



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EN MUESTRAS DE ORINA Y CITOLÓGICAS EN MUJERES DE LA
CONSULTA DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE CARACAS (HUC)**

Trabajo especial de grado

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Yrneh Y. Prado P. como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutores: Lic. Dayahindara Veitía
Dra. Valentina Salas

CARACAS, VENEZUELA
MAYO, 2014

ÍNDICE

ÍNDICE	
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
FINANCIAMIENTO	VI
DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTOS	VIII
Resumen	IX
Introducción	1
• Virus de Papiloma Humano	3
- Características generales del genoma	3
- Clasificación	5
• Generalidades del útero	6
• Anatomía Macroscópica y Microscópica del Útero	6
- Regiones del Útero	7
- Epitelio Escamoso Estratificado	8
- Epitelio Cilíndrico	9
- Unión Escamoso-Cilíndrica	10
- Zona de Transformación	11
• Cáncer de Cuello Uterino	12
- Asociación del VPH con el Cáncer de Cuello Uterino (CCU)	13
- Diagnóstico del CCU	13
- Factores de Riesgo del CCU	15
- Epidemiología del CCU	18
- Carcinogénesis inducida por VPH	19
• Métodos Moleculares para la detección de VPH	25

• Antecedentes	26
• Justificación	28
Objetivos	29
Metodología	30
• Población en Estudio	30
• Extracción del material genético	32
• Detección de VPH mediante PCR convencional con iniciadores MY09/MY11	33
• Tipificación de VPH	34
• Electroforesis en geles de Agarosa	35
• Pruebas Estadísticas	36
Resultados	36
• Características de la muestra	36
• Detección de VPH	37
• Tipificación de VPH	39
• Comparación de los resultados de detección de VPH entre hisopados cervicales y muestras de orina	41
• Porcentajes de detección y tipificación para el grupo de pacientes sanas al examen clínico	43
• Evaluación del uso de muestras de orina para la detección de VPH	44
• Evaluación de la concordancia entre los resultados de hisopado cervical y muestras de orina	46
• Prueba de independencia	47
• Prueba de concordancia	48
Discusión	53
Conclusiones	63
Referencias Bibliográficas	65
Anexos	75

- Consentimiento Bajo Información para la Participación en el Protocolo de Investigación 76
- Carta de Aprobación de la Coordinación de ITS del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas (HUC) 81
- Carta de Aprobación del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas 82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa genético del Papillomavirus tipo 16	3
Figura 2. Mapa genético de la Región Larga de Control (RLC) del VPH	5
Figura 3. Anatomía del útero	7
Figura 4. Epitelio escamoso estratificado	8
Figura 5. Epitelio cilíndrico	9
Figura 6. Criptas del epitelio cilíndrico	10
Figura 7. Unión escamoso-cilíndrica (10x)	10
Figura 8. Esquema de toma de muestras con hisopos de darcon (Anexos)	75
Figura 9. Plan de recolección y evaluación de muestras (Anexos)	75
Figura 10. Detección de VPH en muestras de hisopados cervicales	37
Figura 11. Distribución porcentual, para la detección de VPH en muestras de orina	38
Figura 12. Tipificación de las muestras positivas para la infección por VPH en hisopados cervicales	39
Figura 13. Tipificación de las muestras positivas para la infección por VPH en muestras de orina	40
Figura 14. Comparación de positividad entre los dos tipos de muestras evaluadas en el estudio	41
Figura 15. Relación de genotipos encontrados durante el proceso de tipificación para los dos tipos de muestras evaluadas en el estudio	42
Figura 16. Visualización de la detección de VPH mediante electroforesis en gel de agarosa	49
Figura 17. Visualización de la tipificación de VPH mediante electroforesis en gel de agarosa	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de PCR para la detección de VPH	33
Tabla 2. Secuencia de iniciadores o primers para la detección de VPH	34
Tabla 3. Secuencia de iniciadores o primers de la PCR múltiple	34
Tabla 4. Mezcla de PCR múltiple	35
Tabla 5. Detección y tipificación de VPH en muestras de pacientes sin lesiones aparentes de infección viral	43
Tabla 6. Relación entre el resultado de la detección de VPH en muestras de orina respecto a hisopados cervicales	44
Tabla 7. Análisis de validez y seguridad de los resultados obtenidos empleando muestras de orina, respecto a las muestras de referencia	45
Tabla 8. Tabla de contingencia de los resultados obtenidos para las genotipos encontrados en ambos tipos de muestras	46
Tabla 9. Análisis de los resultados mediante Chi-cuadrado	47
Tabla 10. Estadístico de concordancia Kappa y casos válidos de N	48

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el proyecto **Misión Ciencias LPL-2007001088**.
Aprobado para la Dra. María Correnti, del Laboratorio de Genética Molecular, del Instituto de Oncología y Hematología, Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS).

DEDICATORIA

A Dios, a Jesús de Nazareno y a la Rosa Mística, ejes fundamentales de inspiración divina.

A mi Familia, fuente de inagotable e incondicional energía.

A mis Profesores y Preparadores.

A todas aquellas personas que prestaron su apoyo en esta importante etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA por permitirme realizar mis estudios

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS:

- **Jefa del Laboratorio Dra. María Correnti**
- **TUTORA: Lic. Dayahindara Veitía**
- **Dra. Zoraya De Guglielmo**
- **Lic. Maira Ávila**
- **Lic. Andreína Fernandes**

ASESORA ACADÉMICA: Prof. Valentina Salas

Prof. Izaskun Petralanda

JURADO:

Dra. Mary Carmen Ferreiro

Prof. Roxana Gajardo

FONACIT por el Financiamiento mediante el proyecto LPL 2007 001088

PERSONAL DE LA CONSULTA DE INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL DE LA CÁTEDRA DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS Y A LA DRA. MARISOL DE MACEDO DEL LABORATORIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO DEL INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA

A MIS PADRES, FAMILIARES Y AMIGOS...

RESUMEN

El cáncer cervical o de cuello uterino, es el segundo más frecuente en mujeres a nivel mundial; se ha descrito que la infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo oncogénico es el principal factor etiológico de esta malignidad, aunque es considerada como una causa necesaria pero insuficiente para su desarrollo. El método de cribado para esta patología es la citología o papanicolaou que permite identificar cambios celulares sugestivos de infección viral, pero no detecta directamente al VPH. Esto se logra mediante métodos moleculares sensibles y específicos como la PCR que generalmente utiliza hisopados cervicales o biopsias como material biológico. Debido a las complicaciones e incomodidad que pudiera implicar la toma de estas muestras, se han realizado pruebas con otras menos invasivas y costosas, como la orina. En base a lo mencionado anteriormente, en este trabajo se realizó la detección y tipificación de VPH en muestras de hisopados o raspados endocervicales, usadas rutinariamente para ello, y en muestras de orina, comparando los resultados obtenidos en ambos casos y evaluando la efectividad del uso de muestras de orina. Los porcentajes de positividad obtenidos con ambos tipos de muestra (68,6% en hisopados cervicales y 62,9% en muestras de orina) son similares y comparables a los de otros estudios. Así mismo, la concordancia obtenida entre los tipos virales identificados fue “buena” (0,609) y se obtuvieron, además valores altos de sensibilidad y especificidad al usar muestras de orina (83,3% y 81,8% respectivamente). Estos resultados apuntan a la posibilidad de desarrollar un diagnóstico efectivo para VPH empleando muestras de orina en pacientes femeninas, ya que reduce la intervención de personal adiestrado para su toma, costos y la incomodidad para las pacientes.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad causada principalmente por cambios citogenéticos, descritos por el progreso de una serie secuencial de mutaciones somáticas en los genes específicos que conllevan a la proliferación celular incontrolada (Fenton y col., 2005). Puede ser causado por la exposición a una variedad de agentes químicos o físicos, por errores aleatorios de replicación genética o por errores en los procesos de reparación del ADN (Morin y col., 2006). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2008 esta fue una de las principales causas de muerte en todo el mundo, responsable de 7,6 millones de defunciones, aproximadamente un 13% del total de la población mundial (Globocan 2008, IARC, 2010).

Las mutaciones en los genes que controlan la progresión del ciclo celular (genes porteros o guardabarreras) y las vías de reparación del ADN (genes cuidadores) son los acontecimientos esenciales de iniciación de cáncer (Morin, 2005).

El cáncer cervical es el segundo más común en las mujeres en todo el mundo y los estudios sobre sus causas y la patogénesis asociada han aumentado rápidamente. La infección persistente con genotipos de alto riesgo del Virus de Papiloma Humano (VPH) ha sido mencionada como una de las principales causas de la mayoría de los casos. Se han descrito cuatro etapas principales en el desarrollo de esta malignidad asociada a la infección por VPH: infección del epitelio metaplásico en la zona de transformación del cuello uterino, persistencia viral, progresión de la infección persistente del epitelio cervical a lesiones precancerosas y la invasión a través de la membrana basal del epitelio (Schiffman y col., 2007). La infección es muy común en mujeres jóvenes dentro de la primera década de actividad sexual. Aquellas infecciones persistentes pueden conllevar al establecimiento de lesiones precancerosas, las cuales se presentan típicamente de 5 a 10 años posterior a la exposición al virus. El cáncer invasor surge después de muchos años, incluso décadas, en una minoría de mujeres con lesiones precancerosas, observándose un pico entre 35-55 años de edad (Almonte y col., 2008). Cada genotipo de VPH actúa como una infección independiente, con diferentes grados de riesgo oncogénico. Nuevas investigaciones han conducido a una mejor prevención y estrategias de manejo clínico,

incluyendo las pruebas de detección viral y la creación de vacunas. Los recientes modelos orientados a la relación entre el VPH y la carcinogénesis cervical deberían promover una base fuerte en conjunto con los modelos morfológicos antiguos basados en la citología e histología, ya que se cuenta con los avances de la biología molecular, los cuales aportan una herramienta esencial para la detección temprana de infección por el virus (Schiff-man y col., 2007).

Como se mencionó, la asociación entre el cáncer de cérvix uterino y la infección por VPH de alto riesgo está bien establecida y con bases documentadas, evidenciando que el VPH es un agente esencial, pero no es por sí mismo suficiente para inducir el carcinoma de células escamosas del cuello uterino. El ADN de VPH se encuentra en más del 99% de las biopsias de carcinoma de células escamosas del cuello uterino (CCU), de estas el 70% corresponde a infecciones por VPH de alto riesgo oncogénico (Steben y col., 2007).

El VPH comprende un gran grupo de más de 100 tipos virales conocidos, pertenecientes a la familia de los *Papillomaviridae* (Stalin y col., 2004). Alrededor de 40 tipos virales son transmitidos vía contacto sexual o por contacto directo en humanos que infectan la piel y la mucosa tanto genital como oral, produciendo una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en el mundo (D'Hauwers y col., 2007).

Dada la asociación entre CCU y VPH son importantes todos los estudios que permitan mejorar o facilitar la detección viral, incluyendo métodos citológicos, métodos moleculares así como también, evaluar el tipo de muestra biológica utilizada. Se plantea entonces la detección viral en muestras de orina con la finalidad de optimizar la detección viral sencilla apuntando a la posibilidad de desarrollar un diagnóstico efectivo mediante este tipo de muestras en pacientes femeninas ya que proporcionaría un medio de detección viral que genere menos costo e incomodidad para el paciente y en el que no sea indispensable la intervención de personal adiestrado con equipo específico para la toma de la muestra (D'Hauwers y col., 2007).

VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)

Características generales del genoma

El VPH fue descubierto en los años 40. Está incluido en el Género *Papillomavirus*, Familia *Papillomaviridae*. Cada partícula viral posee una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros con un tamaño de 50 nm. El genoma es una doble hebra de ADN circular (ADNdc), con alrededor de 8000 pares de bases. Los viriones contienen al menos dos proteínas de la cápside, la mayor L1 (56 KDa) y la menor L2 (76 KDa). Los genes del virus de papiloma humano están codificados en sólo una de las cadenas de ADN que se divide en tres regiones principales, como puede observarse en la figura 1, la región temprana (Early: E), la región tardía (Late: L), y la región larga de control (Long Control Region: LCR o RLC) (Urbano y col., 2007).

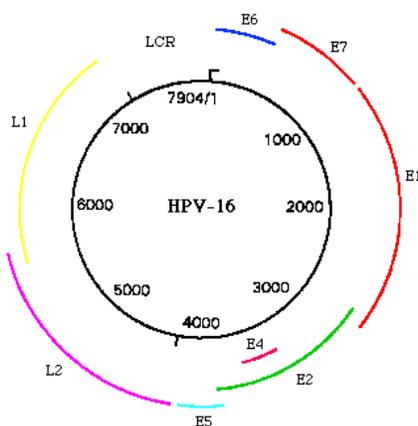


Figura 1. Mapa genético del Papilomavirus tipo 16 (Cortés y Leal, 2001).

La región temprana (E) representa el 45% del genoma y contiene 7 marcos abiertos de lectura que codifican para proteínas no estructurales, cuya función es controlar la replicación del ADN e inducir la transformación maligna de la célula hospedadora. *E1* controla la replicación episomal del ADN, a través de la codificación de un modulador (E1-M), y de un factor de replicación (E1-R). Mientras que esta zona del genoma se encuentre completa y funcional se produce una replicación normal, evitando la integración del ADN viral al genoma de la célula. Se piensa que la proteína E2 juega un papel muy importante en el ciclo viral ya que posee la capacidad de reprimir o activar los promotores

virales. Codifica un factor represor de transcripción (E2-TR) que inhibe la transcripción del promotor P97, el cual dirige la síntesis de *E6* y *E7*. Aún no se conoce el producto proteico ni la función de *E3*. Por su parte, *E4* forma redes filamentosas citoplasmáticas y al igual que *E2* juega un papel en la replicación viral. Se cree que la proteína codificada por *E4* inicia los cambios coilocíticos en las células epiteliales (Urbano y col., 2007). Este gen se pierde cuando se integra el ADN viral al genoma de la célula. *E5* produce una pequeña proteína de 44 aminoácidos que se une a la membrana citoplasmática; la pérdida o mutación de esta región, evita la replicación episomal del ADN viral y favorece su integración al cromosoma celular, ya que previene la acidificación de los endosomas y estimula la actividad transformadora del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), contribuyendo a la oncogenicidad de VPH. Las regiones *E6* y *E7* producen dos oncoproteínas transformantes, las cuales suprimen la apoptosis y reactivan la síntesis de proteínas en el hospedador, lo cual promueve la replicación viral (Cortés y Leal, 2001).

La región tardía (L), corresponde al 40% del genoma y contiene dos genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside: *L1*, codifica una proteína de aproximadamente 56.000 Da que se produce en mayor cantidad y se encuentra altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH, mientras que *L2* produce una menor cantidad de proteína que es específica para cada tipo viral (Álvarez y López, 1995).

La RLC corresponde al 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción como se observa en la figura 2, ésta región se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, caracterizado por la presencia de la proteína viral E2, donde se localiza el origen de replicación del ADN viral, el promotor temprano; y el dominio CE (“celular enhancer” o potenciador celular), un fuerte potenciador de la transcripción que depende exclusivamente de factores transcripcionales celulares (Cortés y Leal, 2001).

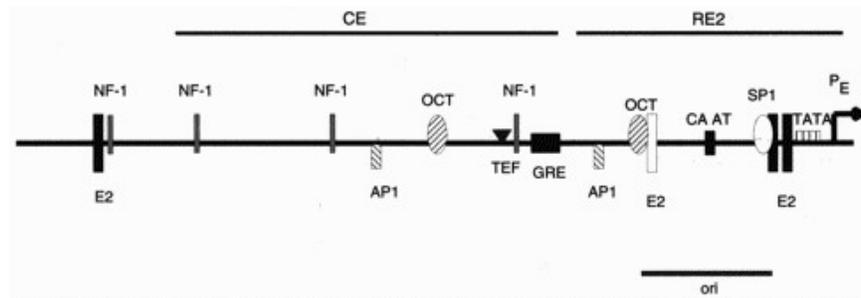


Figura 2. Mapa Genético de la Región Larga de Control (RLC) del Virus de Papiloma Humano (Cortés y Leal, 2001).

