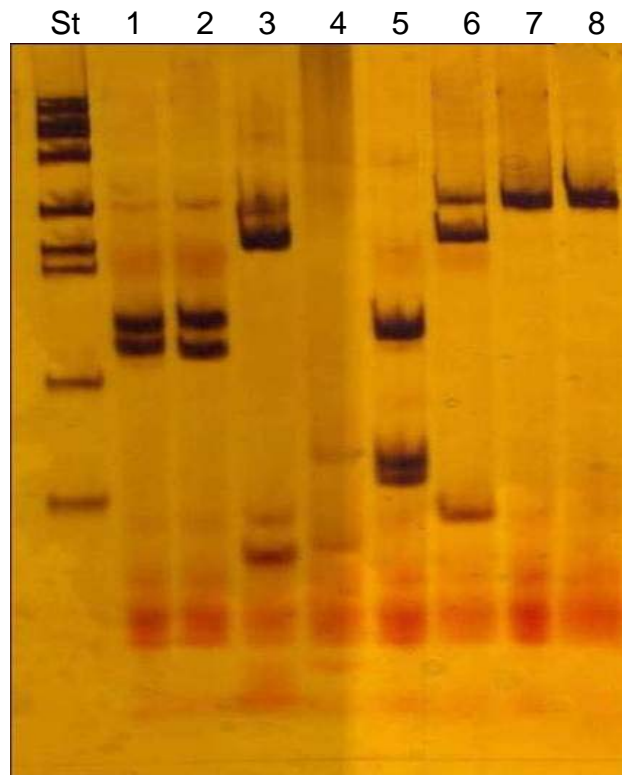


Figura 7: Digestión del producto de PCR de HPV 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. Carril St: estándar de tamaño molecular de 100 pb. Carriles del 1 al 7: patrones de digestión enzimas *Hinf I* (234 pb y 215 pb), *Pst I* (242 pb y 207 pb), *Sau 3AI* (366 pb, 63 pb y 20 pb), *Rsa I* (135 pb y 72 pb), *Hae III* (217 pb, 124 pb y 108 pb), *Bam HI* (366 pb y 83 pb), *Dde I* (447 pb). Carril 8: producto de PCR sin digerir.

4.5 Genotipos de HPV encontrados en muestras de pacientes con citología ASCUS.

De las 108 muestras cervicales analizadas, el 24% (26/108) fue positiva para infección por HPV y el 76% (82/108) negativas, según la técnica de PCR con los partidores MY09/11 utilizada en el presente estudio. Ello permitió estimar una prevalencia de infección por HPV de 24% (26/108) en las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004) (Tabla 8). Del 24% (26/108) de las infecciones por HPV en las mujeres con citología ASCUS, el 96% (25/26) presentó un genotipo de HPV y el 4% (1/26) dos genotipos, entre ellos, había de alto y de bajo

riesgo oncogénico. Los genotipos de HPV de alto riesgo, fueron los más frecuentes, con el 96% (25/26), estos son, el HPV 16, HPV 58, HPV, 33, HPV 31, HPV 52 y HPV 18, mientras que el único de bajo riesgo con el 4% (1/26) fue el HPV 11. El genotipo 16 fue el más común con el 42.3% (11/26), seguido del HPV 58 con el 23.2% (6/26), HPV 31 con el 7.7% (2/26), HPV 18 con el 7.7% (2/26), HPV 52 con el 7.7% (2/26), HPV 33 con el 3.8 (2/26), HPV 11 con el 3.8% (1/26) y en coinfección los HPVs 16/18 con el 3.8% (1/26) (Tabla 8 y Gráfico 1).

Tabla 8: Genotipos de HPV y prevalencia de infección en las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004).

Tipo Viral	Numero de HPV	Prevalencia Infección de genotipos
HPV 16	11	10.1%
HPV 58	6	5.5%
HPV 52	2	1.8%
HPV 18	2	1.8%
HPV 31	2	1.8%
HPV 33	1	1%
HPV 11	1	1%
HPV 16 y 18	1	1%
Total	26	24%

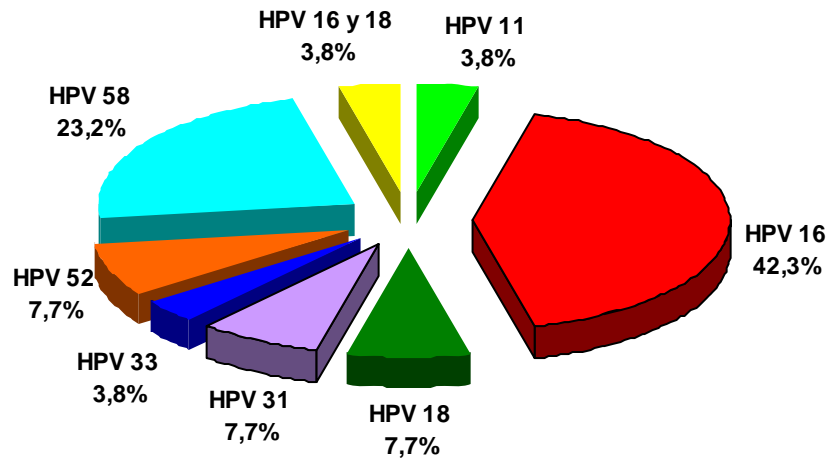


Gráfico 1: Porcentajes de genotipos de HPV en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (20004).

4.6 Distribución de PAP atípicos de pacientes con citología ASCUS y su asociación con HPV.

La frecuencia de PAP atípicos en las citología ASCUS de pacientes del Hospital Clínico Regional Valdivia, correspondió el: 44.4% (48/108) a H1, el 34.3% (37/108) a H2, el 17.6% (19/108) a H3 y el 3.7% (4/108) a H4. El virus papiloma humano, se encontró en el 29% (14/48) de H1, en el 21.6% (8/37) de H2, en el 10.5% (2/19) de H3 y en el 50% (2/4) de H4 (Tabla 9). La distribución de genotipos de HPV por PAP atípicos fue la siguiente: el HPV 16 en el 10.4% (5/48) de H1, en el 10.8% (4/37) de H2, en el 5.2% (1/19) de H3 y en el 25% (1/4) de H4; el HPV 58 en el 8.3% (4/48) de H1 y en el 5.4% (2/37) de H2; el HPV 33 en el 2.1% (1/48) de H1; el HPV 18 en el 4.2%

(2/48) de H1; el HPV 31 en el 2.1% (1/48) de H1 y en el 25% (1/4) de H4; el HPV 52 en el 2.7% (1/37) de H2 y en el 5.2% (1/19) de H3; la coinfección de HPV 16 y 18 en el 2.7% (1/37) de H2 y el HPV 11 en el 2.1% (1/48) de H1 (Tabla 9).

Tabla 9: Distribución de genotipos de HPV asociados con PAP atípicos en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004).

Tipos de HPV	H1	H2	H3	H4	Total
HPV 16	5 (4.6%)	4 (3.7%)	1 (0.9%)	1 (0.9%)	11
HPV 58	4 (3.7%)	2 (1.8%)	-	-	6
HPV 33	1 (0.9%)	-	-	-	1
HPV 18	2 (1.8%)	-	-	-	2
HPV 31	1 (0.9%)	-	-	1 (0.9%)	2
HPV 52	-	1 (0.9%)	1 (0.9%)	-	2
HPV 16 y 18	-	1 (0.9%)	-	-	1
HPV 11	1 (0.9%)	-	-	-	1
HPV (+)	14	8	2	2	26
HPV (-)	34	29	17	2	82
Total	48	37	19	4	108

4.7 Asociación de HPV con los estados de progresión de NIEs.

De las 108 mujeres analizadas, el 20% (22/108) presentó algún grado de neoplasia intraepitelial cervical (Tabla 10). De las mujeres que presentaron NIEs, el 59% (13/22) se asoció con la presencia de HPV, en cambio el 41% (9/22) presentó NIEs sin infección viral (Tabla 10).

Al realizar la prueba de Chi cuadrado a las progresiones NIEs con HPV, se obtuvo un valor de 18.5 con un grado de libertad, lo que confirma que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la presencia de HPV en la lesión NIE; y la ausencia de HPV con la no progresión de NIE en las mujeres seleccionadas en este trabajo (Tabla 10).

Tabla 10: Número de muestras positivas, negativas y su asociación con la presencia o ausencia de neoplasia intraepitelial cervical en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004).