En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes *E6* y *E7*. Posee una caja TATA funcional a la cual se unen los factores necesarios e indispensables para iniciar la transcripción mediada por la ARN polimerasa II, y sitios de interacción de la proteína viral E2, además de sitios de unión para el factor celular Sp1 (proteína estimulante de la transcripción). En este dominio se ha descrito el origen de replicación del ADN viral, dependiente de la presencia de las proteínas virales E1 y E2. La especificidad tisular de los VPH reside en el Potenciador Celular (CE), donde la participación conjunta de factores celulares promueve la actividad del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial. La región CE se compone de numerosos sitios de asociación específica de diversos factores de transcripción de origen celular, tales como AP-1, NF-1/CTF, Octa-1, TEF o F, entre otros. Además, se ha descrito la presencia de un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG), el cual promueve la transcripción de VPH por un estímulo hormonal (Cortés y Leal, 2001).

Clasificación

En los últimos 20 años se han caracterizado más de 100 genotipos y se considera que en un futuro inmediato este número aumentará. Los diferentes tipos se discriminan de acuerdo a la similitud de su ADN usando sondas de genotipos virales de VPH conocidos mediante técnicas de hibridación molecular. La complementariedad de la doble cadena de ADN permite que tipos similares de VPH hibriden entre sí con alta eficacia. De acuerdo con la definición actual, un nuevo tipo de VPH es reconocido si demuestra más de un 10% de diferencia en cuanto a la secuencia de nucleótidos de los genes *E6*, *E7*, *L1* y *L2*.

Recientemente, se ha concluido que una diferencia de más del 10% en la secuencia de nucleótidos del gen *L1* es criterio suficiente para definir un nuevo tipo viral. Los diferentes tipos de VPH resultan de cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas virales codificadas; estas variaciones son probablemente las responsables de que cada genotipo tenga diferente oncogenicidad.

En base a su capacidad para inducir tumoración, los distintos VPH se han agrupado en tipos de alto riesgo oncogénico, como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, asociados con cáncer invasivo y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado (LIEBG y LIEAG); y tipos de bajo riesgo oncogénico como 6, 11, 42, 43 y 44, asociados principalmente con verrugas genitales, LIEBG y papilomatosis respiratoria recurrente (De Guglielmo y col., 2010).

GENERALIDADES DEL ÚTERO

El útero, también denominado matriz o seno materno, es el órgano de la gestación y el más importante de los órganos del aparato reproductor femenino en la mayoría de los mamíferos, incluyendo los humanos. Es un órgano muscular hueco, en forma de pera, extra-peritoneal y situado en la pelvis mayor de la mujer; cuando adopta la posición en anteversión se apoya sobre la vejiga urinaria por delante, estando el recto por detrás. Está situado entre la vagina y las trompas de Falopio. Aloja a la blástula que se implanta en el endometrio, dando comienzo a la gestación, que en la especie humana dura unos 280 días (Espín y col., 2003).

ANATOMÍA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL ÚTERO

El útero consta de un cuerpo, una base o fondo, un cuello o cérvix y una boca. Cuando no hay embarazo, el útero mide unos 7,6 cm de longitud, 5 cm de anchura y 2,5 cm de grosor. Está suspendido en la pelvis y se encuentra con la base dirigida hacia arriba y hacia adelante, y el cuello dirigido un poco hacia atrás. Está conectado con la vagina por medio del cérvix; en cada uno de sus lados hay un ovario que produce óvulos que llegan a él a través de las trompas de Falopio (Rouvière y col., 1999). Durante la gestación, el óvulo fecundado se implanta en el revestimiento uterino, donde crece hasta alcanzar la madurez. Sus paredes son elásticas y se estiran durante el embarazo para albergar al feto en

crecimiento (Snell y col., 2000). Aunque el útero es un órgano muscular posee un revestimiento de material glandular blando que durante la ovulación se hace más denso, momento en el cual está listo para recibir un óvulo fecundado. Si no se produce la fecundación, este revestimiento se expulsa durante la menstruación (Latarjet y col., 1998).

- **Regiones del útero**

El útero está formado por dos zonas anatómicas y funcionalmente distintas (figura 3), que son: el **cuerpo uterino**, al que están unidas por los lados las trompas de Falopio y está separado del cuello uterino o cérvix por el istmo uterino. El **cuello o cérvix uterino** se comunica con el istmo en su extremo superior, mientras que el extremo inferior termina haciendo protrusión en la porción superior de la vagina, lo que se denomina portio u hocico de tenca. El orificio cervical externo, mediante el cual el cérvix desemboca en la vagina, adquiere diferente forma según la paridad, evento que puede visualizarse mediante la colposcopia, o examen cervical directo (Moore y col., 1999).

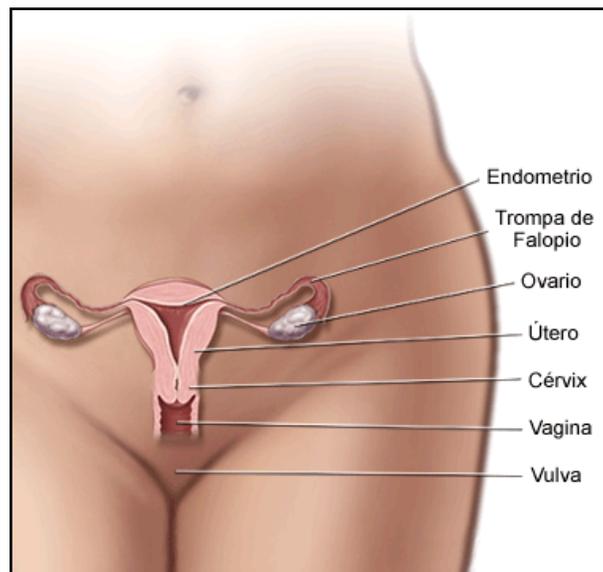


Figura 3. Anatomía del útero. Tomado y modificado de De la Fuente Villareal y col. 2011.

El estroma del cuello uterino consiste en un tejido denso, fibromuscular, atravesado por la compleja trama de un plexo vascular, linfático y nervioso. La vascularización arterial del cuello uterino procede de las arterias ilíacas internas, a través de las divisiones cervical y vaginal de las arterias uterinas. Por su parte el endocérvix tiene muchas terminaciones

nerviosas, que son escasas en el exocérnix (Williams y col., 2002). El cuello uterino está recubierto por epitelio escamoso estratificado no queratinizante y por epitelio cilíndrico, estos dos tipos de epitelio confluyen en la unión escamoso-cilíndrica (Ross y col., 2005).

- **Epitelio escamoso estratificado**

Normalmente, el exocérnix está recubierto en gran parte por epitelio escamoso estratificado no queratinizante que contiene glucógeno. Es opaco, tiene muchas capas celulares, de 15 a 20, y es de color rosado pálido (figura 4). Este epitelio puede corresponder al de origen, formado durante la vida embrionaria, o ser una neoformación metaplásica de los primeros años adultos. En las mujeres pre-menopáusicas el epitelio escamoso original es rosado, mientras que el de nueva formación presenta un aspecto rosado blanquecino a la exploración. La arquitectura histológica del epitelio escamoso del cuello uterino presenta, en el fondo, una única capa de células basales redondas, con núcleos grandes de coloración oscura y poco citoplasma, pegadas a la membrana basal (figura 4), que separa el epitelio del estroma subyacente. La unión epitelio estromal suele ser rectilínea, aunque a veces es ligeramente ondulada, con cortas proyecciones de estroma a intervalos regulares denominadas papilas. Las partes del epitelio introducidas entre las papilas se denominan invaginaciones (Ross y col., 2005).

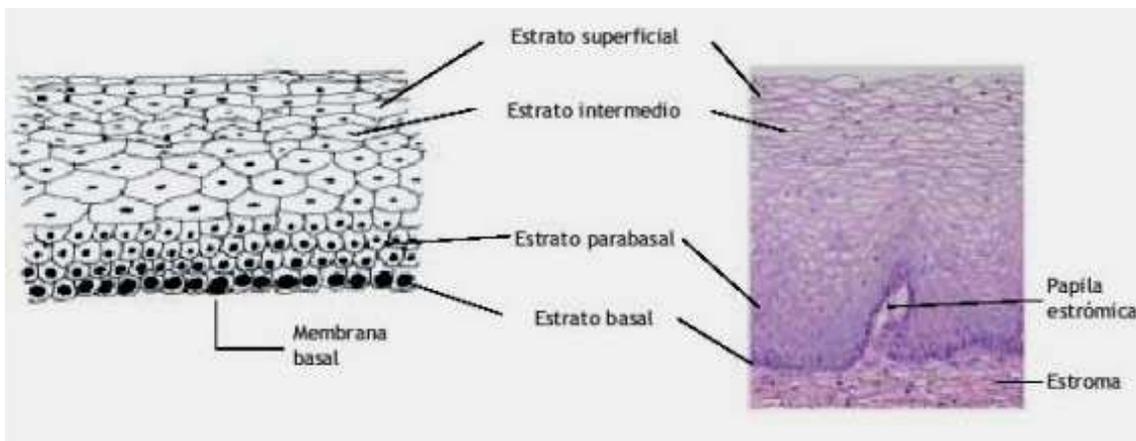


Figura 4. Epitelio escamoso estratificado (Aumento 20x). Tomado y modificado de De la Fuente Villarreal y col. 2011.

Las células basales se dividen y maduran para formar las siguientes capas celulares, llamadas parabasales, que también tienen núcleos relativamente grandes y oscuros, y citoplasma basófilo de color azul verdoso. Estas células siguen diferenciándose y madurando hasta constituir capas intermedias de células poligonales con citoplasma abundante y núcleos redondos pequeños que forman un entramado como una cesta. Al proseguir la maduración, se forman las células grandes y sensiblemente planas, de núcleo pequeño, denso y picnótico, y citoplasma transparente, de las capas superficiales. En términos generales, de la capa basal a la superficial, estas células aumentan de tamaño mientras se reduce el de su núcleo. La maduración del epitelio escamoso del cuello uterino depende de la presencia de estrógeno, la hormona femenina. En ausencia de estrógeno no se producen maduración ni glucogénesis totales. En consecuencia, después de la menopausia, las células no maduran más allá de la capa parabasal y no se acumulan en capas múltiples de células planas. El epitelio se vuelve delgado y atrófico. A la inspección visual aparece pálido, con manchas petequiales subepiteliales, por ser muy propenso a los traumatismos (Ross y col., 2005).

- Epitelio cilíndrico

El conducto cervical está recubierto de epitelio cilíndrico (a veces denominado epitelio mucíparo o glandular). Está compuesto de una única capa de células altas, con núcleos oscuros, cerca de la membrana basal (figura 5). Por tratarse de una única capa celular, su altura es mucho menor que la del epitelio escamoso estratificado del cuello uterino.



Figura 5. Epitelio cilíndrico (Aumento 40x). Tomado y modificado de De la Fuente Villarreal y col. 2011.

El epitelio cilíndrico, no forma una superficie aplanada en el conducto cervical, sino que forma pliegues longitudinales múltiples que sobre salen en la luz del conducto, dando lugar a proyecciones papilares. También forma invaginaciones en el estroma cervical, dando lugar a la formación de criptas endocervicales (a veces llamadas glándulas endocervicales) (figura 6). Las criptas pueden llegar a tener entre 5 y 8 mm desde la superficie del cuello uterino. Esta arquitectura compleja, con pliegues mucosos y criptas, da al epitelio cilíndrico una apariencia granular a la inspección visual (Ross y col., 2005).

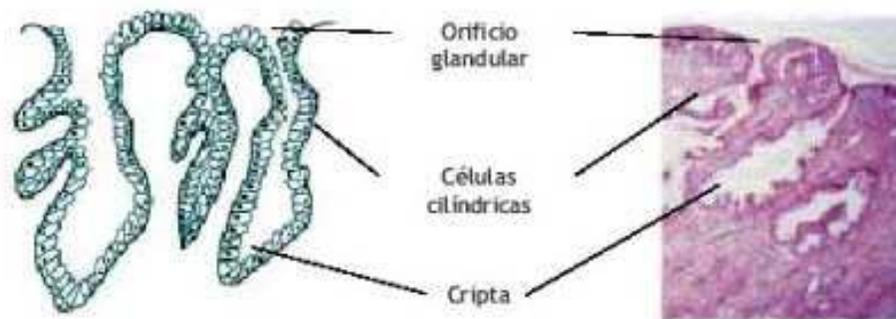


Figura 6. Criptas del epitelio cilíndrico (Aumento 10x). Tomado y modificado de De la Fuente Villarreal y col. 2011.

- Unión escamoso-cilíndrica

La unión escamoso-cilíndrica (UEC), se presenta como una línea bien trazada con un escalón, por la diferente altura del epitelio pavimentoso y del cilíndrico. La ubicación de la unión escamoso-cilíndrica con relación al orificio cervical externo varía en la vida de una mujer y depende de varios factores, como la edad, el momento del ciclo hormonal, los traumatismos del parto, el uso de anticonceptivos orales o el embarazo (figura 7).

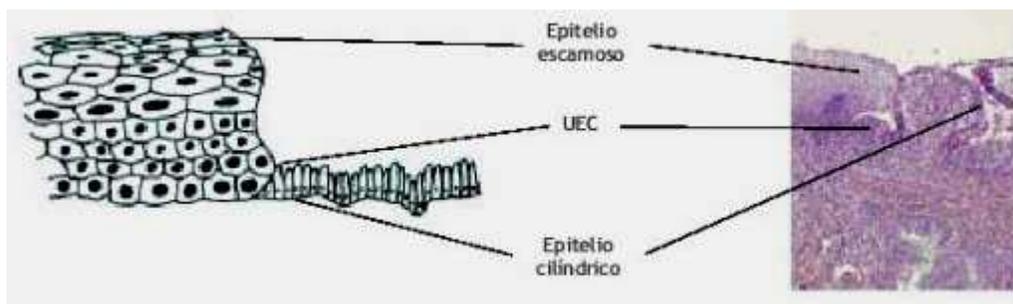


Figura 7. Unión escamoso-cilíndrica (Aumento 10x). Tomado y modificado de De la Fuente Villarreal y col. 2011.

La unión escamoso-cilíndrica visible en la niñez, peri-menarquía, pos-pubertad y primeros tiempos del periodo reproductivo se denomina UEC original, pues representa el empalme entre el epitelio cilíndrico y el epitelio pavimentoso “original” de la embriogénesis y la vida intrauterina. Durante la niñez y la peri-menarquía, la UEC original se encuentra en el orificio cervical externo, o muy cerca de él. El proceso metaplásico en esta sección suele comenzar en la UEC original y desplazarse de forma centrípeta hacia el orificio externo durante el periodo reproductivo y hasta la peri-menopausia.

- **Zona de transformación**

La zona del cuello uterino donde el epitelio cilíndrico ha sido reemplazado, o está reemplazándose, con el nuevo epitelio escamoso metaplásico se denomina zona de transformación (ZT). Corresponde al área del cuello uterino limitada distalmente por la UEC original y proximalmente por el límite más lejano del epitelio metaplásico, definido por la nueva UEC. En las mujeres pre-menopáusicas, la zona de transformación está plenamente ubicada en el exocérnix. A partir de la menopausia, el cuello uterino se reduce de tamaño, conforme descienden los niveles de estrógeno. En consecuencia, la zona de transformación puede desplazarse, primero parcialmente y luego plenamente, al conducto cervical. La zona de transformación puede considerarse normal cuando presenta metaplasia escamosa, incipiente o evolucionada, junto con zonas o islotes de epitelio cilíndrico, sin signos de carcinogénesis cervical. Se denomina zona de transformación anormal o atípica (ZTA) cuando en ella se observan signos de carcinogénesis cervical, como cambios displásicos. Identificar la zona de transformación tiene gran importancia en la colposcopia, pues casi todas las manifestaciones de carcinogénesis cervical ocurren en esta zona (Young y col. 2000).

CÁNCER DE CUELLO UTERINO

La incidencia del cáncer cérvico-uterino o de cuello uterino en América Latina y el Caribe (ALC) se encuentra entre las más altas del mundo, con un promedio regional de 29,2 casos por cada 100.000 mujeres (Parkin y col., 2008). Se ha establecido que la infección por VPH de alto riesgo es una causa necesaria pero insuficiente para el desarrollo del cáncer de cuello uterino, y la presencia de ciertos cofactores en combinación con la infección aumenta significativamente el riesgo de dicho desarrollo (Munoz y col., 2006).

Actualmente, el cáncer es la segunda causa de muerte en Venezuela y el de cuello uterino ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad en la población femenina del país. Esto lo convierte en un verdadero problema de salud pública. Es el más frecuente en países en vías de desarrollo, diagnosticándose más de 400.000 casos nuevos cada año (Medina y col., 2011).

El carcinoma de cérvix o cáncer de cuello de útero, incluye las neoplasias malignas que se desarrollan en la porción fibromuscular inferior del útero, la cual se proyecta dentro de la vagina. El cérvix uterino presenta lesiones asintomáticas que reciben el nombre de neoplasia intraepitelial cervical NIC (CIN, por sus siglas en inglés). Estas lesiones se relacionan igualmente con el VPH y son las precursoras del cáncer. Consisten en la desorganización o displasia del epitelio exocervical que, con los años, evoluciona hasta transformarse en carcinoma debido a fallas en las defensas naturales del organismo; estas alteraciones precursoras pueden regresar espontáneamente y sólo se detectan mediante citologías, colposcopias, biopsias u observación al microscopio (De la Fuente Villarreal, 2011). Según el grado de evolución que presenten al ser analizadas en el microscopio se clasifican en tres grados:

- NIC I: Sólo se observa displasia en el tercio inferior del epitelio. La mayoría regresa espontáneamente a los 2 años, pero el 10% progresa a NIC de mayor grado.
- NIC II: Hay displasia en los dos tercios inferiores del epitelio.

- NIC III: El epitelio es displásico en su totalidad. También recibe el nombre de carcinoma “*in situ*”. La mayoría no regresa espontáneamente y a los 2 años el 10% se ha transformado en un carcinoma invasor.

El pronóstico y la supervivencia para los carcinomas invasivos dependen en primer lugar del estadio en que se detecta el cáncer y, en menor medida, del tipo celular predominante en el tumor (Organización Mundial de la Salud, 2005).

Asociación del VPH con el cáncer de cuello uterino

La historia natural del CCU está relacionada con una infección persistente por VPH la cual precede la aparición de anormalidades citológicas. Aproximadamente el 100% de los CCU escamosos o glandulares son asociados a la infección por VPH, considerada como causa necesaria pero insuficiente para el desarrollo de la enfermedad. Además, se relaciona causalmente con el 90% de los cánceres anales y con el 40% de los cánceres de vulva y pene. La prevalencia de VPH en muestras cervicales de mujeres mayores de 30 años que residen en países con alta incidencia de CCU es de aproximadamente 11-40%, mientras que en mujeres que residen en países con baja incidencia, es de 5-10% (Urbano y col., 2007).

Diagnóstico del CCU

Como se mencionó anteriormente, múltiples estudios epidemiológicos han concluido que el factor necesario en la etiología del cáncer cérvicouterino es la infección del cérvix por algunos tipos del VPH. En países en vías de desarrollo, como Venezuela, comúnmente son detectados cambios celulares sugestivos de infección por VPH mediante el estudio citológico Papanicolaou (Pap) y recientemente mediante métodos de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite la detección del ADN del virus utilizando diferentes grupos de oligonucleótidos para amplificar distintas regiones del genoma viral. La mayoría de los estudios realizados han sido en pacientes con citología anormal y pocos sobre citología normal; de ahí la importancia de realizar estudios, con fines preventivos y predictivos, en pacientes que aún no han

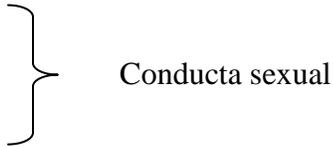
presentado daño celular (Carrillo y col., 2004). Se ha señalado que la prueba de Papanicolaou sirve como un paradigma ideal para la detección del CCU, es económica, fácilmente aplicable, relativamente segura, no invasiva; razonablemente sensible y específica. Dado que el CCU tiene una larga fase preclínica y bien definida con lesiones precursoras que son fácilmente detectables, el uso habitual y generalizado de la prueba de Papanicolaou en países como EE.UU ha sido una medida de salud pública muy eficaz. Sin embargo presenta limitaciones debidas principalmente al error humano, en las que se incluyen resultados falsos negativos por la moderada o baja sensibilidad de la prueba e imprecisión en mujeres posmenopáusicas. Más recientemente, refinamientos tales como la detección computarizada y la citología con base líquida, han sido introducidos para reducir estas limitaciones. También se ha sugerido combinarla con la detección y tipificación del VPH mediante métodos moleculares, ya que está siendo investigada como un medio de triage de pacientes con anomalías menores y/o resultados dudosos en la prueba de Papanicolaou; pero en este momento, dichas pruebas parecen ser de uso limitado, por su poca accesibilidad y alto costo (Stephen, 2001).

Para el diagnóstico clínico efectivo se cuenta con la clasificación consenso desarrollada en 1988 conocida como el Sistema Bethesda. Con ella se originó el concepto de lesiones intraepiteliales escamosas, subdividiéndose en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG). Las LIEBG comprenden las infecciones por VPH asintomáticas y las displasias o neoplasias intraepiteliales cervicales leves o NIC I. Las displasias moderadas y severas o NIC II- III quedan agrupadas en las LIEAG. El Sistema Bethesda contempla una nueva categoría, las células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS, de las siglas en inglés). Estas células no satisfacen los criterios de las LEIBG; sin embargo, presentan anomalías menores que anteriormente se clasificaban como atípicas. El significado que estas células tienen en el desarrollo de la patología cervical, aún no es claro (Dzul-Rosado y col., 2004).

Factores de riesgo del CCU

Debido a que la infección por VPH se transmite sexualmente, la conducta sexual (edad de la primera relación sexual, número de parejas sexuales y el comportamiento sexual de la pareja) se asocia con un mayor riesgo de adquisición. Se estima que la mayoría de las mujeres en América Latina y el Caribe (ALC) se infectarán con VPH en algún momento de su vida sexual, sin embargo, sólo una pequeña proporción de ellas con infección persistente por virus de alto riesgo oncogénico desarrollará una neoplasia de cuello uterino y posteriormente el cáncer. El uso prolongado de anticonceptivos orales (ACO), la paridad elevada y el tabaquismo son factores que estimulan la aparición del cáncer de cuello uterino entre mujeres VPH positivas (Almonte y col., 2008).

Dada la relación entre infección por VPH y CCU, desde hace muchos años, los epidemiólogos han considerado que el cáncer cervical tiene características epidemiológicas de una infección de transmisión sexual (Janicek y col., 2001). Sin embargo factores de riesgo “clásicos”, son los principales sustitutos del riesgo de exposición al VPH, considerado ahora como el agente causal en el 95% de los casos de CCU. La biología molecular ha develado la relación entre el VPH como factor inductor de cáncer de cuello uterino, con otros factores o cofactores tales como el tabaco, el tipo de antígeno leucocitario humano (HLA) y, más recientemente, la infección por *Chlamydia* y otros microorganismos (Stephen, 2001). Así, dentro de los factores de riesgo de cáncer cervical más relevantes que están relacionados con características tanto del virus como del hospedador, se encuentran:

- Múltiples compañeros sexuales
 - Inicio de relaciones sexuales a temprana edad
 - Uso prolongado de anticonceptivos
 - Elevado número de partos
 - Infección persistente con un VPH de alto riesgo (como VPH 16 ó 18)
- 
- Conducta sexual

- Infección por VHS tipo II y otras ITS (como marcadores de promiscuidad sexual y potenciadores de daño crónico (sinergismo epidemiológico))
- Inmunosupresión
- Uso de nicotina (Tabaco) y/o alcohol (Kumar y col., 2009).

Se ha planteado una correlación lineal entre el CCU y la actividad sexual, según la cual mujeres que inician dicha actividad antes de los 17 años tienen un riesgo 5 veces mayor que en las mujeres cuyo primer coito se evidencia a partir de los 23 años (Morris y col., 2002). También se ha señalado que el hábito tabáquico y el uso de anticonceptivos orales por largos períodos pueden ser considerados cofactores que influyen en el riesgo de progresión desde LIEBG y LIEAG a carcinoma (Castellsagué y Muñoz, 2003).

Con respecto al cofactor paridad, diversos estudios de casos y controles han revelado la asociación entre la paridad elevada y el carcinoma invasivo “*in situ*”. En el estudio “Multicenter Cervical Center Study Group” de la “International Agency for Researchon Cancer” (IARC), el riesgo de carcinoma en mujeres con 7 embarazos era 4 veces mayor que en la mujer con un solo embarazo y el riesgo aumentaba progresivamente con el número de embarazos, debido a la acción de las hormonas esteroides, en altísimas cantidades durante el periodo de gestación, sobre el cuello uterino (Muñoz y col., 2002).

En mujeres VPH positivas con hábito tabáquico, algunos estudios han reportado un aumento del riesgo de desarrollar LIEAG o carcinoma, y además existe relación entre el número de cigarrillos fumados por día y los años de consumo, probablemente por la acción de los metabolitos de la nicotina a nivel cervical. Es importante destacar, no obstante, que el tabaco aumenta el riesgo de cáncer de cérvix uterino escamoso pero no del adenocarcinoma (De Palo y col., 2007).

En 2003, se analizaron 28 estudios que abarcaban 12.531 mujeres con carcinoma de cérvix, se observó que en comparación con las mujeres que no usaban anticonceptivos, el riesgo relativo de carcinoma de cérvix aumentaba proporcionalmente a la duración del uso de anticonceptivos orales. Así mismo, en mujeres positivas al VPH consumidoras de ACO (anticonceptivos orales), el uso prolongado del fármaco estaba asociado a un mayor riesgo

de carcinoma cervical que, sin embargo, disminuía con la suspensión de dicho uso, ya que el mecanismo de acción de los ACO en el desarrollo de cáncer podría ser estimulando la proliferación celular en la zona de transformación, induciendo así la expresión de *E6* y *E7*, o favoreciendo la integración viral en el genoma de las células del epitelio cérvicouterino (Smith y col., 2002; Delgado, 2009).

Por el contrario, en los estudios de Shields y col. (2004), en el que se evaluaron 235 mujeres con carcinoma escamoso y 486 controles cuya exposición al VPH había sido evaluada para positividad a 5 tipos oncogénicos (16, 18, 31, 45, 52), los anticonceptivos no se confirmaron como cofactores.

Entre los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer cérvico uterino, también se encuentran las infecciones concomitantes de VPH y otros agentes de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis* y el virus de herpes simple tipo 2 (HSV-2). De manera particular, se ha estudiado esta relación entre infecciones concomitantes en un análisis de siete estudios de casos y testigos, en el cual se revisó el efecto de la infección por HSV-2 en el desarrollo de cáncer cérvico uterino invasor; se encontró que en las mujeres que se detectó positividad del ADN de VPH, el HSV-2 presentó una relación de riesgo hasta tres veces mayor de desarrollar cáncer cervical (Smith y col., 2003). Esto debido a que se maneja la hipótesis de que lesiones herpéticas ulcerosas pueden servir como cofactores del VPH, al facilitar el acceso del VPH a la capa de células basales, además las respuestas inflamatorias inducidas por infecciones herpéticas pueden interferir con la capacidad de una mujer para generar una respuesta inmune eficaz para la infección por VPH (York y col., 1994), o bien pueden aumentar el riesgo de carcinógenos cervicales mediante la inducción de la producción de óxido nítrico que pueden dar lugar a daños en el ADN en células infectadas por el VPH (Paludan y col., 2001). El VHS-2 también puede aumentar el riesgo de que una infección por VPH oncogénico progrese a una neoplasia cervical, posiblemente por el aumento de la replicación del VPH o la integración de las secuencias de ADN del VPH en las células huésped infectadas (Hara y col., 1997). Aunque el ADN de VHS o las proteínas no se han detectado consistentemente en los tumores de cuello uterino (Vonka y col., 1987), es posible que el VHS pueda actuar sobre el ADN celular del huésped por un mecanismo

denominado “hit-and-run” o agente ejecutor, para causar cambios intracelulares que no requieren la retención de los genes virales del VHS. Se cree además que el VHS-2 puede iniciar mutaciones y carcinogénesis en células cervicales infectadas por el VPH, las evidencias moleculares *in vitro* muestran datos renovados de interés en la posible sinergia entre las infecciones por VPH y el VHS-2 en la etiología del cáncer de cuello de útero (Jones, 1995; DiPaolo, 1999). Específicamente, se sugiere que de forma *in vitro* el *Xho* sub-fragmento II del genoma de VHS-2 induce la transformación maligna de las células infectadas del cuello del útero con VPH-inmortalizado el cual puede ser retenido en el tejido cancerígeno de cuello uterino (DiPaolo y col., 1998).

Epidemiología del cáncer de cuello uterino

Los primeros estudios epidemiológicos acerca del CCU fueron conducidos por Rigoni en 1842, quien encontró que la incidencia de esta patología era mayor en mujeres casadas y viudas que entre mujeres solteras, lo que determinó un primer indicio de que el comportamiento sexual jugaba un papel importante como factor de riesgo para esta enfermedad. Harald zur Hausen realizó un gran avance en la investigación del cáncer cervical, ya que descubrió el papel de la infección por el VPH en su desarrollo por lo que recibió el Premio Nobel de Medicina en 2008 (Organización Mundial de la Salud, 2005). Sin embargo para el año 2007 el CCU continúa siendo un problema de salud pública, posicionándose a nivel mundial como el segundo cáncer más común en mujeres después del cáncer de mama, con aproximadamente 490.000 casos nuevos y 270.000 muertes cada año; de estas aproximadamente el 83% ocurre en países en vías de desarrollo. La incidencia de CCU en Haití, África Central y América Latina es mayor de 40 por cada 100.000 mujeres; contrariamente, para el Norte de Europa la tasa de incidencia es menor de 10 por cada 100.000 mujeres. En América Latina y el Caribe el CCU dejó en promedio 37.600 muertes anuales con tasas de incidencia y mortalidad de 28.6 y 12.9 por cada 100.000 mujeres respectivamente en el año 2002 (Urbanoy col., 2007). En ese mismo año el CCU alcanzó el primer lugar entre las neoplasias que afectan a la mujer, con tasas de incidencia/100.000 mujeres de 93,9; 61,1; 58,1; 44,2; 41,1; 40,6; 40,5; 39,9; 39,6; 39,6; 38,3 en Haití, Nicaragua, Bolivia, Ecuador, Paraguay, El Salvador, México, Perú, Honduras, Guatemala y Venezuela respectivamente. El Instituto Nacional de Cancerología

de México durante el año 2002 encontró que la variación de las tasas anteriores se debe quizás a que en los países pobres los programas de cribado no se han implementado o han sido inadecuados, por esto la incidencia y mortalidad siguen siendo un problema de primer orden en países en vía de desarrollo mientras que la implementación de programas adecuados de cribado mediante citología cervical en los países desarrollados ha disminuido la incidencia y mortalidad en un 75% (Urbano y col., 2007).

Según la OMS (2008), el CCU causó 275.000 defunciones en el 2008; así, más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en 2030.

Según la American Cancer Society (2013) el número de casos nuevos y defunciones por cáncer de cuello uterino en los Estados Unidos para el 2012 fue de 12.170 y 4.220 respectivamente. De acuerdo a trabajos realizados por Parkin (2005) y Berek (1996) en países desarrollados el cáncer cérvicouterino ocupa el séptimo lugar de incidencia después del cáncer de mama, colon-rectal, pulmón, estómago, endometrio y ovario. La edad promedio de las pacientes en el momento del diagnóstico es de 52,2 años.