HPV *	NIE (+)	NIE (-)	Total
Positivas	13 (12%)	13 (12%)	26
Negativas	9 (8%)	73 (68%)	82
Total	22	86	108

* $p < 0.05$

La prevalencia de tipos de NIEs en las mujeres con citología ASCUS fue 9.2% (10/108) para NIE III, 5.5% (6/108) para NIE II, 3.7% (4/108) para NIE I y 1.9% (2/108) para NIE I a II. La distribución de prevalencia de NIE por grupos de edad en mujeres con citología ASCUS del hospital Clínico Regional Valdivia (2004), fue la siguiente: 37.5% (6/16) para las menores de 25 años, 19.2% (5/26) para las de edad entre 25 y 34 años, 26.9% (7/26) para las de edad entre 35 y 44 años, 10% (4/40) para las mayores de 45 años (Gráfico 2). Por grupos de edad, la NIE I se encontró en el 50% (2/4) de las menores de 25 años y en 50% (2/4) de edad entre 25 y 34 años, NIE I a II en el 100% de menores de 25 años, NIE II en el 50% (3/6) de edad entre 35 y 44 años, en el 33.3% (2/6) en mayores de 45 años y 16.7% de edad entre 25 y 34 años, NIE III en el 40%

(4/10) de edad entre 35 y 44 años y en el 20% (2/10) de menores de 25 años, de edad entre 25 y 34 años y mayores de 45 años, respectivamente (datos no mostrados).

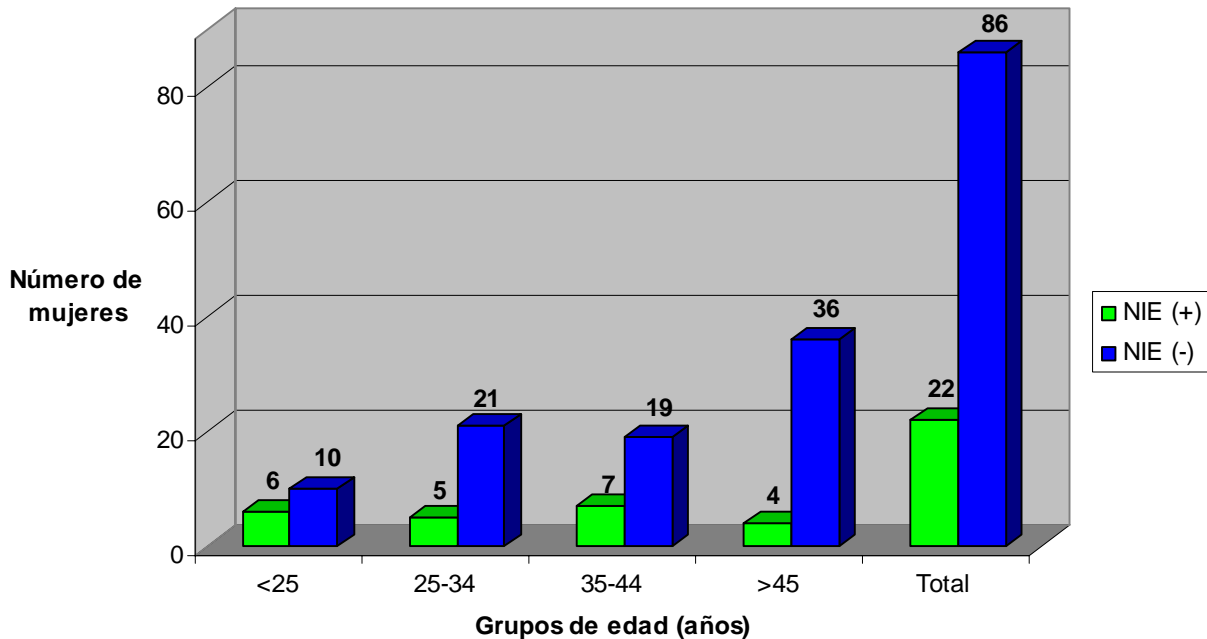


Gráfico 2: Distribución de grupos de edad pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004), según NIE.

La distribución de prevalencia de la infección por HPV en NIEs, por grupos de edad de mujeres con citología ASCUS, fue 25% (4/16) para las menores de 25 años, 11.5% (3/26) para las de entre 25 y 34 años, 15.4% (4/26) para las entre 35 y 44 años y 5% (2/40) para las mayores de 45 años (Gráfico 3). Las NIEs más frecuentes asociadas a presencia de HPV por grupos de edad fueron NIE I en el 100% (1/1) de las menores de 25 años, NIE I a II en el 100% (2/2) para menores de 25 años, NIE II en el 50% (2/4) de 35 a 44 años, en el 25% (1/4) de 25 a 34 años y en el 25% (1/4) de mayores de 45

años, NIE III en el 33.3% (2/6) de 25 a 34 años, en el 33.3% (2/6) de 35 a 44 años, en el 16.7% (1/6) de menores de 25 años y en el 16.7% (1/6) de mayores de 45 años (Datos no mostrados).

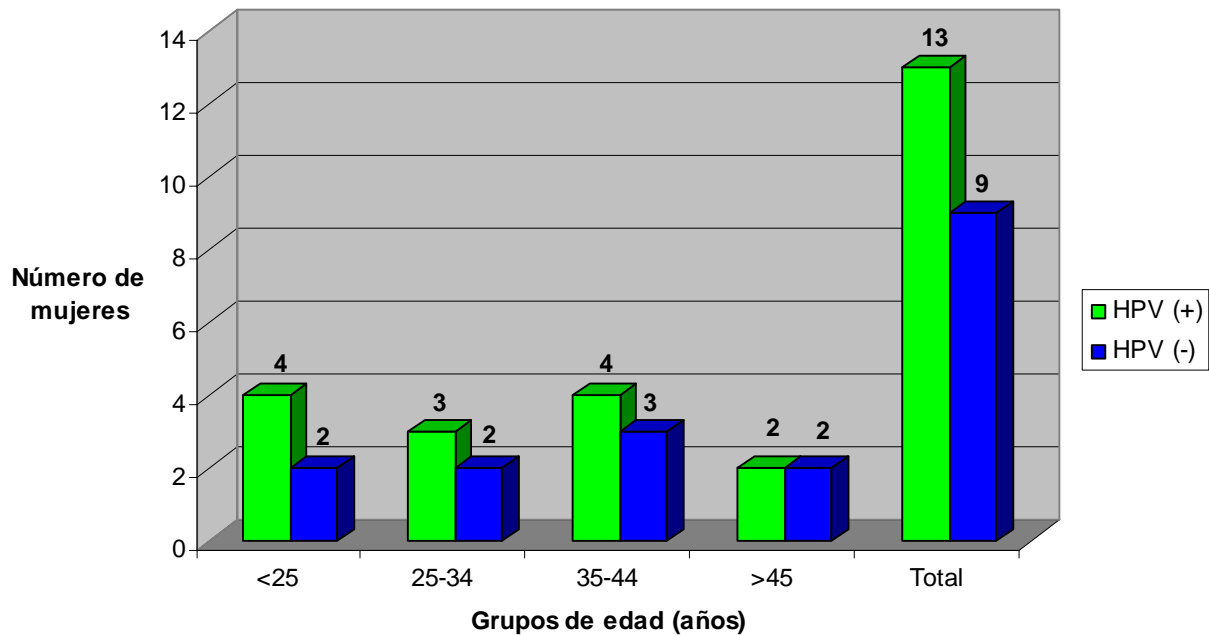


Gráfico 3: Distribución de NIEs en grupos de edad de pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004), según HPV.

La infección por HPV en NIE I a II fue de 100% (2/2), NIE II de 66.7% (4/6), NIE III de 60% (6/10) y NIE I de 25% (1/4) (Gráfico 4). Descendentemente, las neoplasias intraepiteliales cervicales más comunes asociadas a presencia de HPV, fue NIE III en el 46% (6/13), NIE II en el 31% (4/13), NIE I a II en el 15% (2/13) y NIE I en el 8% (1/13) (Gráfico 4).