En Venezuela, el cáncer de cuello uterino resultó la tercera causa de muerte por cáncer en la mujer en 2008, produciendo 1.218 muertes, es decir, 12,64 % de las muertes ocurridas ese año en la población femenina según el Anuario del Ministerio del Poder Popular para la Salud de Venezuela (2010).

La incidencia más elevada del cáncer de cuello uterino está entre los 40 a 60 años, con un promedio de 45 a 55 años, descendiendo notablemente después de los 60 años (Mateu-Aragonés, 1982). La máxima incidencia del carcinoma cervical *in situ* está entre los 30 y 40 años y el invasivo entre los 40 y 50 años (Ville, 1993).

Carcinogénesis inducida por VPH

El VPH, como otros virus, tiene la capacidad de inducir o favorecer procesos oncogénicos en distintas regiones anatómicas, como tracto anogenital, piel, ojos, cabeza y cuello. Los VPH de alto riesgo están implicados en el aumento de la proliferación y de la

diferenciación anormal de las células infectadas. Cuando la infección es causada por VPH de bajo riesgo, la expresión de las proteínas E6/E7 generalmente induce neoplasias benignas. Sin embargo, cuando las proteínas E6/E7 se expresan en células infectadas por VPH de alto riesgo, tienen la capacidad de inducir lesiones epiteliales displásicas malignas (Feller y col., 2010).

Se habla de VPH como un carcinógeno ya que es considerado una causa necesaria, tanto en el carcinoma de células escamosas como en el adenocarcinoma. Además, la distribución de los tipos de VPH oncogénicos, las variantes detectadas en estos dos tipos histopatológicos y el papel de los cofactores virales (por ejemplo, el tabaquismo y la paridad) no varían; así, se plantea un esquema del mecanismo de carcinogénesis de VPH, el cual inicia con un primer evento de la infección viral que puede conllevar a tres resultados distintos entre los que se incluye la eliminación del virus por el sistema inmunitario del hospedador (el sistema inmunitario “resuelve el problema”), la persistencia de la infección (que puede inducir la integración del ADN viral a las células de la mucosa, una progresión neoplásica debido a inestabilidad genética o nuevamente la eliminación del virus) y por último, la infección por VPH puede también resultar en células anormales, LIEAG o LIEBG que pueden conllevar o no a un cáncer cervicouterino (Schiffman y col., 2007).

Aunque la infección por VPH en cuello uterino es alta, la incidencia de carcinoma de células escamosas es relativamente menor. Por lo tanto, además de la persistencia de la infección por VPH, otros factores como el genotipo del virus, la infección con varios tipos virales (infección múltiple), el estado episomal o integrado del ADN viral y la carga viral celular, pueden ser importantes en el desarrollo o evolución del cáncer. De igual importancia se consideran otros factores que pueden variar de individuo a individuo, incluyendo, como ya se mencionó, el estado inmunológico, el estado nutricional, el uso de tabaco y alcohol, el uso de anticonceptivos, edad, conducta sexual, herencia genética, y la coinfección con otros agentes de transmisión sexual, incluyendo el VIH y el VHS-2 (Feller y col., 2010).

Las oncoproteínas E6 y E7 pueden inactivar los mecanismos genéticos que controlan el ciclo celular y la apoptosis. El sello distintivo de VPH de alto riesgo es que la

proteína E6 posee la actividad oncogénica de inducción de la degradación del producto del gen supresor de tumores *p53*, cuya actividad se relaciona con la mediación de la proliferación celular en respuesta a la estimulación mitogénica; *p53* media la detención del ciclo celular en el punto de control G1, y así permitir la reparación del ADN dañado antes de que la célula entre en la fase de síntesis del material genético, o a través de la inducción de apoptosis de las células en las que el daño en el ADN es irreparable, lo cual le permite resguardar efectivamente el genoma humano. Por lo tanto, la inactivación, degradación o mutación de *p53* puede desregular sus funciones, resultando en una proliferación celular exacerbada, acumulación de ADN dañado, crecimiento de células que albergan errores en el ADN y una prolongación de la supervivencia de las mismas. Sin embargo, la pérdida de función de *p53* por sí sola no es suficiente para el desarrollo de cáncer y otras alteraciones citogenéticas se requieren para la completa transformación maligna (Feller y col., 2010).

Además de estas propiedades, los tipos de VPH de alto riesgo por medio de la oncoproteína E6 también pueden mediar la proliferación celular a través del dominio PDZ-ligando. El dominio PDZ se encuentra en las zonas de contacto célula-célula, tales como uniones estrechas de las células epiteliales y, además, se asocia con las vías de transducción de señal. La unión de la oncoproteína E6 de un VPH de alto riesgo a la familia de proteínas PDZ puede resultar en la degradación de este dominio, ya que conduce a la desregulación de la organización, la diferenciación y la integridad cromosómica de las células epiteliales infectadas por VPH. Esto puede contribuir a la transformación morfológica de los queratinocitos infectados con VPH de alto riesgo y la inducción de hiperplasias epiteliales.

La infección por VPH induce la activación de la telomerasa impidiendo el acortamiento de los telómeros, lo cual resulta en la prolongación de la vida útil de las células infectadas por este virus (De Oliveira, 2007).

Otro sello distintivo del VPH de alto riesgo es la capacidad que tiene la oncoproteína E7 para iniciar la síntesis de ADN en las células epiteliales diferenciadas, principalmente por la unión y la inactivación de la apoptosis mediada por el gen *Rb* que codifica la proteína Retinoblastómica (Feller y col., 2010). La familia de proteínas Rb juega un papel esencial en el control del ciclo celular, específicamente entre G1 y la fase S,

al igual que *p53*. La proteína Rb hipo fosforilada se une al factor de transcripción E2F formando un complejo Rb-E2F, haciendo que E2F esté disponible para la transcripción de genes asociados con la síntesis de ADN. Tras la fosforilación de Rb por complejos de ciclina-CDK, E2F se libera del complejo de transcripción E2F-Rb represor, induciéndose de este modo la transcripción de los genes de la fase S (Doorbar, 2005).

Así, la oncoproteína E7 de VPH de alto riesgo, funcionalmente inactiva la familia de proteínas Rb, lo que resulta en la sobre expresión del factor de transcripción E2F que induce la regulación positiva de genes del ciclo celular permitiendo la replicación del ADN en la transición de la fase G1 a la fase S y, en consecuencia, el aumento en proliferación celular (Longworth y Laminis, 2004).

La oncoproteína E7 también puede interactuar con otros factores celulares que controlan el ciclo celular incluyendo las histonas-desacetilasas, AP-1 (factor de transcripción hetero dimérico compuesto por proteínas pertenecientes a las familias de c-Fos, c-Jun, ATF y JDP implicadas en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones virales o bacterianas) y los complejos inhibidores de la transcripción CDK, p21 y p27. Además, el gen *E7* de los VPH de alto riesgo 16 y 18 puede disminuir la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, interfiriendo así con la presentación antigénica, lo que resulta en la regulación negativa de la respuesta inmune celular, permitiendo al VPH persistir en las células epiteliales infectadas (Karin, 1997; Miller, 2005).

Además de estas propiedades, la oncoproteína E7 puede inducir errores de duplicación del cromosoma que conducen a la desregulación de la formación del huso mitótico y su funcionalidad, lo que contribuye a la inestabilidad genómica de la célula (Feller y col., 2010).

Los efectos patológicos de *E6* y *E7* por separado en el ciclo celular se complementan entre sí, y juntos median la transformación de células epiteliales, promoviendo la inestabilidad genómica celular que predispone a las células infectadas a la transformación maligna por completo. Es probable que después de la transformación

celular inicial, las interacciones adicionales con carcinógenos químicos proporcionen el impulso extra necesario para el desarrollo de una tumoración maligna (Von Knebel, 2002).

La integración del genoma de VPH al cromosoma celular en oposición a la presencia del VPH episomal, se asocia con una mayor frecuencia a NIC III y a carcinomas invasivos de células escamosas de cuello uterino. El significado patológico de la integración no es del todo claro, ya que el VPH a menudo existe simultáneamente en ambas formas (episomal e integrado). Las localizaciones cromosómicas del ADN de VPH integrado al genoma celular son muy variables, lo que conlleva a una escasez de datos sobre las frecuencias y localizaciones cromosómicas de los diferentes genotipos de VPH (Campo, 2002).

Las oncoproteínas E6 y E7 pueden interactuar sinérgicamente con proto-oncogenes intranucleares, con citocinas que se unen y activan promotores de E6/E7, con factores exógenos (incluyendo carcinógenos del tabaco y agentes de la dieta), esteroides y hasta radiación UV o X, para promover tumorogénesis mediada por VPH (Feller y col., 2010).

Se ha descrito que cuando el VPH entra en contacto con la mucosa e infecta las células, puede evadir la respuesta inmune y esto da origen a un período de latencia muy variable, de meses hasta años, desde el contacto con el virus hasta la aparición de la lesión (Stanley, 1998). Sin embargo la mayoría de las infecciones son transitorias y no son evidentes clínicamente con un 70-90% de infecciones resueltas en 12 a 30 meses. Esto sugiere que la inmunidad del huésped es generalmente capaz de resolver la infección por VPH. El hecho de que el VPH permanezca localizado en el cuello uterino, vagina y zonas aledañas a la región genital indica también que las respuestas inmunes locales son suficientes para controlar y resolver la infección del mismo en la mayoría de los casos. La inmunidad celular y humoral (respuestas de anticuerpo) han sido involucradas en la susceptibilidad, persistencia y resolución de la infección genital por VPH (Williamson y col., 2005).

A pesar que la infección VPH es conocida por generar respuesta inmune, éste es un objetivo ilusivo para el sistema inmune, y las respuestas inmunes son generalmente débiles. Varios mecanismos han sido involucrados y contribuyen a la evasión inmune:

- El VPH no es citopático. Se refiere a que, el virus no destruye células, a diferencia del virus del herpes. El VPH causa proliferación celular en vez de destrucción celular y por lo tanto no desencadena respuesta inflamatoria.

- El hecho que el VPH sólo infecta células epiteliales facilita la evasión al sistema inmune. Viriones completos de VPH se encuentran solamente en células escamosas terminalmente diferenciadas en las capas exteriores del epitelio genital, separadas por varias capas de epitelio mucoso de los centros germinales linfocíticos de la submucosa, quienes están involucrados en la generación de la respuesta inmune.

- El VPH evita el reconocimiento por parte del sistema inmune innato mediante el bloqueo de la producción de interferones para asegurar así su propia replicación. Esto es logrado mediante la producción de dos proteínas tempranas E6 y E7 que se unen e inactivan intermediarios en la cascada del interferón (Williamson y col., 2005).

La mayoría de las infecciones son transitorias, otras permanecen subclínicas. La historia natural de esta enfermedad implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras (NIC I, II y III), de acuerdo a la proporción del grosor del epitelio cervical comprometido (Richart, 1967; Richart, 1990). La progresión de una lesión cervical iniciando con una lesión de bajo grado o NIC I a NIC III se ha calculado en 7 años aproximadamente, y el tiempo que transcurre de NIC III hasta su transformación a cáncer microinvasor es de aproximadamente 10 años; sin embargo, un 5 % de los NIC III se transforman en cáncer invasor en menos de 3 años (Bereck y col., 1996). En estudios realizados por Dawar y col. (2007) se observó que la evolución de la infección por un tipo de VPH de alto riesgo oncogénico hacia cáncer de cérvix es muy lenta, y pueden transcurrir entre 15 y 30 años. Ello explica que la edad promedio de mayor frecuencia de aparición de cáncer de cuello uterino sea aproximadamente 40 años (Arenas y col., 2011).

Debido a esto el VPH ha sido aceptado como un agente etiológico, a partir de la relación ya conocida con el carcinoma de células escamosas de cérvix establecida en 1985 (Feller y col., 2010). Un grupo de investigadores propone que la ausencia del genoma del VPH en ciertos carcinomas no excluye la posibilidad de que el virus haya tenido una participación importante en la génesis de la malignidad, ya que las manifestaciones de las

infecciones son frecuentemente transitorias y durante la transformación de la célula huésped y el desarrollo de carcinogénesis se pueden perder las secuencias genómicas virales (Mork y col., 2001; Syrjanen y col., 2003). Sin embargo, se ha comprobado que la persistencia de las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo parecen ser necesarias para la perpetuación del virus asociada a la progresión de la malignidad, lo cual ha sido evidenciado en estudios realizados en carcinomas de cuello uterino (Gillison, 2006).

MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE VPH

Uno de los métodos más usados para la detección de VPH en muestras de citología cérvicouterino es la captura de híbridos, que cuenta con la aprobación de la *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico y se utiliza como método de *screening* (cribado) (Jenkins, 2001). Sin embargo, esta técnica discrimina solamente entre tipos de AR y BR, sin informar sobre el genotipo viral específico.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es, actualmente, el método más comúnmente utilizado para la detección de VPH. Se han desarrollado diferentes protocolos de PCR para detectar un amplio espectro de genotipos de VPH usando iniciadores genéricos que reconocen secuencias conservadas del genoma viral. Esta detección de VPH incluye la PCR convencional con primers o iniciadores genéricos (MY09/11). Para tipificar los genomas virales a partir de los primeros productos de la amplificación, se emplea una PCR múltiple, método que consiste en la amplificación simultánea en un único tubo de diferentes secuencias blanco, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés o en el caso del VPH, de distintos tipos virales, también existen otros métodos como: Hibridación por Southern Blot, hibridación por DotBlot, análisis con enzimas de restricción (RFLP), secuenciación, ensayos inmunoenzimáticos e hibridación reversa (Méndez y Pérez, 2004).

ANTECEDENTES

Dada la importancia del CCU como problema de salud pública y su relación con el VPH, cobran interés los métodos que permitan su detección. Conforme a esto se han desarrollado múltiples estudios epidemiológicos basados comúnmente en la detección clínica por Papanicolaou (Pap) y mediante métodos de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando diferentes juegos de oligonucleótidos para amplificar distintas regiones del genoma viral (Yerena y col., 2009).

Un aspecto fundamental para el éxito de estos métodos es el tipo de muestras biológicas a partir de la cual se realizará la detección, incluyendo las características y condiciones de la misma.

Generalmente, se utilizan muestras citológicas y biopsias. Sin embargo, desde hace algunos años se han hecho pruebas con muestras de orina. En este sentido, investigadores de la Universidad de Harare en Zimbabue, sugieren que el uso de este tipo de muestras para la detección de VPH pudiera ser satisfactorio, partiendo de la premisa de que el epitelio de la vejiga urinaria también es susceptible a la infección por VPH debido a su contigüidad con la vagina y el cérvix (Stanczuk y col., 2003). Estudios previos a esta investigación basados en muestras de orina correspondían a mujeres sin anomalías cervicales conocidas, solo en casos muy contados se ha estudiado la presencia de VPH en la orina de mujeres con cáncer cérvicouterino y, aún en estos casos, el uso de distintas técnicas moleculares para identificar el VPH afecta las conclusiones derivables en torno a la correlación entre la presencia de virus en el frotis cervical y en la orina. Los investigadores en Zimbabue obtuvieron frotis cervicales y muestras de orina de 43 mujeres con cáncer cérvicouterino invasor para efectuar un análisis de muestras pareadas. Utilizaron PCR, con iniciadores degenerados de VPH, para detectar e identificar los diferentes tipos virales. Se detectó VPH en 72% de las muestras de orina y en 98% de las obtenidas por frotis cervical. En 59% de estas últimas se identificó el VPH tipo 16, seguido de los tipos 33 (31%), 18 (14%) y 31 (2%). En lo que respecta al tipo específico de VPH, se obtuvo concordancia entre los resultados con frotis y con muestras de orina en 79% de los casos. Esto significa que en la mayor parte de los casos un mismo tipo de VPH está presente en el epitelio del cérvix y de la vejiga. Si bien es cierto que pareciera que el frotis

permite mayor sensibilidad que la muestra de orina para la detección de VPH, se cree que la sensibilidad de esta última podría ser mayor si se aplican algunos ajustes a la prueba (Stanczuk y col., 2003).