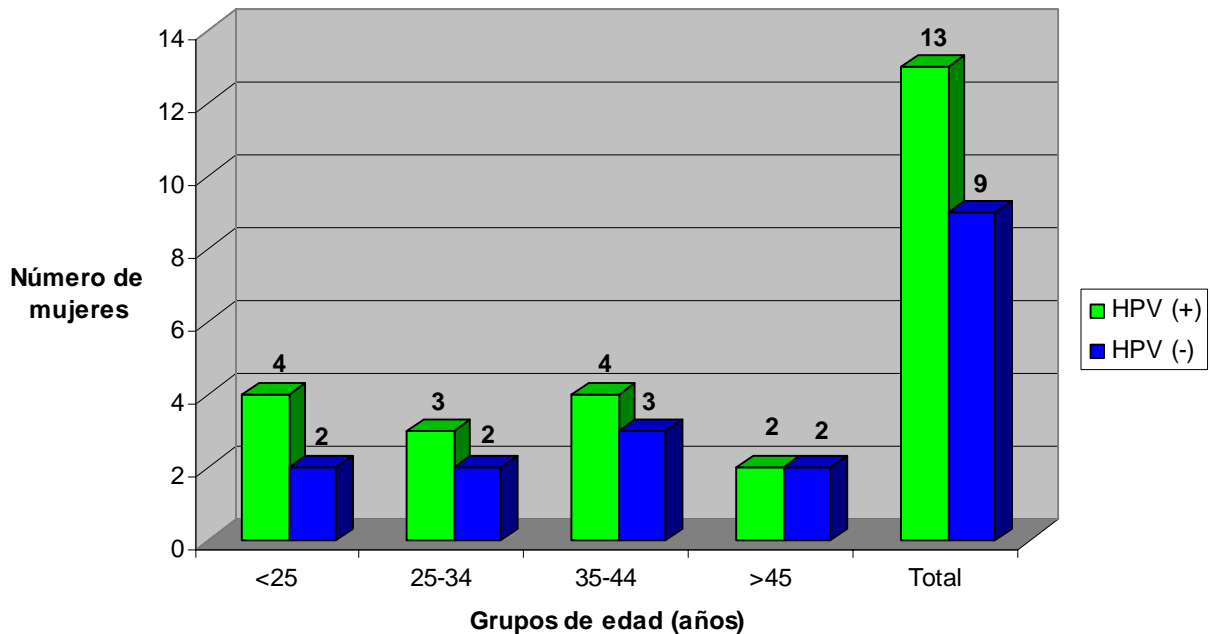


Gráfico 4: Distribución de grados de NIEs en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004), según HPV.

4.8 Distribución de NIEs, según genotipos de HPV, en pacientes con citología ASCUS.

Los genotipos de HPV de alto riesgo, se encontraron en las progresiones de lesiones de bajo y alto grado oncogénico. No se encontró genotipos de HPV de bajo riesgo en lesiones intraepiteliales cervicales de bajo grado oncogénico. Los genotipos de HPV que se encontraron en las progresiones NIEs fueron, HPV 16 en el 50% (1/2) de NIE I a II, en el 66.7% (4/6) de NIE II, en el 30% (3/10) de NIE III; el HPV 58 en el 25% de NIE I, en el 50% (1/2) de NIE I a II; HPV 18 en el 10% (1/10) de NIE III; HPV 52 en el 10% (1/10) de NIE III y en coinfección los HPV 16 y 18 en el 10% (1/10) de NIE III (Tabla 11).

Tabla 11: Número de tipos de HPVs asociados con los grados de NIEs en pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004).

Tipo HPV	NIE I	NIE I a II	NIE II	NIE III	Total
HPV 16	-	1 (50%)	4 (66.7%)	3 (30%)	8
HPV 58	1 (25%)	1 (50%)	-	-	2
HPV 18	-	-	-	1 (10%)	1
HPV 52	-	-	-	1 (10%)	1
HPV 16 y 18	-	-	-	1 (10%)	1
Sin HPV	3	-	2	4	9
Total NIE	4	2	6	10	22

4.9 Características sociodemográficas, ginecológicas y obstétricas de pacientes con citología ASCUS.

La edad de las pacientes del presente estudio osciló entre 16 y 70 años, con un promedio de 39.1 años. El grupo de edad más frecuente de pacientes con citología ASCUS, fue el de mayores de 45 años, con el 37% (40/108); de 25 a 34 años, con el 24.1% (26/108); de 35 a 44 años, con el 24.1% (26/108) y las menores de 25 años, con el 14.8% (16/108) (Tabla 12). La prevalencia de infección por HPV en grupos de edad de pacientes con citología ASCUS, fue de 56.2% (9/16) para las menores de 25 años, de 30.8% (8/26) para la edad entre 25 y 34 años, de 19.2% (5/26) para la edad entre 35 y 44 años y de 10% (4/40) para las mayores de 45 años (Tabla 12). Se observó una mayor prevalencia de infección por HPV en las pacientes de menor edad que fue disminuyendo a través de los rangos de edad (Gráfico 5). Al realizar la prueba de Chi

cuadrado a los grupos de edad, se obtuvo un valor de 14.4 con tres grados de libertad (ANEXO), por lo tanto se considera que existen diferencias significativas en la característica de edad entre las pacientes HPV positivas y negativas (Tabla 12).

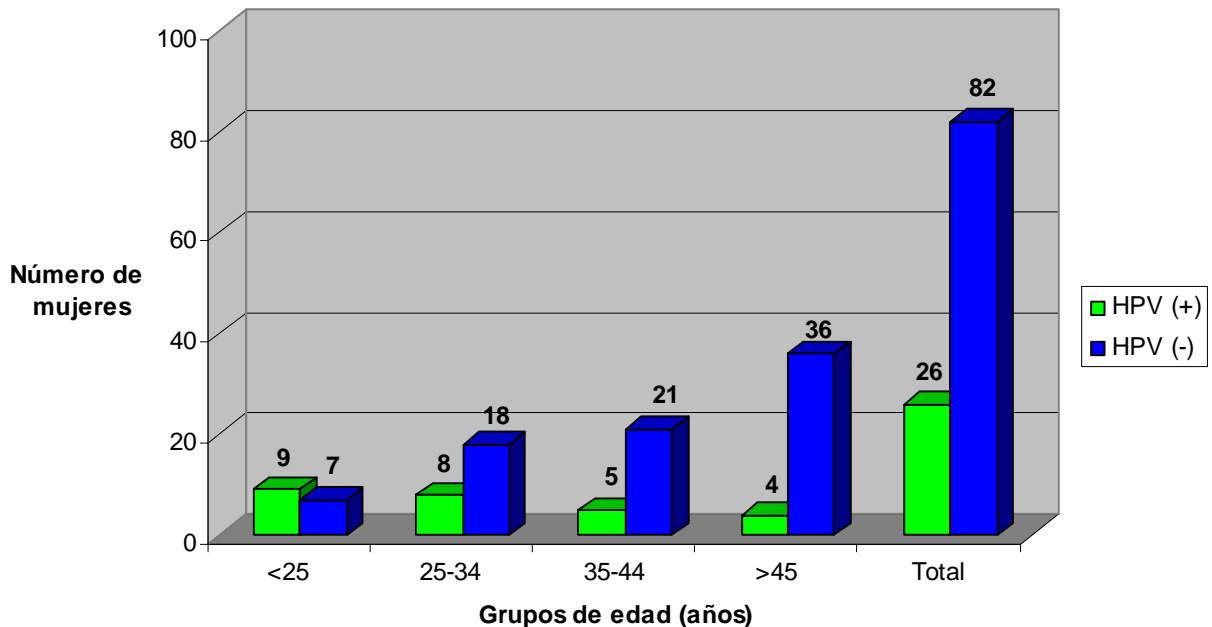


Gráfico 5: Distribución de grupos de edad de pacientes con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004), según HPV.

Considerando el estado civil de las pacientes, para el análisis se agruparon en solteras, casadas y convivientes/separadas/viudas. Las casadas representaron el 52% (53/102), las convivientes/separadas/viudas el 33.3% (34/102) y las solteras el 14.7% (15/102). La prevalencia de infección por HPV en las solteras correspondió al 40% (6/15), en las casadas al 22.6% (12/53) y en las convivientes/separadas/viudas al 20.6% (7/34) (Tabla 12). La mayor infección por HPV se encontró en las solteras,

seguida, en las casadas y en las convivientes/separadas/viudas. Sin embargo, la prueba de Chi cuadrado arrojó un valor de 2.3, con dos grados de libertad (ANEXO), lo que informa que no existen diferencias significativas entre los estados civiles, en las mujeres con y sin infección viral (Tabla 12).

Educacionalmente, las participantes fueron clasificadas en tres grupos de acuerdo a los años de estudios cursados, éstos fueron: básica con hasta 8 años, media hasta 12 años y superior más de 12 años. De esta manera, las mujeres en el grupo de básica correspondieron al 45.1% (46/102), media al 43.1% (44/102) y superior al 11.8% (12/102). La prevalencia de infección por HPV en los grupos de educación en las pacientes, fue la siguiente: 38.6% (17/44) para las de media, de 19.6% (9/46) para las de básica y de 0% (0/12) para las de superior (Tabla 12). La prueba de Chi cuadrado dio un valor de 9, con dos grados de libertad (ANEXO), lo que se traduce en diferencias significativas en los años de estudio entre las pacientes con y sin infección por HPV.

Asimismo, la característica de tabaquismo fue agrupada en tres tipos en las pacientes: fumadoras el 36.3% (37/102); nunca han fumado, el 32.3% (33/102) y ex fumadoras, el 31.4% (32/102). La prevalencia de infección por HPV en las fumadoras actuales fue de 35.1% (13/37), en las ex fumadoras de 25% (8/32) y en las sin tabaquismo, el 15.2% (5/33). El valor de Chi cuadrado fue de 3.7 con dos grados de libertad (ANEXO), no encontrándose diferencias significativas entre las mujeres con presencia y ausencia del virus relacionadas con el hábito de fumar (Tabla 12), aunque la infección por HPV se encuentra en las fumadoras, seguido de las ex fumadoras.

También se analizó la procedencia de las mujeres con citología ASCUS, de las cuales el 65.7% (71/108) correspondían al sector urbano y 34.3% (37/108) al sector

rural. La prevalencia de infección por HPV en las pacientes del sector urbano fue de 25.4% (18/71) y las del sector rural de 21.6% (8/37). Un valor de 0.2 con un grado de libertad (ANEXO) se obtuvo en la prueba de Chi cuadrado, lo que indicó que no hubo diferencias significativas entre las pacientes del sector urbano y rural con la presencia y ausencia de HPV (Tabla 12).

En este estudio, la edad de la primera relación sexual fluctuó entre 13 y 39 años y las edades menores a estas, se consideraron abusos sexuales que oscilaron entre los 4 y 11 años. La media de estas, fue de 17 años. Se agruparon en rangos de menores de 17 años con el 43.4% (46/106), de 17 a 18 años con el 22.6% (24/106), de mayores de 20 años con el 18.9% (20/106) y de 19 a 20 años con el 15.1% (16/106). La prevalencia de infección por HPV en la edad de la primera relación y abuso sexual de las mujeres con citología ASCUS fue de 26.1% (12/46) para las menores de 17 años, de 25% (6/24) para las de 17 a 18 años, de 25% (5/20) para las mayores de 20 años y de 12.5% (2/16) para las de 19 a 20 años. El valor de la prueba de Chi cuadrado fue de 1.3, con tres grados de libertad (ANEXO), lo que demuestra que en este estudio no se encontró diferencias significativas en la edad de iniciación sexual en las mujeres con y sin la presencia de HPV (Tabla 13). Sin embargo, se observó una mayor prevalencia de infección por HPV en mujeres en las que el inicio sexual fue más temprano.

Igualmente, se estudió el comportamiento sexual de las mujeres, las que han tenido una pareja sexual en toda su vida representaron el 41.8% (41/98), las que han tenido entre 2 y 3, el 41.8% (41/98) y las que han tenido más de 3 compañeros sexuales, el 16.3% (16/98). La prevalencia de infección por HPV en las mujeres con citología ASCUS, que han tenido una pareja sexual en toda su vida, fue de 24.4%

(10/41); las que han tenido entre 2 y 3, de 24.4% (10/41) y las que han tenido más de 3 parejas sexuales, de 18.8% (3/16). La prueba de Chi cuadrado mostró un valor de 0.2, con dos grados de libertad (ANEXO); por esto no existe diferencia significativa en el número de parejas sexuales de las mujeres con o sin la presencia viral de HPV (Tabla 13).

En relación al número de partos, las seleccionadas fueron clasificadas, entre 2 y 3 partos, el 48% (46/96); con 1 parto, el 26% (25/96) y más de 3 partos, el 26% (25/96). La prevalencia de infección por HPV por partos en las mujeres con citología ASCUS, fue 28% (7/25) para las con 1 parto, 24% (11/46) para las entre 2 y 3 partos y 8% (2/25) para las de más de 4 partos (Tabla 13). El valor de Chi cuadrado fue de 3.5 con dos grados de libertad (ANEXO), no habiendo diferencias significativas en el número de partos de las pacientes con y sin infección del virus papiloma humano. No obstante, existió una mayor prevalencia de infección por HPV en las mujeres con menos partos.

Tabla 12: Características sociodemográficas de las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004).

Características de mujeres seleccionadas	HPV (+)	HPV (-)	Total
EDAD *			
<25	9	7	16
25-34	8	18	26
35-44	5	21	26
>45	4	36	40
Total	26	82	108

* $p < 0.05$

† $p > 0.05$

Continuación tabla 12: Características sociodemográficas de las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004).

ESTADO CIVIL †	HPV (+)	HPV (-)	Total
Soltera	6	9	15
Casada	12	41	53
Conviviente/Separada/ Viuda	7	27	34
Total	25	77	102
EDUCACION *	HPV (+)	HPV (-)	Total
Básica	9	37	46
Media	17	27	44
Superior	0	12	12
Total	26	76	102
TABAQUISMO †	HPV (+)	HPV (-)	Total
Fumadora	13	24	37
Nunca	5	28	33
Ex fumadora	8	24	32
Total	26	76	102
PROCEDENCIA †	HPV (+)	HPV (-)	Total
Urbano	18	53	71
Rural	8	29	37
Total	26	82	108

* $p < 0.05$

† $p > 0.05$

Tabla 13: Características ginecológicas y obstétricas de las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia (2004).

EDAD PRIMERA RELACION SEXUAL †	HPV (+)	HPV (-)	Total
<17	12	34	46
17-18	6	18	24
19-20	2	14	16
>20	5	15	20
Total	25	81	106
NUMERO PAREJAS DE LA MUJER †	HPV (+)	HPV (-)	Total
1	10	31	41
2-3	10	31	41
>4	3	13	16
Total	23	75	98
NUMERO DE PARTOS †	HPV (+)	HPV (-)	Total
1	7	18	25
2-3	11	35	46
>4	2	23	25
Total	20	76	96

* $p < 0.05$

† $p > 0.05$

5. DISCUSIÓN

La infección por el virus papiloma humano es una de las enfermedades de transmisión sexual más común (Conejero *et al*, 2004; Eileen, 2003; Hernández-Girón *et al.*, 2005; Schiffman *et al.*, 2005; Touzé *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2006), se han descrito más de 100 genotipos de HPV, entre los cuales hay de bajo y alto riesgo oncogénico. Éstos están implicados en verrugas comunes, verrugas genitales (condilomas acuminados), NIE I, NIE II, NIE III, carcinoma cervix uterino *in situ* e invasor. Schiffman *et al.*, (2005) sugieren que la persistencia de infección por HPV está altamente asociada con la progresión neoplásica y causa todo tipo de cánceres cervix uterinos (99.7%) (Araya, 2006; Eileen, 2003). En este trabajo se estudió la prevalencia viral y los genotipos asociados a las lesiones cervix uterinas y las características sociodemográficas, ginecológicas y obstétricas de las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia durante el año 2004.

En la actualidad, como método diagnóstico preventivo de cáncer cervix uterino, se utiliza el análisis citológico para identificar el porcentaje de células ASCUS presentes en la muestra. No obstante, este análisis no detecta la presencia del virus papiloma humano en las lesiones ASCUS. El poder identificar una muestra positiva para la presencia de HPV, es de gran valor presuntivo, debido a la existencia de HPV de alto y bajo grado oncogénico. Por ello se optimizó la técnica PCR-RFLP, con los partidores MY09/11 que originan un producto de 450 pb de la región L1 del genoma viral. Posteriormente el producto amplificado se digirió con las enzimas *Hinf I*, *Pst I*, *Sau 3AI*, *Rsa I*, *Hae III*, *Bam HI* y *Dde I*, generando patrones de digestión que son visualizados

en geles de poliacrilamida. Con ello se pueden detectar hasta 35 genotipos de HPVs, incluidos de bajo y alto riesgo oncogénico (Tabla 7). Sabiendo que el virus papiloma humano existe en lesiones de bajo grado se pueden tratar éstas más tempranamente, disminuyendo las progresiones de NIE II, NIE III o cáncer *in situ* y cáncer invasor. Ello se traduce en la reducción de gastos en los tratamientos de estas lesiones intraepiteliales cervix uterinas para el servicio de salud y en el aumento de la calidad de vida de las mujeres de la población general.

La técnica de amplificación con los partidores MY09/11, resultó muy sensible para la detección de partículas virales. Castle *et al.*, (2002), destacaron que estos partidores, detectaron el 95% de las lesiones NIE III a cáncer infectadas por HPV en Costa Rica.

Es evidente que la visualización de patrones de digestión en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Figura 2A) es menos resolutivo y sensible que en geles de poliacrilamida teñido con nitrato de plata (Figura 2B), existiendo bandas que no se ven en geles de agarosa, pero que se aprecian perfectamente en geles de poliacrilamida (Figura 2). Los geles de poliacrilamida son más resolutivos que los de agarosa debido a que al aumentar la concentración de bisacrilamida y acrilamida, se forman poros más pequeños que los de agarosa permitiendo una mayor resolución de las bandas (García, 2000; CIMMYT, 2006). Además, Barro *et al.*, (2000) señalaron que la tinción con nitrato de plata es entre 10 y 50 veces más sensible que la tinción con bromuro de etidio.

En el Laboratorio de Biología Molecular Aplicada de la Universidad Nacional de Misiones, se analizaron 29 muestras de este trabajo por el método de PCR Nested

Multiplex (Sotlar, *et al.*, 2004). Con la excepción de un genotipo HPV 58 que fue genotificado como una coinfección 58 y 59, el resto coincidió plenamente con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio.