Los resultados del estudio aquí descrito son alentadores, puesto que apuntan a la posibilidad de usar una muestra de orina, que la propia mujer puede obtener con facilidad, para detectar la presencia de VPH en el aparato genitourinario. No obstante, ellos plantean la necesidad de realizar más estudios antes de que se pueda recomendar el uso generalizado de muestras de orina para este propósito (Stanczuk y col., 2003).

Por su parte Castillo y Stalin (2004), realizaron un estudio con 63 pacientes masculinos y femeninas a los cuales se les tomó muestras de raspado endocervical y de orina, para realizar la detección del virus por PCR, encontrando en el total de muestras procesadas, un 95.3% (60/63) de concordancia con respecto al laboratorio de referencia al cual fueron enviados duplicados de las muestras para comparar resultados. En base a esto los investigadores plantean que el uso de técnicas moleculares como la PCR, permite detectar la presencia del VPH en células infectadas de pacientes asintomáticos, con la ventaja de detectar desde pocas copias del virus (alrededor de 10-30 copias), en comparación con otras metodologías y es útil en el diagnóstico de casos reportados como indeterminados por métodos citológicos/histopatológicos. Así, el uso de la PCR permite manejar muestras de raspado endocervical, o bien, el manejo de muestras de orina o raspado uretral en individuos masculinos.

De igual forma Alameda y col. (2008) evaluaron 50 muestras de orina y 50 muestras de hisopados de cérvix. Para el análisis de estas muestras se aplicó la PCR, utilizando cebadores consenso y un método basado en micromatrices de baja densidad para la determinación del tipo viral. Los resultados muestran una concordancia del 80% entre los dos grupos de muestras. En las muestras de orina, la sensibilidad de la PCR para la detección de tipos de VPH relacionados con LIEAG fue del 100%, con especificidad de 80%, un valor predictivo positivo de 91% y un valor predictivo negativo de 100%. En función de sus resultados concluyen que la detección del VPH en muestras de orina puede utilizarse como método alternativo de detección sistemática en mujeres con una deficiente atención ginecológica.

Yerena y col., (2009) realizaron un estudio con fines preventivos y predictivos en pacientes que no habían presentado cambios clínicos visibles por daño celular en el epitelio genital, que asistían al Hospital Escuela de Ginecología y Obstetricia de la Universidad Veracruzana en México. La muestra consistió en 123 pacientes, con rango de edad de 18-50 años, cuyos resultados de PAP reportaron citología normal. La detección del genoma viral se efectuó por PCR anidada para incrementar la sensibilidad de detección del VPH. Se calculó la prevalencia del virus, así como la sensibilidad y especificidad del método, encontrándose un 9.75% de positividad para VPH en las muestras procesadas a partir del ciclo de amplificación con los primers MY09/11, lo que posteriormente cambió a un 12.2% de positividad de VPH luego de efectuado el segundo proceso de amplificación con los iniciadores GP5+/6+, registrando un incremento en la sensibilidad y especificidad de la detección viral mediante la PCR anidada, en comparación con la obtenida mediante la PCR con iniciadores MY únicamente. Esto pone en evidencia la importancia de la escogencia del método de detección, para lo cual se debe tomar en cuenta el tipo, las características y las condiciones de la muestra biológica.

JUSTIFICACIÓN

Hoy en día se sabe que la mayor parte de los cánceres invasores del cuello uterino están vinculados con la presencia del VPH en el cérvix, particularmente genotipos con altas propiedades oncogénicas, tales como los tipos 16 y 18. En países en desarrollo, sin embargo, sigue siendo un reto lograr que las mujeres, sobre todo en las zonas rurales, se sometan con regularidad a un examen pélvico ginecológico para la obtención de un frotis cervical, mediante el cual se consigue el material necesario para la detección del virus y el diagnóstico de cáncer cérvicouterino o de las lesiones precursoras.

La falta de acceso a servicios de salud, la escasez de recursos humanos y de laboratorio, el temor de las mujeres al examen ginecológico, aspectos culturales, sociales, morales, religiosos y la ignorancia acerca de la utilidad de la prueba son algunos de los factores que explican la poca frecuencia con que se efectúan frotis cervicales en algunas partes del mundo en desarrollo. Debido a esto, es de interés la evaluación y desarrollo de

métodos de detección vírica más fáciles de aplicar, menos incómodos y que no exijan personal adiestrado ni instrumentos especiales para la obtención de la muestra.

En tal sentido, el uso de muestras de orina pudiera convertirse en una variante útil en la detección de infección por VPH y el cribado de CCU, ya que presenta las siguientes ventajas: no necesita la intervención de personal adiestrado para su recolección, es un procedimiento indoloro y de bajo costo para el paciente y también es no invasivo. Sin embargo, también presenta desventajas como: la baja cantidad de material genético que pudiera obtenerse para su procesamiento, por lo cual se requieren estudios que contribuyan a reducir las limitaciones implicadas para mejorar y optimizar la detección y tipificación de VPH a partir de muestras de orina, así como para comparar los resultados derivados con los de estudios basados en muestras biológicas certificadas o de uso rutinario (ejemplo: biopsias y citologías endocervicales). Estas investigaciones permitirán evaluar el potencial del uso de muestras de orina en la detección de VPH, así como la posibilidad de su uso en programas de salud y de cribado del CCU.

Es importante mencionar que en Venezuela no existen estudios formales sobre el uso de muestras de orina para la detección de VPH.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar, mediante PCR, el genoma de VPH en muestras de orina y en hisopados de mujeres con lesiones sugestivas de infección por VPH en el examen clínico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Detección de VPH mediante PCR convencional en muestras citológicas y de orina en pacientes femeninas, con iniciadores genéricos MY09/MY11.
- Tipificación de las muestras positivas en la detección viral mediante PCR múltiple.
- Comparar los resultados obtenidos en la detección viral respecto a los tipos de material biológico utilizado, evaluando la sensibilidad y especificidad al usar muestras de orina y la concordancia entre los resultados obtenidos en cada caso.

METODOLOGÍA

POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó con pacientes femeninas que espontáneamente acudieron a la consulta del servicio de Dermatología de Infecciones de Transmisión Sexual (I.T.S) del Hospital Universitario de Caracas (HUC) de la Universidad Central de Venezuela, a las cuales se les invitó a formar parte del estudio, planteándoles las características del mismo.

Las pacientes fueron captadas en forma prolectiva durante el año 2013.

- **Muestras**

Las muestras a procesar correspondieron a hisopados o muestras citológicas y orinas de 35 pacientes con diagnóstico clínico de infección por VPH y de 18 pacientes sin lesiones aparentes al examen clínico.

A cada paciente se le presentaron dos documentos: una encuesta enmarcada en el proyecto de Misión Ciencias LPL-20070001088 (a partir de los cuales se obtuvo el financiamiento para este estudio) y un consentimiento informado para expresar su aprobación que debieron firmar voluntariamente; ambos documentos fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética del HUC.

Las muestras citológicas correspondieron a un raspado endocervical del tracto genital (hisopados) con un hisopo de Dacron Fisherbrand (Fischer Scientific). Las muestras de orina se recolectaron antes de la toma de muestras citológicas y fueron preservadas debidamente mediante congelación para el posterior análisis con técnicas de Biología Molecular para la detección y tipificación del VPH.

- **Toma de la Muestra**

Se propuso la colecta de 50 mL de orina aproximadamente, por parte del paciente. Seguidamente el personal de salud adscrito al servicio examinó el área genital y evaluó la existencia o no de lesiones, consecuentemente se obtuvo la muestra de la zona de transición del cérvix uterino con un hisopo de Dacrón, rotándolo 3 veces y descamando la

mayor cantidad posible de células del epitelio (figura 8 y 9 ver Anexos); las mismas se colocaron en un Eppendorf o un tubo con tapa de rosca de 2 mL con 1 mL de solución salina. Las muestras citológicas y de orina fueron transportadas, almacenadas a 4 °C y -20°C respectivamente.

- **Criterios de inclusión**

Entre las pacientes que acudieron espontáneamente a la consulta de dermatología de I.T.S para examen clínico o tratamiento, en el período referido, se incluyeron en el estudio las que presentaron las siguientes características:

- Mujeres con edad superior a 14 años; las menores de esta edad debieron tener aprobación de su representante legal.
- Inicio de la vida sexual previa al estudio.
- Lesiones sugestivas de infección por VPH.

- **Criterios de exclusión**

- Pacientes embarazadas.
- Pacientes con el sistema inmunológico comprometido o VIH positivos.
- Pacientes que no firmaron la carta de “Consentimiento Informado”.

- **Pacientes sin lesiones al examen clínico**

- Mujeres sin lesiones sugestivas de infección por VPH, aparentemente sanas al examen clínico.

EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

a) Hisopados:

- Se inició con el desprendimiento de las células exfoliadas vortericando cada muestra por 5 min a máxima velocidad. La suspensión de células se trasvasó a un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se procesaron con el estuche “ADN-Kit Axygen Biosciences” según las indicaciones de la casa comercial.
- Digestión: Se agregaron 400µl de Buffer G-B y 1 mL de Buffer DV, mezclando vigorosamente y centrifugando a 12.000g por 2 min.
- Se aspiró tanto como fue posible de la fase superior, conservando tanto la interfase precipitada como la fase inferior en el tubo. Luego se agregó 1 mL de Buffer DV a 4°C, mezclando bien y centrifugando a 12.000g por 2 min.
- Se descartó la fase superior y la fase inferior se transfirió a un filtro (Spin-filter) previamente colocado en un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se centrifugó a 12.000g por 1 min.
- Se descartó el filtro y se agregaron 400µl de Buffer BV al filtrado, mezclando por inversión rápida y repetidamente.
- Enlazamiento de Ácidos nucleicos: Se colocó una columna de intercambio aniónico en un tubo de microcentrifuga, se transfirió la mezcla del paso anterior a la columna y se centrifugó a 12.000 g por 1 min.
- Lavado: Se descartó el filtrado y se agregaron a la columna 500µl de Buffer W1, centrifugando a 12.000g por 1 min. Se descartó el filtrado.
- Se agregaron 700µl de Buffer W2 y se centrifugó a 12.000g por 1 min, descartando el filtrado y repitiendo el lavado con una segunda alícuota de 700µl de Buffer W2.
- Se descartó el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de centrífuga.

- **Elusión:** Para eluir el ADN genómico se agregaron de 100-200µl de eluente o de agua desionizada al centro de la membrana de la columna, dejando reposar por 1 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12.000g por 1 min.

b) Muestra de Orina:

- La muestra de orina se centrifugó a 20.000g durante 1 hora para sedimentar las células.
- El sedimento se lavó con 400µl PBS 1X y se centrifugó por 15 minutos a 20.000g.
- Se resuspendió el sedimento en 200µl de PBS 1X o solución salina y se trasvasó a un Eppendorf, para llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos empleando el estuche comercial ADN-Kit Axygen Biosciences, siguiendo las especificaciones de la casa comercial, según el protocolo antes descrito.

DETECCIÓN DE VPH MEDIANTE PCR CONVENCIONAL CON INICIADORES MY09/11

- Se colocaron 10µl del ADN extraído de la muestra en estudio en la mezcla de amplificación cuyos componentes se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Mezcla de PCR para la detección de VPH.

Componentes de la mezcla de PCR	Cantidades	Esquema de Amplificación
dNTP's (100 mM) (Invitrogen)	0,4 µL	94°C por 4 min 94°C por 15 min 55°C por 30 seg 72°C por 45 seg } Por 40 ciclos 72°C por 7 min
Iniciadores MY09/11 (100mM)	0,2 µL de cada uno	
Taq ADN polimerasa (2,5 U) (Invitrogen)	0,5 µL	
MgCl ₂ (50 nM) (Invitrogen)	4 µL	
Buffer 10X (Invitrogen)	6 µL	
H ₂ O libre de nucleasas	40 µL	

Los iniciadores genéricos MY09 y MY11 reconocen la región consenso L1 del genoma viral para obtener un producto de amplificación de 450 pb, indicado en la tabla 2 (Manos y col., 1989; Bosch y col., 2002). Se utilizaron también los iniciadores PC04/GH20 para amplificar simultáneamente un fragmento del gen humano de β -globina como control interno de la integridad y calidad del ADN y ausencia de inhibidores de la PCR, con los que se obtuvo un producto de 268 pb (Cañadas y col., 2006) (Ver tabla 1). Se incluyeron controles positivos (en los que se agregó ADN de una muestra positiva para el virus) y controles negativos (mezcla de reacción con ADN de un individuo sano + agua destilada).

Tabla 2. Secuencia de iniciadores o primers para la detección de VPH.

Iniciadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño del producto de PCR
MY09	CGT CCA AGA GGA TAC TGA TC	450 pb
MY11	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG	
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	268 pb
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	

- El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® ep (Eppendorf), según el esquema indicado en la tabla 1.

TIPIFICACIÓN DE VPH

- Las muestras positivas en la detección viral con los iniciadores MY09/11 fueron tipificadas mediante PCR múltiple, según los iniciadores descritos por Sotlar y col (2004) (Ver tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de iniciadores o primers para la PCR múltiple.

Iniciadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño del producto de PCR
F-HPV- 16	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	457 pb
R-HPV-16	CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	
F-HPV-18	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	322 pb
R-HPV-18	GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	
F-HPV-33	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	398 pb
R-HPV-33	GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	
F-HPV-6/11	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC	334 pb
R-HPV-6/11	TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	

F: forward; **R:** reverse

- Esta PCR múltiple permite identificar los siguientes tipos virales: 6/11 (334 pb) de bajo riesgo oncogénico, 16 (457pb), 18 (322 pb) y 33 (398 pb) de alto riesgo oncogénico.

Para ello, a la mezcla de reacción se agregaron 3 μL del ADN de cada muestra. La composición de la mezcla y condiciones de amplificación se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de PCR múltiple.

Componentes de la mezcla de PCR	Cantidades	Esquema de Amplificación
dNTP's (100 mM) (Invitrogen)	0,4 μL	94°C por 4 min 94°C por 30 seg } 56°C por 45 seg } Por 35 72°C por 45 seg } ciclos 72°C por 4 min
Coctel de iniciadores	1,6 μL *	
Taq ADN polimerasa (2,5 U) (Invitrogen)	0,5 μL	
MgCl ₂ (50 nM) (Invitrogen)	4 μL	
Buffer 10X (Invitrogen)	6,5 μL	
H ₂ O bidestilada	27 μL	

*0,2 μL de cada iniciador (100 mM)

ELECTROFORESIS

- Los productos de las amplificaciones se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, buffer TBE 1X (Invitrogen), teñidos con SYBR Safe 1X (Invitrogen), a 100V por 45 min aproximadamente.
- Luego fueron expuestos a luz UV para registro fotográfico, en una cámara de visualización ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad).

Pruebas Estadísticas

Se determinaron los valores de sensibilidad y especificidad de la detección viral al usar muestras de orina. Para ello se emplearon pruebas estadísticas (programa SPSS 2.0) y las ecuaciones descritas en Fernández y Díaz (2003). Se compararon los resultados obtenidos con los hisopados endocervicales y las orinas para evaluar sensibilidad y concordancia de la detección viral en muestras de orina respecto a dicha detección a partir de hisopados cervicales. Para la evaluación de la sensibilidad y concordancia se emplearon pruebas estadísticas usando el programa SPSS 2.0.

RESULTADOS

Características de la muestra

Población en estudio

Se estudiaron 53 mujeres, de estas, 35 correspondían a pacientes con diagnóstico de infección por VPH mediante examen clínico ginecológico; adicionalmente, se tomaron muestras a 18 mujeres sin lesiones visibles al examen clínico, lo cual permitió evaluar la utilidad de las muestras de orina en la detección de infecciones latentes o subclínicas. La edad promedio de las pacientes fue de $23,8 \pm 11,41$ años, siendo los 20 años cumplidos la edad más observada. La actividad tabáquica estuvo presente en un 37,2% (13/35) y el consumo de alcohol en un 74,3% (26/35) de las pacientes. La edad de menarquia mostró un promedio de $12,20 \pm 1,66$ años, siendo los 12 años el valor más frecuente referido en este rubro con un 37,1% (13/35) de las pacientes.