También, 19 muestras de este trabajo, se analizaron en el Instituto Malbran, Argentina, coincidiendo en 10 genotipos. Sin embargo, 9 muestras que para nuestro estudio fueron negativas, en el Instituto Malbran, dieron amplificaciones débiles para la genotificación por RFLP. Estas fueron amplificadas posteriormente con los partidores Gp5+/6+ y tipificadas mediante dot blot. Se obtuvo los siguientes genotipos, dos muestras con el genotipo 18, seis en coinfecciones de HPVs 16 y 18, una coinfección de los genotipos 11, 16 y 18, finalmente una en coinfección de los genotipos 11, 16, 18 y 31, las que en el presente trabajo utilizando la técnica de PCR con los partidores MY09/11, resultaron negativas para HPV. Esto podría explicarse por el uso de diferentes técnicas de PCR y partidores, ya que Husnjak *et al.*, (2000), al comparar la técnicas de PCR con los partidores MY09/11 y la PCR Nested con los partidores MY09-11/GP5-GP6, encontraron un 38.8% de muestras que fueron positivas con la técnica PCR Nested MY09-11/GP5-GP6, pero fueron negativas por la técnica PCR con los partidores MY09/11. Concluyeron que para la detección de bajas copias virales de HPV en muestras, es más conveniente utilizar la técnica PCR Nested con los partidores MY09/11-GP5/GP6.

En relación a las pacientes analizadas en el presente trabajo, la prevalencia fue de 24% (26/108) para infecciones por HPV en las muestras de las mujeres con citología ASCUS que acudieron al Hospital Clínico Regional Valdivia (Tabla 8). En cambio, la prevalencia de infección por HPV en la población general de mujeres, es de 14%, en

Santiago de Chile. En países como México es de 14.5%, Costa Rica de 16%, Colombia de 14.8% (Ferreccio *et al.*, 2004), en Paraguay de 19.8% y en Brasil de 17% (Tamayo, 2002). En Europa, específicamente, Italia es de 15.9% (Centurioni *et al.*, 2005).

En este trabajo, los genotipos de alto riesgo oncogénico fueron los más frecuentes, con el 96% (25/26) de los casos, similar a la reportada por Ferreccio *et al.*, (2004) con el 71% (87/122) de los casos, estudio realizado en Santiago. Igualmente los genotipos 16, 58, 18, 31, 52, 33 y 11 encontrados en este trabajo coincidieron entre los señalados por Ferreccio *et al.*, (2004) en su estudio. Más aún, Melo *et al.*, (2003) en un trabajo realizado en Temuco, encontró los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 45 y 52, concordando con la mayoría de los genotipos encontrados en el presente trabajo, estos fueron el 16, 18, 31, 33 y 52.

Del mismo modo, la frecuencia de los genotipos encontrados para las mujeres con citología ASCUS del Hospital Clínico Regional Valdivia, fue de 42.3% (11/26) para el HPV 16, de 23.2% (6/26) para el HPV 58, de 7.7% (2/26) para el HPV 18, de 7.7% (2/26) para el HPV 31, de 7.7% (2/26) para el HPV 52, de 3.8% (1/26) para el HPV 11, de 3.8% (1/26) para el HPV 33 y de 3.8% (1/26) para la coinfección de HPV 16 y 18 (Gráfico 2). Mundialmente, el genotipo 16 y 18 representa el 50% y 14% de los casos, respectivamente (Conejero *et al.*, 2004). Asimismo, los genotipos más comunes que obtuvo Ferreccio *et al.*, (2004) fueron el 16, 56, 31, 58, 59, 18 y 52, en mujeres que seleccionaron al azar en la ciudad de Santiago. En el caso de Melo *et al.*, (2003) fueron el 33, 16, 52, 31, 35 y 18, encontrados en biopsias de cuello uterino de mujeres que acudieron al Hospital de Temuco. En Argentina, los genotipos encontrados son 16, 6, 11, 33 y 18 (Abba *et al.*, 2003). En Paraguay, en carcinoma cervix uterino fueron el 16,

18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59 y 61 (Rolón *et al.*, 2000). En México, son el 16, 18, 6, 31, 11, 33, 35, 39 y 51 (Tamayo, 2002). En América Latina son el 33, 39, 58 y 59 (Touzé *et al.*, 2001), en Australia son el 53, seguido del 16 y 52 (Brestovac *et al.*, 2005). En Japón los más comunes fueron el 4, 65, 27, 2a, 57b, 16, 6a, 63, en el estudio de Hagiwara *et al.*, (2005). Claramente, la distribución y frecuencia de genotipos de HPV difiere en los distintos países del mundo. Sin embargo, los genotipos 16, 18 y 33 fueron encontrados en el presente trabajo y en los estudios de Ferreccio *et al.*, (2004), Melo *et al.*, (2003), Abba *et al.*, (2003), Rolón *et al.*, (2000) y Tamayo, (2002).

Con respecto a los PAP atípicos de las pacientes con citología ASCUS, el más frecuente fue H1, seguido de H2, H3 y H4 (Tabla 9). Esto se puede explicar debido a que H1 incluye en su clasificación las células escamosas con reparaciones atípicas y sospecha de lesión de bajo grado por HPV y NIE I; H2 a las células escamosas sugerentes de lesiones de bajo grado como NIE II, III o cáncer *in situ* y sospecha de cáncer invasor; H3 y H4 se refieren a células glandulares atípicas. Por lo tanto, es de esperar mayor frecuencia de PAPs H1 y H2, ya que estos fueron los seleccionados para el estudio de citología ASCUS en mujeres del Hospital Clínico Regional Valdivia. La mayor prevalencia de infección por HPV fue para H4, con el 50% (2/4); H1 con el 29% (14/48); H2 con el 21.6% (8/37) y H3 con el 10.5% (2/19). Esta alta prevalencia de H4 se debe a los pocos casos analizados, la de H1, H2 y H3 son más frecuentes con la prevalencia general de infección por HPV de 24% en las mujeres con citología ASCUS de esta tesis.

En esta investigación, las progresiones NIEs se encontraron en el 20% (22/108) de todas las pacientes con citología ASCUS (Tabla 10). Precisamente, en el 59%

(13/22) de NIEs se encontró infección por algún genotipo de HPV, demostrando una asociación entre la presencia de infección por HPV y la progresión de una neoplasia intraepitelial cervical. Es más, la prueba de Chi cuadrado encontró diferencias significativas entre la presencia de infección por HPV en las lesiones NIE y la ausencia de NIE sin infección viral.

La prevalencia de NIEs en las mujeres con citología ASCUS, para NIE III fue de 9.2%, NIE II de 5.5% y NIE I de 3.7%. Siendo las NIEs más frecuentes NIE II y III, similar a lo reportado por Guzmán *et al.*, (2005) en el Hospital Clínico Regional Valdivia entre los años 1993 y 2003.

NIE I se encontró mayoritariamente entre menores de 25 años y 34 años, NIE II entre 35 y 44 años y NIE III entre 35 y 44 años (Gráfico 2), siendo similar a la prevalencia máxima señalada por Serman (2002) para NIE I entre 15 y 30 años, NIE II entre 30 y 34 años y NIE III entre 35 y 49 años, excepto por el rango de edad de NIE II. En esta tesis, la frecuencia de infección por HPV en las progresiones NIEs en las citología ASCUS, fue de 25% (1/4) para NIE I, de 100% (2/2) para NIE I a II, de 66.7% (4/6) para NIE II y de 60% (6/10) para NIE III (Gráfico 4). En contraste, en el estudio de Abba *et al.*, (2003), la infección por HPV fue 80% para LSIL, de 97% para HSIL y de 100%, para los carcinomas de células escamosas. Este resultado fue similar a lo reportado por Melo *et al.*, (2003) de 88% para LSIL, 89% para HSIL y de 93.5% para carcinoma invasor. Estas diferencias podrían deberse a que los autores Abba *et al.*, (2003) y Melo *et al.*, (2003) analizaron muestras de bajo riesgo oncogénico, de alto riesgo oncogénico y de cáncer invasor; por el contrario en esta tesis sólo se examinaron muestras de pacientes con citología ASCUS.

Los genotipos de alto riesgo oncogénico se encontraron en las NIEs II y III de alto riesgo oncogénico, excepto por el genotipo 58 de alto riesgo oncogénico que se encontró en una NIE I de bajo riesgo oncogénico. Estos genotipos fueron, HPV 16 en NIE I a II, NIE II y NIE III, HPV 58 en NIE I y NIE I a II, HPV 18 en NIE III, HPV 52 en NIE III y la coinfección 16 y 18 en NIE III (Tabla 11). En cambio, Brestovac *et al.*, (2005) reportaron el HPV 58 en NIE II y NIE III, y los genotipos 16, 18, 31 y 33 en NIE I, II y III.

La prevalencia máxima de infección por HPV en las pacientes con citología ASCUS se encontró en las menores de 25 años y luego disminuyó progresivamente (Gráfico 5 y Tabla 12). Estadísticamente, la prueba de Chi cuadrado mostró diferencias significativas en la característica de edad de las pacientes con presencia y ausencia de HPV (Tabla 12). Ferreccio *et al.*, (2004), reportaron esta disminución progresiva de prevalencia en pacientes de la ciudad de Santiago. No obstante se, incrementó sobre los 45 años de edad.

El estado civil de las pacientes no mostró diferencias significativas con respecto a la infección por HPV, según la prueba de Chi cuadrado (Tabla 12), coincidiendo con los estudios de Ferreccio *et al.*, (2004) y Hernández-Girón *et al.*, (2005).

La educación mostró diferencias significativas con la presencia infección por HPV, según la prueba de Chi cuadrado (Tabla 12), siendo similar a los trabajos de Ferreccio *et al.*, (2004) y Hernández-Girón *et al.*, (2005) de mujeres embarazadas de México.

La característica de tabaquismo no mostró asociación con la infección por HPV en las mujeres con citología ASCUS, según la prueba de Chi cuadrado (Tabla 12). En la tesis de Tamayo (2002), no hubo asociación entre la presencia de HPV y cáncer cervix

uterino coincidiendo, con estudios de México, Filipinas, Tailandia y Paraguay. Sin embargo, en los trabajos de Ferreccio *et al.*, (2004) y Hernández-Girón *et al.*, (2005) se encontró asociación entre presencia de infección por HPV y hábito de fumar.

En este trabajo, no se encontró diferencias significativas entre la procedencia de las pacientes y la infección por HPV (Tabla 12), equivalente al estudio de Tamayo, (2002).

No se encontró diferencias significativas entre la edad de iniciación sexual y la infección por HPV, pero había una tendencia de mayor prevalencia hacia las edades menores de iniciación sexual (Tabla 13), similar al trabajo de Ferreccio *et al.*, (2004) de la ciudad de Santiago, tampoco Hernández-Girón *et al.*, (2005) reportó diferencias significativas en mujeres embarazadas de México. Aunque Touzé *et al.*, (2001) indicó que el inicio temprano de la primera relación sexual incrementa la prevalencia de infección por HPV, y Tamayo, (2002) señaló que el inicio temprano de la iniciación sexual, antes de los 17 años, fue un factor de riesgo asociado con las lesiones de alto grado oncogénico a cáncer invasor en su investigación en México. En otro estudio, Rolón *et al.*, (2000) indicaron que el inicio sexual antes de los 17 constituye un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervix uterino.

El número de parejas sexuales de toda la vida de la mujer no mostró diferencias significativas con respecto a la infección por HPV en este trabajo (Tabla 13). Sin embargo, Hernández-Girón *et al.*, (2005), señalaron que las mujeres que han tenido tres o más parejas sexuales en su vida tuvieron dos veces más posibilidades de infectarse por HPV. Ferreccio *et al.*, (2004) reportaron diferencias significativas en el número de parejas sexuales con la infección por HPV en mujeres de la población general en

Santiago; Touzé *et al.*, (2001) indicaron que la prevalencia de infección por HPV incrementa con el número de parejas sexuales y Sánchez-Alemán *et al.*, (2002) encontraron asociación entre la infección por HPV y el comportamiento sexual, de más de 2 parejas sexuales en la vida de estudiantes universitarios, siendo mayor la prevalencia de infección viral en mujeres.

El número de partos no mostró diferencias significativas con respecto a la infección por HPV en este estudio (Tabla 13), coincidiendo con los trabajos de Hernández-Girón *et al.*, (2005) de mujeres embarazadas de México y Gaitán *et al.*, (2004) en mujeres con anormalidades citológicas de Bogotá, Colombia.

Las características sociodemográficas, ginecológicas y obstétricas de las pacientes con citología ASCUS anteriormente nombradas, no constituyen factores de riesgo en la infección por HPV en estas pacientes ni para las mujeres de la población general. Debido a que en el presente estudio solo se seleccionó pacientes que presentaron citología ASCUS, por lo cual no se pudo hacer un estudio epidemiológico que se pueda extrapolar a la población general de mujeres.

En este estudio la citología ASCUS, presentó 24% (26/108) de presencia de HPV, de los cuales 96% (25/26) fueron genotipos de alto riesgo oncogénico. Esto apunta a la importancia de la aplicación del test de HPV en las pacientes con citología ASCUS, lo que permitiría seleccionar el grupo de pacientes con HPV de alto riesgo para su seguimiento posterior y tomar decisiones oportunas.

La principal aplicación de este trabajo, corresponde al aporte de información para evaluar la implementación de la vacuna para prevenir infecciones por HPV en nuestro país. Esto último, tiene la finalidad de evitar el cáncer cervix uterino que provoca el

fallecimiento de 676 mujeres cada año en nuestro país (Prieto, 2006). Actualmente, existen dos tipos de vacuna, la tetravalente que protege de las infecciones por los genotipos 6, 11, 16 y 18, de Gardasil de Merck y la bivalente de los genotipos 16 y 18, de Cervarix de GSK (Araya, 2006; Koutsky y Harper, 2006). No obstante, en el presente estudio se encontró los genotipos 16, 58, 31, 52, 18, 33, 11; en el trabajo de Melo *et al.*, (2003), realizado en biopsias de cuello uterino del Hospital de Temuco, los genotipos 33, 16, 52, 31, 35 y 18; y los genotipos más comunes reportados por Ferreccio *et al.*, (2004), quien realizó un estudio de prevalencia en Santiago de Chile, fueron el 16, 56, 31, 58, 59, 18 y 52. De acuerdo a lo anterior, los genotipos que se encontraron en los tres estudios fueron el 16, 31, 52 y 18. Por estas razones, las vacunas antes mencionadas, no protegerían contra los genotipos de HPV más comunes en la población de Chile.

Finalmente, se plantea que se debería llevar a cabo un estudio con las mismas variables utilizadas en este estudio, pero usando el método de caso y control para que puedan ser extrapolados a la población general y determinar si existen factores de riesgo oncogénicos. Esto es, usando de caso las mujeres con PAP atípicos y de control, mujeres tomadas al azar de la población, en ambas se deben hacer el mismo análisis de citología, detección, genotipificación y estudio estadístico para observar las diferencias significativas y sus posibles factores de riesgo asociados.

5.1. CONCLUSIONES

- El método PCR-RFLP con los partidores MY09/11, digiriendo con las enzimas *Hinf I*, *Pst I*, *Sau 3AI*, *Rsa I*, *Hae III*, *Bam HI* y *Dde I*, sirve para la detección y genotipificación de HPVs en las citología ASCUS.
- La prevalencia de infección por HPV fue de 24% en las mujeres con citología ASCUS.
- El genotipo 16, seguido del 58 fueron los más comunes en las pacientes.
- El 24% de las pacientes con citología ASCUS presentó genotipos de HPV de bajo y alto riesgo oncogénico, siendo estos últimos los más frecuentes.
- Los genotipos de alto riesgo oncogénico se correspondieron con lesiones intraepiteliales cervix uterinas de alto grado.
- El 59% de las NIEs estaban infectadas por HPV.
- Sólo las características sociodemográficas, correspondientes a edad y educación en las pacientes, mostraron diferencias estadísticamente significativas.
- Las mujeres jóvenes presentaron mayor prevalencia de infección por HPV que las de edad avanzada.

6. LITERATURA CITADA

Abba M., Gomez M. y Golijow C. (2003) Distribución de los genotipos del virus papiloma humano en infecciones cervicales en mujeres de la Plata, Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.* 35:74-79.

Alonso P., Lazcano E., Hernández M. (2000). Cáncer cervicouterino diagnóstico, prevención y control. Pág: 3-108; 143-153.

Andújar M. (2004). Virus y Cáncer. *Biocáncer*. Pág: 7-14.

Araya P. (2006). Gineco-obstetras analizan alcance de vacuna que ayuda a prevenir cáncer cervicouterino. *Soc. Chil. Obstet. Ginecol.*
<http://www.sochog.cl/noticias-sochog.php?id=31>

Barro M., Vásquez M., Spencer E. (2000). Caracterización de la región 5' no codificante del virus de la hepatitis C. *Rev. Med. Chil.* 128: 2.

Beby-Defaux A., Bourgoïn A., Ragot S., Battandier D., Lemasson J.M., Renaud O, Bouguermouh S. y Agius G. (2004). Human Papillomavirus Infection of the Cervix Uteri in Women Attending a Health Examination Center of the French Social Security. *J. Med. Virol.* 73:262–268.