El número de parejas sexuales tuvo un valor promedio de $2,52 \pm 1,37$, siendo 2 parejas el valor más frecuente, en un periodo de 6 meses a un año.

En cuanto al estado civil de las pacientes infectadas, se encontró que el 91,4% (32/35) eran solteras, y el 8,6% (3/35) eran casadas; en esta última categoría se asume una pareja estable.

DetECCIÓN DE VPH

Hisopados cervicales

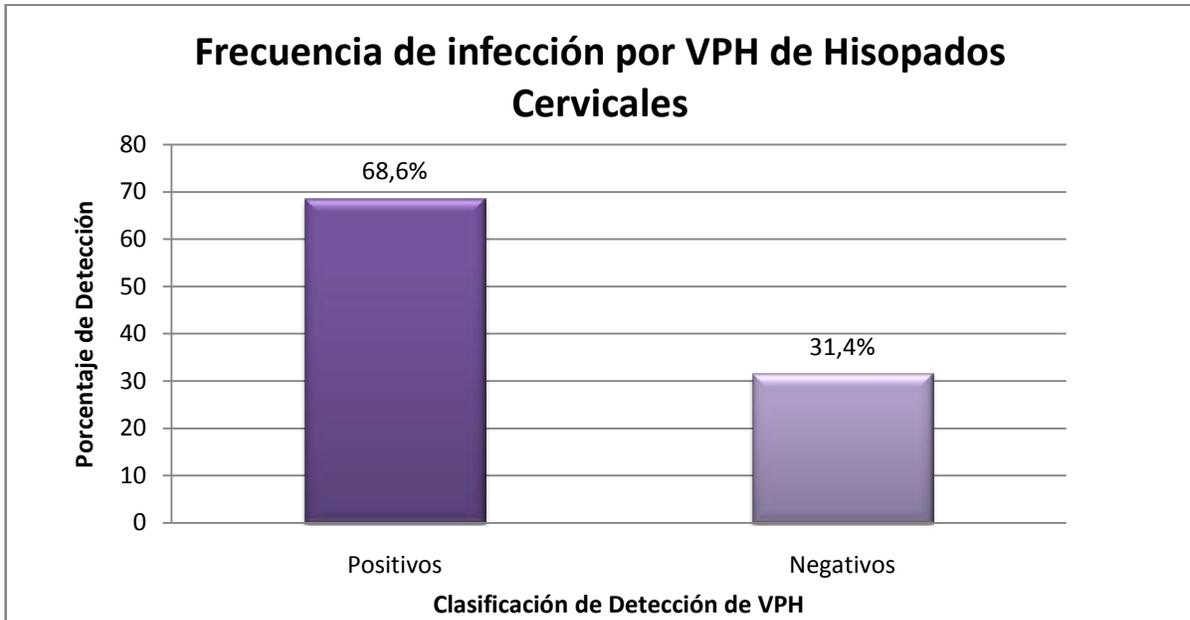


Figura 10. Detección de VPH en muestras de hisopados cervicales. n=35 pacientes/24 pacientes positivas.

Como puede observarse en la figura 10, del total de muestras evaluadas correspondientes a hisopados cervicales, en 68,6% (24/35) se detectó la presencia del genoma de VPH, indicando positividad para la infección, al presentar la banda esperada de 450 pb correspondiente al fragmento del gen L1 amplificado con los primers MY09/11 y un fragmento de 268 pb correspondiente al control interno (gen β -globina) amplificados con los primers PC04 y GH20. El 31,4% (11/35) resultó negativo para la infección viral y las muestras respectivas, solo presentaron la banda de 268 pb correspondiente al control interno (figura 16).

Muestras de orina

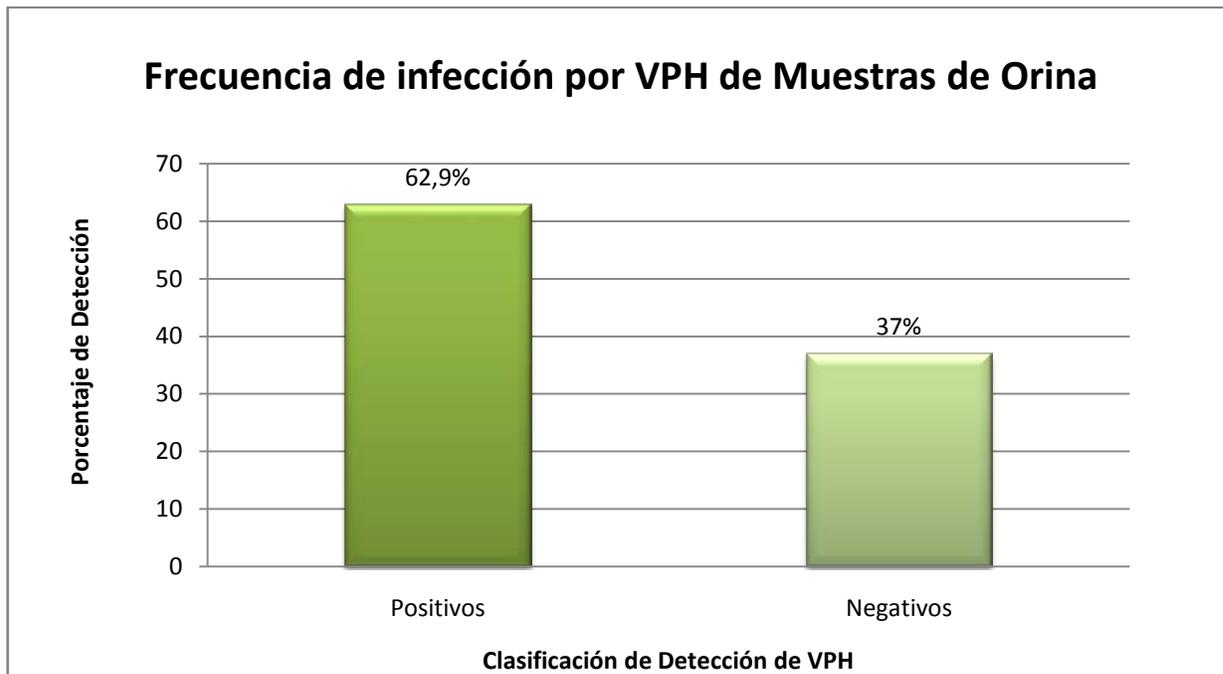


Figura 11. Distribución porcentual, para la detección de VPH en muestras de orina. n=35 pacientes/22 pacientes positivas.

La figura 11, muestra los resultados correspondientes a la detección de VPH en muestras de orina; se obtuvo que el 62,9% (22/35) presentó el genoma de VPH, indicando positividad para la infección, mientras que el 37% (13/35) resultó negativo para la infección viral (figura 16).

Tipificación de muestras positivas en la detección viral

Hisopados cervicales

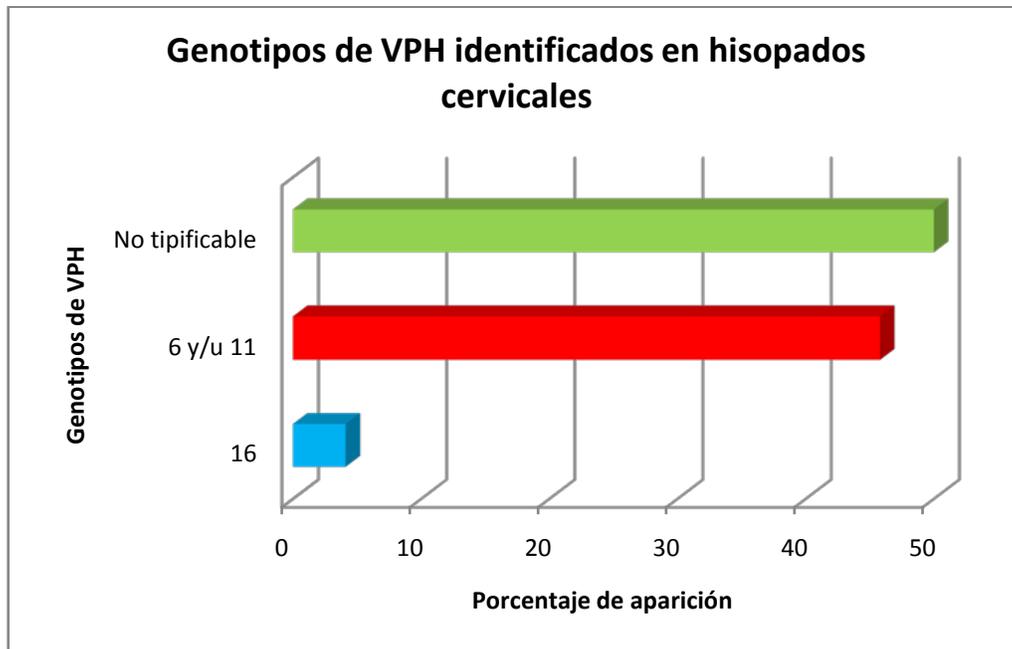


Figura 12. Tipificación de las muestras positivas para la infección por VPH en hisopados Cervicales. n=24.

En la figura 12 se muestran los genotipos de las muestras positivas de hisopado cervical, identificando los tipos 6 y/u 11 de bajo riesgo oncogénico en 45,8% (11/24), 16 de alto riesgo oncogénico en 4,1% (1/24), mientras que el 50% (12/24) de las muestras no pudo ser tipificado por la metodología empleada, por lo que se reportan como no tipificables (NT).

Muestras de orina

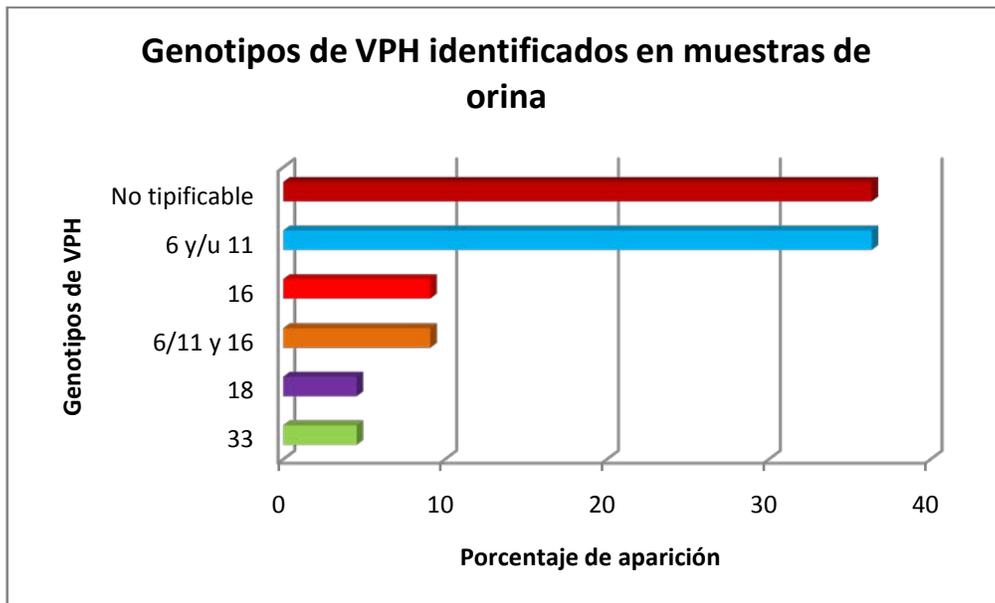


Figura 13. Tipificación de las muestras positivas para la infección por VPH en muestras de orina. n=22.

En la figura 13 se observan los resultados de la tipificación de las muestras de orina que resultaron positivas para la infección por VPH. El genotipo más frecuente fue el 6 y/u 11 de bajo riesgo oncogénico con un 36,36% (8/22), seguido del genotipo 16 de alto riesgo con un 9,09% (2/22), al igual que la infección mixta con los genotipos 6 y/u 11 y 16; los genotipos 18 y 33, ambos de alto riesgo oncogénico, se registraron en un 4,54% (1/22) en cada caso, también se obtuvo un porcentaje de muestras no tipificables por esta metodología correspondiente a un 36,36% (8/22).

Más adelante en la figura 17 se observa una electroforesis de la tipificación de un grupo de muestras positivas en la detección viral, las cuales fueron amplificadas mediante PCR múltiple. Se observaron distintas bandas correspondientes a los diferentes tipos virales.

Comparación de los resultados de detección de VPH entre hisopados cervicales y muestras de orina

Correspondencia de positividad al ADN viral en hisopados cervicales y muestras de orina

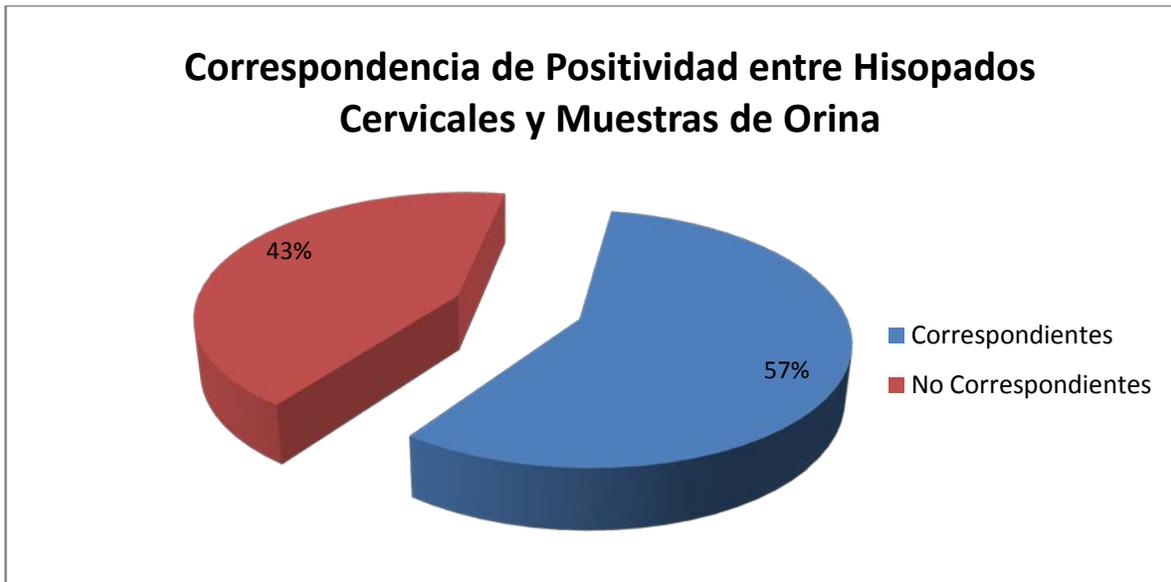


Figura 14. Comparación de positividad entre los dos tipos de muestras evaluados en el estudio (hisopados cervicales y muestras de orina).

Para establecer esta correspondencia se evaluaron los datos obtenidos en el proceso de detección mediante los dos tipos de muestras, registrando los positivos que coincidieran en ambos casos. Así al comparar la positividad entre hisopados y muestras de orina, se obtuvo una correspondencia de 57% (20/35). En contraste, el 43% de los casos presentó diferencias en la detección viral respecto a ambos tipos de muestras (figura 14).

Correspondencia de genotipos identificados en las muestras positivas para VPH

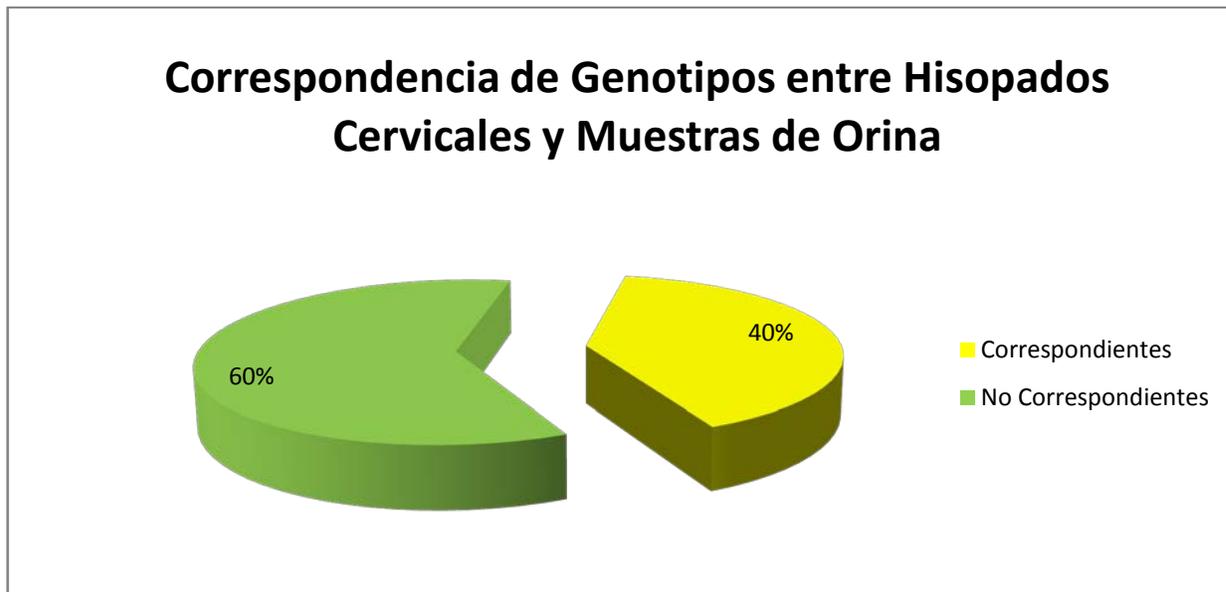


Figura 15. Relación de genotipos encontrados durante el proceso de tipificación para los dos tipos de muestras evaluados en el estudio (hisopados cervicales y muestras de orina).

Mediante los resultados obtenidos en el proceso de tipificación, tanto para los hisopados cervicales como para las muestras de orina, se determinaron los pacientes positivos en los que el genotipo de VPH coincidiera. Así del porcentaje de positividad descrito anteriormente para los dos grupos de muestras equivalentes al 57%, se obtuvo una correspondencia del 40% (8/20) para los genotipos identificados durante el proceso de tipificación, como se muestra en la figura 15, que incluyen los tipos 6 y/u 11 de bajo riesgo oncogénico y 16 de alto riesgo oncogénico.

Porcentajes de detección y tipificación para el grupo de pacientes sanas al examen clínico

Tabla 5. Detección y tipificación de VPH en grupo de pacientes sin lesiones aparentes de infección viral.

	Hisopado (%)	Orina (%)
Positivos	33,3%	33,3
Negativos	66,7	66,7
6 y/u 11	16,6	5,6
18	5,5	-
33	5,5	-
No Tipificables	5,5	27,8

En la tabla 5 se observan los porcentajes de positividad para la infección por VPH en pacientes sanas al examen clínico; en las muestras de hisopado cervical se obtuvo 33,3% de positividad siendo los genotipos de bajo riesgo oncogénico 6 y/u 11 los más frecuentes (16,6%), seguido de genotipos de alto riesgo oncogénico 18 y 33 con 5,5% cada uno. El 5,5% de estas muestras no pudo ser tipificada por la metodología empleada.

Respecto a las muestras de orina se obtuvo un 33,3% de positividad, del cual el 5,6% correspondió a los genotipos 6 y/u 11, el 27,8% restante a muestras no tipificables por esta metodología.

Evaluación del uso de muestras de orina para la detección de VPH

Tabla 6. Relación entre el resultado de la detección de VPH en muestras de orina respecto a hisopados cervicales.

Resultado de la Prueba de PCR (%)	Prueba de Referencia	
	Positivo (Hisopado)	Negativo (Hisopado)
Positivo (Orina)	57,14	5,71
Negativo (Orina)	11,42	25,71

Para evaluar la validez del uso de muestras de orina para la detección de VPH, se calcularon la especificidad y la sensibilidad teniendo como base o punto de referencia los resultados obtenidos con los hisopados cervicales, material usado rutinariamente en la detección viral. Se siguió el procedimiento descrito por Fernández y Díaz (2003) (ver tabla 6 y 7). Los resultados se distribuyeron en cuatro categorías: Verdaderos positivos (hisopados positivos y orinas positivas) donde se observó un 57,14%, verdaderos negativos (hisopados negativos y orinas negativas) con un 25,71%, falsos positivos (hisopados negativos y orinas positivas) con un 5,71% y falsos negativos (hisopados positivos y orinas negativas) con 11,42%.

Tabla 7. Análisis para la validez y seguridad de los resultados obtenidos empleando muestras de orina, respecto a las muestras de referencia (hisopados cervicales).

	% Pacientes
Sensibilidad	83,3
Especificidad	81,8
Valor predictivo positivo	90,9
Valor predictivo negativo	69,2

En la tabla 7 se presentan los cálculos de los valores de sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) como método de corroboración de la validez de los resultados obtenidos en muestras de orina respecto a la muestra de referencia (hisopado); obteniéndose un 83,3% y un 81,8% respectivamente.

Para evaluar la seguridad del resultado se calcularon el VPP (mide la probabilidad de que un individuo positivo para VPH realmente esté contaminado) y el VPN (mide la probabilidad de que un individuo negativo para VPH realmente no esté contaminado), obteniéndose valores de 90,9% y 69,2% respectivamente. Se considera que el VPP alto se relaciona con una alta probabilidad de la prueba en identificar verdaderos positivos para una patología; el VPN en este caso está por debajo del VPP y sería consecuencia de una alta prevalencia de la enfermedad, lo que afecta la detección de los verdaderos negativos.

Evaluación de la concordancia entre los resultados de hisopado cervical y muestras de orina

Tabla 8. Tabla de contingencia de los resultados obtenidos para los genotipos encontrados en ambos tipos de muestras (hisopados cervicales y muestras de orina).

Resultado en hisopado * Resultado Orina Tabla de Contingencia

	Resultado Orina							Total
	Negativo	Tipo 16	Tipo 18	Tipo 6-11	Tipo 16-6-11	No Tipificable	Tipo 33	
Resultado en hisopado								
Negativo	9	0	1	1	0	0	0	11
Tipo 16	0	1	0	0	0	0	0	1
Tipo 6-11	1	1	0	7	1	0	1	11
No Tipificable	3	0	0	0	1	8	0	12
Total	13	2	1	8	2	8	1	35

En la tabla 8 se expresan los datos obtenidos durante el proceso de tipificación de las muestras de orina e hisopados cervicales, agrupados según la relación de aparición de los genotipos respecto a los dos tipos de muestra. Posteriormente a través de esta tabla se llevaron a cabo análisis estadísticos de independencia y concordancia de los resultados antes mencionados.

Prueba de independencia

Tabla 9. Tabla de análisis de los resultados mediante la herramienta estadística Chi-Cuadrado.

	Valor	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)		
				Sig.	99% Intervalo de Confianza	
					Límite Inferior	Límite Superior
Pearson Chi-Cuadrado	58,813 ^a	18	,000	,000 ^e	,000	,001
Casos válidos de N	35					

En la tabla 9 se presentan los valores obtenidos mediante la evaluación por el estadístico Chi-Cuadrado para el análisis de independencia de los resultados mostrados en la tabla 9, en función de los siguientes criterios:

1. H₀ (Hipótesis Nula) = Los resultados en orina son independientes de los de hisopado.
2. H_a (Hipótesis Alternativa) = Los resultados en orina no son independientes de los de hisopado.
3. Con $P < 0,05$ se rechaza la H₀ correspondiente a que los resultados en orina son independientes de los de hisopado.

Se obtuvo un $p < 0,05$, ($p = 0,01$) lo que implica que los resultados obtenidos con ambas muestras en la detección y tipificación viral son similares (no son independientes).

Prueba de concordancia

Tabla 10. Tabla de Medidas de Simetría específicamente el estadístico de concordancia Kappa y los casos válidos de N.

Medidas de Simetría					
	Valor	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.	Monte Carlo
					Sig.
Medida de Concordancia Kappa	,609	,098	6,272	,000	.
Casos Válidos de N	35				

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos mediante el empleo de la prueba estadística kappa utilizada para relacionar los resultados de PCR para hisopados cervicales y para muestras de orina. La escala de referencia empleada fue la siguiente (tomado de Molinero, 2001):

Escala cualitativa:

kappa	grado de acuerdo
< 0	sin acuerdo
0 - 0,2	insignificante
0,2 - 0,4	bajo
0,4 - 0,6	moderado
0,6 - 0,8	bueno
0,8 - 1	muy bueno

Tomado de: Molinero L. 2001.

Con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

Se obtuvo una concordancia “Buena” en cuanto a los tipos virales identificados (k=0,609; entre 0,6-0,8).

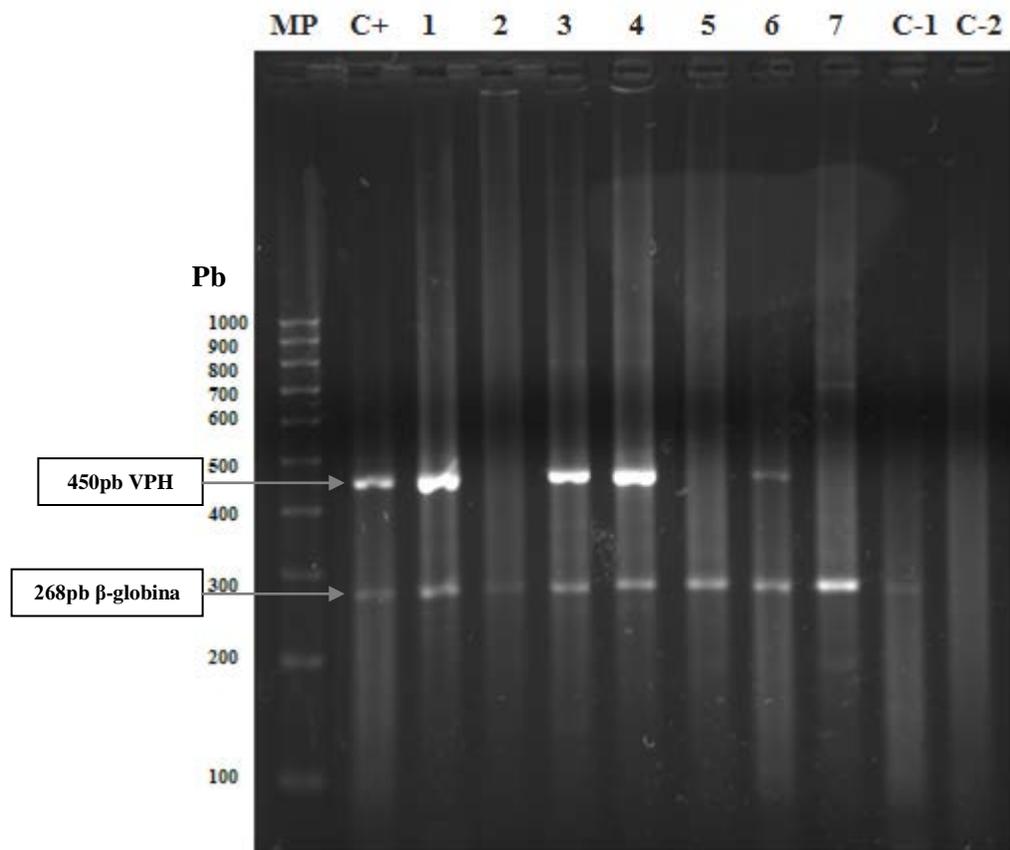


Figura 16. Visualización de la detección de VPH mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%; **MP:** Marcador de peso molecular (100 pb Invitrogen); **C+:** Control positivo (indicador a 450 pb) y control interno de la integridad del ADN (gen de β -globina a 268pb); **1, 3, 4, 6:** Muestras de pacientes VPH positivas; **2, 5 y 7:** Muestras de pacientes VPH negativos; **C-1:** Control negativo con ADN de paciente sano (se observa la banda de 268pb corresponden al gen β -globina); **C-2:** Control negativo (solo mezcla).

En la figura 16 se observa una electroforesis en gel de agarosa al 2% en la que se describen 11 carriles; en el primer carril (**MP**) se colocó el marcador de peso molecular de Invitrogen el cual luego de la corrida electroforética mostró 10 bandas de 100pb, en el segundo carril (**C+**) se muestra el control positivo indicado por una banda de 450pb y una segunda banda de 268pb correspondiente al gen de β -globina que funciona como control interno de la integridad del ADN, desde el tercer hasta el noveno carril (**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**) se observan bandas correspondientes a muestras de distintos pacientes positivos y negativos para el

VPH como se menciona en la leyenda, en el decimo carril (**C-1**) se observa solo la banda de 268pb correspondiente al gen de β -globina debido a que en este carril se colocó una muestra de ADN de un paciente sano como control negativo, en el onceavo carril (**C-2**) no se observan bandas ya que esta el control negativo solo con mezcla de amplificación.

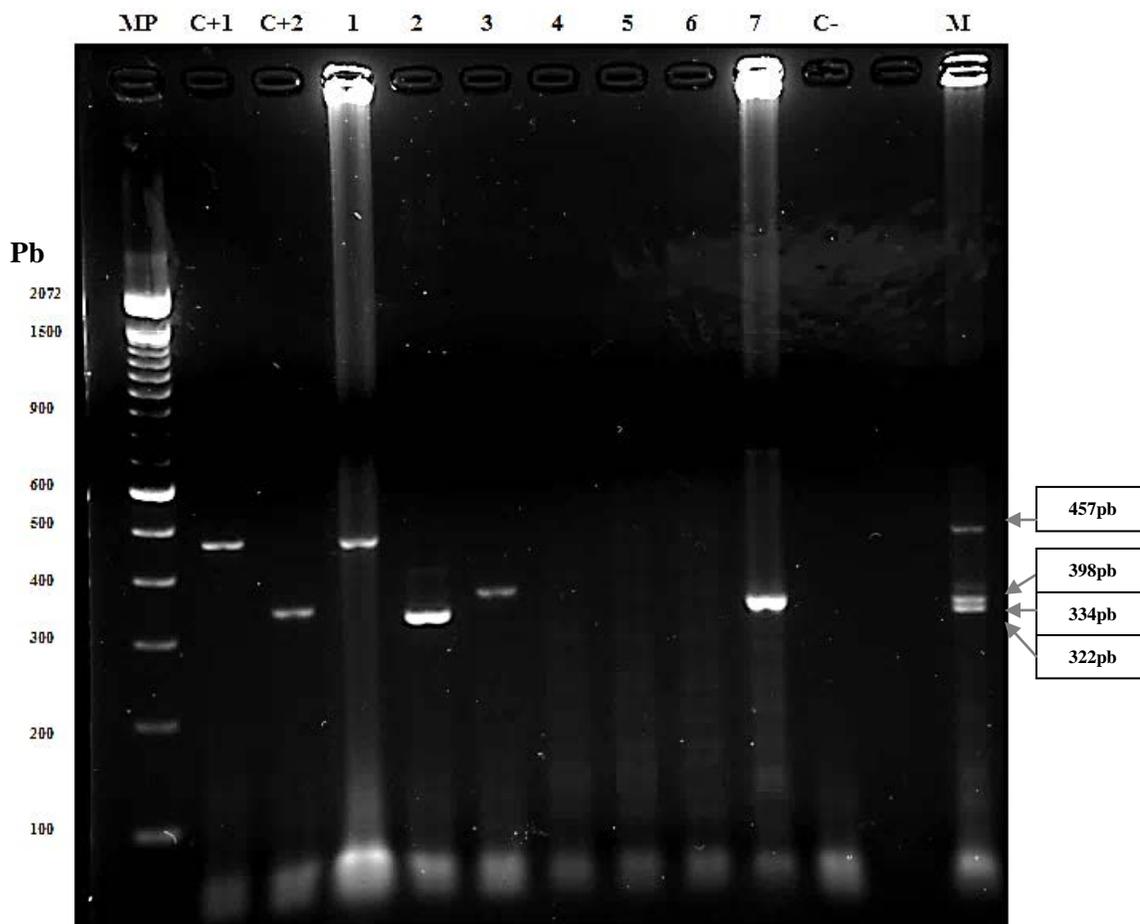


Figura 17. Visualización de la tipificación de VPH mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%; **MP:** Marcador de peso molecular (100 pb Invitrogen); **C+1:** Control positivo de VPH tipo 16 (indicador a 457pb); **C+2:** Control positivo de VPH tipo 6 y/u 11 (indicador a 334pb); **1:** Muestra de paciente VPH positiva tipo 16; **2:** Muestra de paciente VPH positiva tipo 18; **3:** Muestra de paciente VPH positiva tipo 33; **4, 5, 6:** Muestras de pacientes VPH positivas No Tipificables por esta metodología; **7:** Muestra de paciente VPH positiva tipo 6 y/o 11 (334pb); **C-:** Control negativo; **M:** Control positivo con la mezcla de genotipos de VPH tipos 18 (322 pb), 6 y/u 11 (334 pb), 33 (398 pb) y 16 (457 pb) .