Bekkers R., Massuger L., Bulten J., Melchers W. (2004). Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev. Med. Virol.* 14: 95–105.

Bernard H., Chan S., Manos M. (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J. Inf. Dis.* 170: 1077-1085.

Brestovac B., Harnett G., Smith D., Shellam G., Frost F. (2005). Human Papillomavirus Genotypes and Their Association With Cervical Neoplasia in a Cohort of Western Australian Women. *J. Med. Virol.* 73: 106-110.

Boshart M., Gissmann L., Ikenberg H., Kleinheinz A., Scheurlen W., zur Hausen H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO J.* (3) 5: 1151-1157.

Castle P., Schiffman M., Gravitt P., Kendall H., Fishman S., Dong H., Hildesheim A., Herrero R., Bratti M., Sherman M., Lorincz A., Schussler J. y Burk R. (2002). Comparisons of HPV DNA Detection by MY09/11 PCR Methods. *J. Med. Virol.* 68:417–423.

Centurioni M., Puppo A., Merlo D., Pasciucco G., Cusimano E., Sirito R., Gustavino C. (2005). Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. *BMC Inf. Dis.* 77 (5): 1471-2334.

CIMMYT. (2006). Protocolos de laboratorio: laboratorio de genética molecular aplicada de CIMMYT. 3ª Ed. Mexico. D. F. CIMMYT.

Conejero C., Urgilés B., Wensioe K., Ojeda J.M. (2004). Prevención de infecciones por HPV. *Rev Sogia.* 11(2): 58-63.

Donoso E., Cuello M. (2006). Mortalidad por cáncer en la mujer chilena. Análisis comparativo entre los años 1997 y 2003. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 71 (1): 10-16.

Eileen B. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* Pág. 1-17.

Evans A., Kaslow R. (1997). Human papillomaviruses. En: *Viral infections of humans epidemiology and control.* 4ª Ed. Plenum medical book company. New York and London. Pág. 983-1023.

Francesco M., Gargiulo F., Schreiber C., Ciravolo G., Salinaro F., Manca M. (2005). Detection and Genotyping of Human Papillomavirus in Cervical Samples From Italian Patients. *J. Med. Virol.* 75: 588-592.

Fernández-Contreras M., Sarriá C., Nieto S., Lazo P. (2000). Amplification of human genomic sequences by human papillomaviruses universal consensus primers. *J. Med Virol.* 87: 171-175.

Ferreccio C., Prado R., Luzoro A., Ampuero S., Snijders P., Meijer C., Vaccarella S., Jara A., Puschel K., Robles S., Herrero R., Franceschi S., Ojeda J. (2004). Population-based prevalence and age distribution of human Papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(12): 2271-6.

Franco E., Ferenczy A. (2001). Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canad. Med. Assoc. J.*; 164(7).

Fuente M. (2003). Carcinomas cutáneos en los pacientes receptores de un trasplante renal. Estudio de su incidencia, identificación de las variables clínicas relacionadas e investigación de su relación con la infección por el virus del papiloma humano. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona, 145 pp.

Gaitán H., Rubio J., Eslava J. (2004). Asociación de la citología cervico-vaginal inflamatoria con la lesión intraepitelial cervical en pacientes de una clínica de salud sexual y reproductiva en Bogotá, Colombia 1999-2003. *Rev. Salud Pública.* (6):3.

García H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.* 1 (2): 31-41.

Grey G., Coffman W., Kubicek M. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12: 264-265.

Guerrero I., Mejía R., Velazco R., Misad O., Pow-Sang M. (1999). Oncogenes E6-E7 de los papilomavirus humanos de alto riesgo detectados por pcr en biopsias de penes incluidas en parafina. *Rev. Med. Exp.* XV (1-2).

Guzmán S., Salas P., Puente R., Hott H., Israel E., Guzmán R. (2005). Pesquisa y control del cáncer cérvico-uterino en el Servicio Salud Valdivia (1993-2003). *Rev. Med. Chil.* 133: 685-692.

Hagiwara K., Uezato H., Arakaki H., Nonaka S., Nonaka K., Nonaka H., Asato T., Oshiro M., Kariya K., Hattori A. (2005). A genotype distribution of human papillomaviruses by chain reaction and direct sequencing analysis in a large sample of common warts in Japan. *J. Med. Virol.* 77: 107-112.

Hernández-Girón C., Smith J., Lorincz A., Arreola E., Lazcano E., Hernández-Ávila M., Salmerón J. (2005). Prevalencia de infección por virus de papiloma humano

(VPH) de alto riesgo y factores asociados en embarazadas derechohabientes del IMSS en el estado de Morelos. *Salud Pública Mex.* 47:423-429.

Husnjak K., Grce M., Magdic L., Pavelic K. (2000). Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J. Med. Virol.* 88: 125-134.

Jordens J., Lanham S., Pickett M., Amarasekara S., Abeywichrema I., Watt P. (2000). Amplification with molecular beacon primers and reverse line blotting for the detection and typing of human papillomaviruses. *J. Virol. Md.* 89: 29-37.

Joshi S., Gopalkrishna V., Kumar B., Dutta S., Nyaynirgune P., Thakar M., Tripathy S., Mehendale S., Paranjape R. (2005). Cervical squamous intra-epithelial changes and human papillomaviruses infection in women infected with human immunodeficiency virus in Pune, India. *J. Med. Virol.* 76: 470-475.

Koutsky L., Harper D. (2006). Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccines trials. *Vaccine.* 24(S3): 114-121.

Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2002). Cáncer. En : *Biología celular y molecular.* 4º Ed. Panamericana: Buenos Aires. Pág: 1054-1081.

Manos M., Ting Y., Wright D., Lewis A., Broker T., Wolinsky S. (1989). Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cell*. 209-14.

Martínez A., Tapia R., González M., Álvarez I., Coto E., Suárez C. (2001). Asociación entre la integración del virus del papiloma humano y la pérdida de heterocigosidad del gen P53 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol. Esp*. 52: 546-552.

Mathews C., Van Holde K., Ahern K. (2002). Bioquímica. 3º Ed. Pearson Education, S A., Madrid. Pág: 970-972.

Melbye M., Frisch M. (1998). The role of human papillomaviruses in anogenital cancers. *Cancer Biol*. 8: 307-313.

Melo A., Montenegro S., Hooper T., Capurro I., Roa J., Roa I. (2003). Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en las mujeres de la IX Región-Chile. *Rev. Med. Chil*. 131: 1382-1390.

Montes L., Mullins M., Urrutia M. (2006). Calidad de vida en mujeres con cáncer cérvico uterino. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol*. 71 (2): 129-134.

Muñoz F. (2005). Informe cambio de nomenclatura informe PAP. Ministerio de Salud. División prevención y control de enfermedades Depto. Enfermedades no transmisibles.

http://www.minsal.cl/ici/S_1/U_14/Informa_cambio_Nomenclatura_2005.pdf

Nazzari O., Reiner M., Abarzúa A., Liendo R. y Palma C. (2003). Patología preinvasora del cervix. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*, 68(3): 189-196.

Oh S., Longworth M., Laimins L. (2004). Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *J. Virol.* (78) 5: 2620-2626.

Piver S. (2000). Cáncer de cervix. En: *Oncología Ginecológica*: 85-140. Marban libros, S. L. Madrid. España.

Prieto M. (2006). Programa nacional de cáncer cervicouterino. Ministerio de Salud. Unidad de cáncer. http://www.minsal.cl/ici/S_1/U_14/Cacu_publico_2006.pdf.

Rice P., Mant C., Cason J., Bible J., Muir P., Kell B., Best J. (2000). High prevalence of human papillomavirus type 16 infection among children. *J. Med. Virol.* 61:70-75.

Rivera R., Delgado J., Painel V., Barrero R., Larraín A. (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 71 (2): 135-140.

Rolón P., Smith J., Muñoz N., Klug S., Herrero R., Bosch X., Llamosas F., Meijer C., Walboomers J. (2000). Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int. J. Cancer.* 85: 486-491.

Sánchez-Alemán M., Uribe-Salas F., Conde-González C. (2002). La infección por el virus del papiloma humano, un posible marcador biológico de comportamiento sexual en estudiantes universitarios. *Salud Pública Mex.* 44: 442-447.

Serman F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 67(4):318-323.

Schiffman M., Herrero R., DeSalle R., Hildesheim A., Wacholder S., Rodriguez A., Bratti M., Sherman M., Morales J., Guillen D., Alfaro M., Hutchinson M., Wright T., Solomon D., Chen Z., Schussler J., Castle P., Burk R. (2005). The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 337: 76-84.

Solis J. (2004). Manejo del cáncer cervicouterino IB2-IIA. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 69 (5): 384-391.

Sotlar K., Diemer D., Dethleffs A., Hack Y., Stubner A., Vollmer N., Menton S., Menton M., Dietz K., Wallwiener D., Kandolf R., Bültmann B. (2004). Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42 (7): 3176-3184.

Tamayo L. (2002). Asociación y predicción del riesgo de lesión intraepitelial escamosa y cáncer cervicouterino en función de los factores: infección por el virus del papiloma humano, gineco-obstétricos, comportamiento sexual, sociodemográficos y antecedentes genéticos en mujeres mayores de 15 años. Estado de Colima, Mexico, 2002. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Colima. 212 pp.

Touzé A., de SanJosé S., Coursaget P., Almirall M., Palacio V., Meijer C., Kornegay J., Bosch X. (2001). Prevalence of Anti-Human Papillomavirus Type 16, 18, 31 and 58 Virus-Like Particles in Women in the General Population and in Prostitutes. *J. Clin. Microbiol.* 39 (12): 4344-4348.

Wogan G., Hecht S., Felton J., Conney A., Loeb L. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Cancer Biol.* 14: 473-486.

Zur Hausen H. (1996). Papillomavirus infection – a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1288, F55-F78.

7. ANEXO

Clasificación de los informes de PAP.

Códigos Diagnósticos

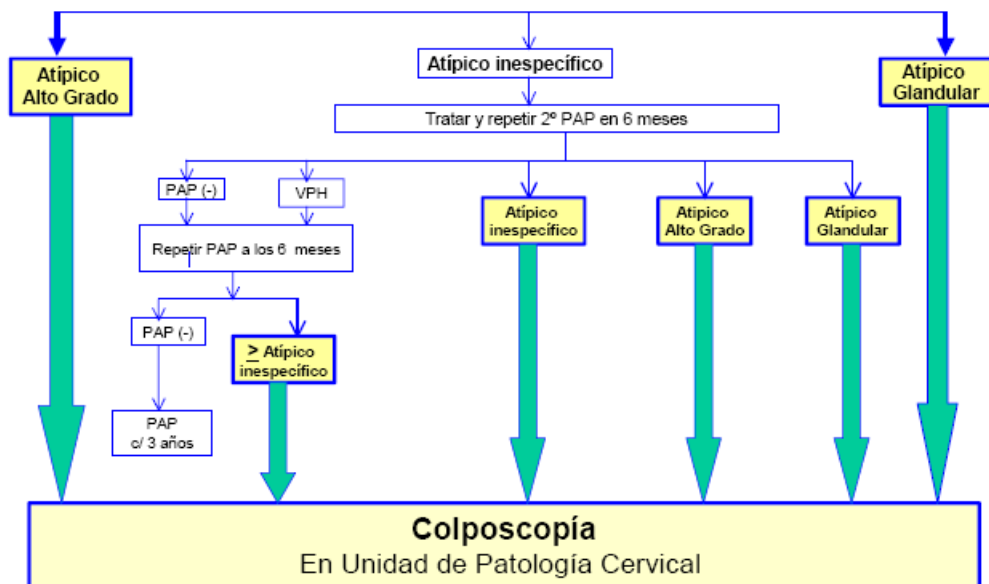
A	Probable Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (NIE I)
A1	Cambios Celulares asociados a infección por HPV
B	Probable Lesión Intraepitelial de Alto Grado (NIE II)
C	Probable Lesión Intraepitelial de Alto Grado (NIE III o Ca. In Situ)
D	Probable Adenocarcinoma
D0	Probable Adenocarcinoma Endocervical In Situ
D1	Probable Adenocarcinoma de origen Endocervical
D2	Probable Adenocarcinoma de origen Endometrial
D3	Probable Carcinoma Adenoescamoso.
E	Probable Carcinoma Escamoso
E1	Probable Carcinoma Indiferenciado
E2	Probable Tumor Maligno Extra Cervical.
F1	Frotis Atrófico
F9	Nota: El índice de maduración no corresponde a la edad de la paciente
G0	Muestra Inadecuada: Contiene solo Células Endocervicales
G1	Muestra Inadecuada: Escasa
G2	Muestra Inadecuada: Hemorrágica
G3	Muestra Inadecuada: Inflamatoria
G4	Muestra Inadecuada: Mal Fijada
G5	Muestra Inadecuada: Escasa y Hemorrágica
G6	Muestra Inadecuada: Escasa e Inflamatoria
G7	No se observan Células Endocervicales ni Metaplasias.
G8	Muestra Satisfactoria
H1	Células Escamosas Atípicas de significado Indeterminado
H2	Células Escamosas Atípicas sugerente de LIE Alto Grado o Ca. Invasor
H3	Células Glandulares Atípicas sugerente de origen Endometrial o Endocervical Reactivas
H4	Células Glandulares Atípicas sugerente de Neoplasia Maligna de origen Endometrial, Endocervical o no definido
I	Negativo para Células Neoplásicas.
J1	Reacción Inflamatoria Inespecífica
J2	Reacción Inflamatoria por Trichomonas
J3	Reacción Inflamatoria sugerente de infección por virus Herpes simplex
J5	Reacción Inflamatoria por Candida
J6	Presencia de Actinomyces
K	Alteraciones degenerativas por Efecto de Radiación
N	Presencia de Células Endometriales Normales.
T	Citar A Patología Cervical para completar estudio

Tipos de PAP y paso a seguir en el diagnostico de cada uno.

Tabla N°1: Definición de PAP Positivo y Sospecha Clínica: (Wright T Jr et al. 2003)	
Definición de PAP Positivo	
<ul style="list-style-type: none"> • PAP sugerente de Cáncer Invasor • PAP sugerente de neoplasia intraepitelial I, II, III o Cáncer In Situ • Primer PAP Atípico <ul style="list-style-type: none"> a) sugerente de lesión de Alto Grado y b) PAP Atípico Glandular • Segundo PAP informado igual o mayor a PAP Atípico Inespecífico 	
Definición de Sospecha Clínica	
<ul style="list-style-type: none"> • Visualización a la especuloscopia de una lesión exocervical proliferativa, sangrante y/o friable. 	

Debido a que el sistema informático requiere que al momento del llenado de las interconsulta de derivación a la UPC, se clasifique en Cáncer Preinvasor ó Cáncer Invasor; se recomienda que sólo los casos con informe citológico "sugerente de cáncer invasor y las sospechas clínicas de cáncer, sean enviadas como "CANCER INVASOR". El resto de los informes citológicos, definidos en la Tabla N° 1, deben ser derivados como PREINVASOR.

ALGORITMO DE DERIVACION A LA U.P.C. DEL PRIMER PAP ATIPICO, SEGÚN CLASIFICACION BETHESDA 2001 *



(* = Adaptación, basada en la publicación JAMA 2002; 287: 2120-9: "Consensus Guidelines for the management of Woman With Cervical Cytological Abnormalities".

Probabilidad y grados de libertad para la prueba de Chi cuadrado.

Grados de libertad	Probabilidad de un valor superior				
	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
1	2,71	3,84	5,02	6,63	7,88
2	4,61	5,99	7,38	9,21	10,60
3	6,25	7,81	9,35	11,34	12,84
4	7,78	9,49	11,14	13,28	14,86
5	9,24	11,07	12,83	15,09	16,75
6	10,64	12,59	14,45	16,81	18,55
7	12,02	14,07	16,01	18,48	20,28
8	13,36	15,51	17,53	20,09	21,95
9	14,68	16,92	19,02	21,67	23,59
10	15,99	18,31	20,48	23,21	25,19
11	17,28	19,68	21,92	24,73	26,76
12	18,55	21,03	23,34	26,22	28,30
13	19,81	22,36	24,74	27,69	29,82
14	21,06	23,68	26,12	29,14	31,32
15	22,31	25,00	27,49	30,58	32,80
16	23,54	26,30	28,85	32,00	34,27
17	24,77	27,59	30,19	33,41	35,72
18	25,99	28,87	31,53	34,81	37,16
19	27,20	30,14	32,85	36,19	38,58
20	28,41	31,41	34,17	37,57	40,00
21	29,62	32,67	35,48	38,93	41,40
22	30,81	33,92	36,78	40,29	42,80
23	32,01	35,17	38,08	41,64	44,18
24	33,20	36,42	39,36	42,98	45,56
25	34,38	37,65	40,65	44,31	46,93
26	35,56	38,89	41,92	45,64	48,29
27	36,74	40,11	43,19	46,96	49,65
28	37,92	41,34	44,46	48,28	50,99
29	39,09	42,56	45,72	49,59	52,34
30	40,26	43,77	46,98	50,89	53,67
40	51,81	55,76	59,34	63,69	66,77
50	63,17	67,50	71,42	76,15	79,49
60	74,40	79,08	83,30	88,38	91,95
70	85,53	90,53	95,02	100,43	104,21
80	96,58	101,88	106,63	112,33	116,32
90	107,57	113,15	118,14	124,12	128,30
100	118,50	124,34	129,56	135,81	140,17