En la figura 17 se observa una electroforesis en gel de agarosa al 2% en la que se describen 13 carriles; en el primer carril (**MP**) se colocó el marcador de peso molecular de Invitrogen el cual luego de la corrida electroforética mostró 9 bandas de 100pb, en el segundo carril

(C+1) se muestra el control positivo de VPH tipo 16 indicado por una banda de 457pb, en el tercer carril (C+2) se muestra el control positivo de VPH tipo 6 y/u 11 indicado por una banda de 334pb, desde el cuarto hasta el decimo carril (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) se observan bandas correspondientes a los genotipos de distintos pacientes positivos para el VPH como se menciona en la leyenda, en el onceavo carril (C-) no se observan bandas ya que en este se encuentra el control negativo solo con mezcla de amplificación, en el último o decimo segundo carril (M) se presenta el control positivo con la mezcla de los genotipos, observando así cuatro bandas de 322 pb (VPH 18), 334 pb (VPH 6 y/u 11), 398 pb (VPH 33) y 457 pb (VPH 16) identificadas en este estudio .

DISCUSIÓN

Aunque se han necesitado alrededor de 20 años para establecer la asociación causal entre el cáncer cervical y la infección persistente por VPH, en la actualidad la historia natural de la infección por este virus y esta malignidad es ampliamente conocida y por ello, se han desarrollado pruebas de detección del ADN del VPH de alto y bajo riesgo para mejorar la eficiencia, precisión y efectividad en la detección oportuna del cáncer cervical, como estrategia de prevención secundaria (Canche y col., 2011).

Actualmente, vivimos una etapa histórica en relación con el control del cáncer cervical, si consideramos el nuevo paradigma para la prevención primaria y secundaria de la enfermedad, en muchos países desarrollados utilizan la detección molecular del virus como método para prevenir lesiones precursoras de cáncer, lo cual funge como apoyo al diagnóstico clínico. Conforme a lo antes mencionado países en vía de desarrollo como Venezuela buscan incluir esta visión en sus programas de salud, como es el caso del Hospital Universitario de Caracas en su servicio de Dermatología, específicamente en la consulta de Infecciones de Transmisión sexual, que bajo el apoyo de Laboratorios como el de Genética Molecular en el Instituto de Oncología y Hematología, permitiendo así una mejor valoración del paciente ya que proporciona información adicional y en ocasiones relevante al diagnóstico clínico.

Dentro de las regiones del mundo con mayor prevalencia de los tipos de VPH de alto riesgo oncogénico (tipos 16, 18, 31, 33, 45, 59, entre otros) se encuentran África y América Latina (de este último Venezuela con los tipos 16 y 18) (Muñoz, 2000; Muñoz y col., 2003). El tipo 16 es el más frecuente en todo el mundo, excepto en Indonesia y Argelia, donde el tipo 18 es el más común (Wieland y Pfister, 1997). El tipo 45 presenta alta frecuencia en África Occidental (Wieland y Pfister, 1997) y por último, los tipos 33, 39 y 59 se concentran en Centroamérica y Sudamérica (Jastreboff y Cymet, 2002).

Atendiendo a la edad de las pacientes, los estudios demuestran que la prevalencia máxima de VPH cervical (estudiada por técnica de PCR) se encuentra ubicada entre los 20 y 25 años de edad (Muñoz, 2000; Wieland y Pfister, 1997), que al compararse con este trabajo en el que se obtuvo un promedio de edad de $23,8 \pm 11,41$ años, siendo los 20 años

la edad más observada en la población conformada por 35 mujeres con diagnóstico clínico de infección por VPH, se corrobora su correspondencia con el rango descrito por Muñoz, 2000 y Wieland y Pfister, 1997, en sus trabajos. También se sabe que solo entre el 10% y el 20% de las mujeres positivas al VPH (a nivel cervical) muestran alteraciones citológicas, por ello, las mujeres con Papanicolaou negativo presentan una frecuencia que oscila entre el 3,7% y el 47,9% según el método y la población estudiada (Wieland y Pfister, 1997).

Por otra parte, teniendo en cuenta la relación establecida entre el VPH y el cáncer cérvico-uterino, es de alta relevancia considerar que con el paso de los años, se han incrementado los casos de este tipo de carcinoma.

Se estima que el cáncer cérvicouterino causa alrededor de 500.000 muertes al año en el mundo, con una incidencia cercana a 40 por cada 100.000 mujeres en países en vía de desarrollo (Franco y col., 2001). De hecho, en Estados Unidos, se ha incrementado la incidencia y la mortalidad por este tipo de cáncer en las mujeres hispanas, en comparación con la población no hispana, además de que se está diagnosticando a una edad más temprana (45 años vs 48 años de edad). Este fenómeno podría deberse a que en Estados Unidos la población hispana es un grupo generalmente con limitados recursos económicos, escasa educación sexual y con mayor cantidad de factores de riesgo asociados (Watson y col., 2008).

Actualmente, hay 310 millones de mujeres infectadas con VPH; de estas, 56 millones han desarrollado algún tipo de cáncer de cuello de útero (Instituto Catalán de Oncología, 2007). Anualmente, en la región de las Américas se reportan aproximadamente 92.136 casos de cáncer cérvicouterino y 37.640 defunciones (Organización Panamericana de la Salud, 2005).

En Venezuela, en el año 2006 fue la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, con 2.141 casos y el 4,56 % del total de muertes femeninas ocurridas ese año (MPPS, 2007). Datos oficiales del Ministerio del Poder Popular para la Salud, señalan que para el año 2007 murieron 1.571 mujeres por cáncer de cuello uterino y padecieron la enfermedad unas 3.700 mujeres, siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, superando los casos de muerte por cáncer de mama (MPPS, 2009).

La carga de enfermedad cervicouterina atribuible a la infección por VPH no se limita al cáncer, sino que incluye una proporción incluso mayor de lesiones cervicouterinas premalignas (Organización Panamericana de la Salud, 2005).

Son variados los procedimientos que se utilizan para la detección del virus, dentro de los cuales resalta la PCR por su alta sensibilidad y especificidad.

En cuanto al tipo de muestra biológica generalmente se utilizan hisopados cervicales y biopsias, los cuales pueden resultar incómodos, invasivos y con limitaciones de toma dependiendo del área geográfica, la disponibilidad de recursos y personal especializado y las costumbres e ideologías culturales, sociales y religiosas.

Es por ello que las muestras de orina pudieran convertirse en fuentes potencialmente útiles para la detección y tipificación del VPH y en consecuencia, en la pesquisa, prevención y control del CCU, ya que su uso reduce o elimina las limitaciones mencionadas. Pero son necesarios estudios que aporten conocimiento sobre su utilidad y efectividad en relación o en comparación a las muestras usadas convencionalmente, así como también para la estandarización de procedimientos basados en este tipo de muestras.

En base a lo expuesto, en el presente trabajo se llevó a cabo la detección del virus de papiloma humano (VPH) y tipificación según su genotipo, por medio de la técnica de PCR convencional con primers genéricos y su variante PCR múltiple, usando dos tipos de muestras: hisopados cervicales (comúnmente empleados) y muestras de orina, en un grupo de mujeres con diagnóstico clínico para esta infección, que acudieron espontáneamente a la consulta de Infecciones de Transmisión Sexual del Hospital Universitario de Caracas.

De acuerdo a las series americanas, que registran prevalencia de infección por VPH desde 26,8% en población general de 14 a 59 años, hasta 44,8% en el grupo de 20 a 24 años de edad, se evidencia que el valor obtenido en este estudio fue mayor a los mencionados anteriormente, obteniéndose así un 57,14% (20/35) de concordancia de positividad entre las muestras empleadas para la detección viral en pacientes con un rango de edad de 14 a 72 años y un promedio de $24,2 \pm 11,4$ lo cual podría deberse al tamaño muestral determinado para este trabajo, las diferencias culturales referentes a la sexualidad, entre ambas poblaciones, las diferencias entre los tipos de muestras, el momento y

condiciones de la toma, la distribución o ubicación del virus en los tejidos del tracto genital de las pacientes y la carga viral.

Se ha señalado que a pesar del visible incremento de casos de mujeres infectadas por algún tipo de VPH oncogénico la mayoría de estas no presentan cáncer cérvicouterino. Esto sugiere que otros factores adicionales que actúan conjuntamente con el VPH influyen en el riesgo de aparición de la enfermedad. Cofactores como la paridad, el uso de anticonceptivos orales, el tabaquismo, la inmunosupresión particularmente la relacionada con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la infección por otras enfermedades de transmisión sexual y la desnutrición se han asociado, en grado variable, con la aparición de cáncer invasivo del cuello uterino. Sin embargo, su función específica en la aparición del cáncer cérvicouterino es poco clara aún. La sexarquia temprana (inicio de la actividad sexual antes de los 18 años), la promiscuidad de cualquiera de los integrantes de una pareja sexual o número de compañeros sexuales, los antecedentes de infecciones de transmisión sexual y otras características de la actividad sexual se vinculan con la probabilidad de contraer VPH.

El promedio de edad de la población en estudio, conformada por 35 mujeres con diagnóstico clínico de infección por VPH, fue de $23,8 \pm 11,41$ años y presentó varios de los factores de riesgo mencionados como consumo de alcohol, tabaco, uso de anticonceptivos, sexarquia temprana, más de una pareja sexual en un periodo de 6 meses a un año. Estas características o condiciones son consideradas por autores como Walboormers y col. (1999), Bosch y col. (2003), Moreno y col. (2002), Hildesheim y col. (2001), entre otros, cofactores en el riesgo a desarrollar CCU.

Unido a esto, se detectó la presencia de ADN de VPH en 68,8% de los hisopados cervicales y 62,9% de las muestras de orina, con una correspondencia de positividad de 57%; las discrepancias en la positividad entre las muestras de un mismo paciente pueden ser consecuencia de diferencias en cuanto al tipo de muestras, la distribución o ubicación del virus y la carga viral al momento de la toma (Vorsters y col., 2012). Esta concordancia fue menor a la obtenida por Stanczuk y col. (2003) de 79%, quienes trabajaron con 43 pacientes a las que se le tomaron hisopados cervicales y muestras de orina, y por Alameda y col. (2008) de 80% al trabajar con hisopados cervicales y muestras de orina de 50

pacientes con diagnóstico clínico de LIE de alto y bajo grado. La diferencia entre estos valores de concordancia y el reportado en el presente estudio pueden atribuirse a diferencias en las características de las poblaciones estudiadas, el grado de las lesiones y/o la metodología empleada en cada estudio.

En cuanto al porcentaje de detección, al comparar con otros estudios, Yerena y col. (2009) con las 123 pacientes femeninas y reportaron un 12,2% de positividad para el virus, debido a que estas pacientes presentaban resultados de citología normal (pacientes que no presentan daño celular), además establecen comparaciones con los resultados obtenidos por Torrella y col. (Citado por Yerena y col., 2009) un 17% y Carrillo y col. (2004) con 23,1%, valores por debajo del obtenido en el presente estudio.

En consecuencia, a pesar de que la mayoría de las pacientes participantes en el estudio no presentaban lesiones de riesgo, la combinación de la positividad al virus y cofactores como tabaquismo, consumo de alcohol, uso de anticonceptivos, entre otros, indica que deben ser evaluadas con mayor atención y frecuencia por personal especializado, con fines preventivos.

Como se mencionó en los resultados, dentro de las muestras positivas en la detección viral se logró identificar cuatro genotipos distintos; en las muestras de hisopado cervical se obtuvieron los genotipos 6 y/u 11 de bajo riesgo oncogénico en un 45,8% (11/24), 16 de alto riesgo oncogénico en 4,2% (1/24) y 50% (12/24) no pudo ser tipificado por esta metodología. En la tipificación de muestras de orina se identificaron los genotipos 6 y/u 11 de bajo riesgo oncogénico en 36,36% (8/22), 16 de alto riesgo oncogénico en 9,09% (2/22), 18 de alto riesgo oncogénico en 4,54% (1/22), 33 de alto riesgo oncogénico en 4,54% (1/22), infecciones mixtas con los tipos 6 y/u 11 y 16 de alto y bajo riesgo oncogénico en 9,09% (2/22) y 36,36% (8/22) de las muestras resultó no tipificable por la metodología utilizada.

Respecto a los tipos virales detectados en Venezuela en estudios previos, como el de Correnti y col. (2002), y otros de distintos países como los de Muñoz y col. (2003), Suarez y col. (2006), Ghaffari y col. (2006), Aedo y col. (2007), tuvieron como denominador común la identificación de VPH de alto riesgo oncogénico, en contraste a los

resultados del presente trabajo donde se detectó principalmente VPH de bajo riesgo oncogénico. Esto pudiera deberse a diferencias en las metodologías utilizadas en la detección y tipificación, así como al área geográfica y al tipo y complejidad del diagnóstico o las lesiones de la población estudiada en cada caso. Estos resultados son similares a los reportados por Scucces y Panecasio (2001) quienes obtuvieron un 25% de detección de virus de bajo riesgo oncogénico en su estudio. Cabe resaltar que se debe tomar en cuenta que hubo un porcentaje de pacientes que resultaron positivos para VPH de alto riesgo oncogénico, por lo que es recomendable una vigilancia más activa respecto a esos casos específicamente, por ser más susceptibles de desarrollar un cáncer de cuello uterino, teniendo en cuenta que la PCR es una prueba de gran sensibilidad y especificidad para la detección y tipificación del VPH, sin embargo se debe tener presente que en este estudio solo se incluyó 4 iniciadores que reconocen secuencias de 4 de los más de 100 genotipos de VPH presentes para el proceso de tipificación (Salazar, 2007).

Para comparar la detección y tipificación viral con hisopados cervicales y muestras de orina, se llevó a cabo la determinación de la sensibilidad y especificidad, tomando en cuenta los valores predictivos positivos y negativos respecto a las muestras empleadas, según Fernández y Díaz (2003). La sensibilidad permite clasificar correctamente a un individuo enfermo, por lo tanto, es la capacidad del test para detectar la enfermedad, y la especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, por lo tanto es la capacidad de la prueba para detectar los individuos sanos. El valor predictivo positivo es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test mientras que el valor predictivo negativo establece la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Así en este estudio se registró una sensibilidad de 83,3%, una especificidad de 81,8%, un valor predictivo positivo (VPP) de 90,9% y un valor predictivo negativo (VPN) de 69,2%. Esto significa que existe una alta probabilidad de determinar eficazmente la presencia o ausencia de ADN de VPH en muestras de orina, ya que se obtuvieron valores por encima del 80%. Estos valores son similares a los reportados por Tanzi y col. (2013) quienes obtuvieron una sensibilidad del 98,6%, una especificidad del 97,4% en la detección de ADN del VPH en orina en un trabajo donde también usaron hisopados de cuello uterino, estos resultados son un poco más altos a los obtenidos en este estudio, lo cual pudiera atribuirse a las diferencias entre

las metodologías empleadas para cada trabajo ya que Tanzi y col. (2013) emplearon para la tipificación una PCR combinada con análisis de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), también varía el tamaño y las condiciones de la población en estudio ya que los autores mencionados evaluaron 107 pacientes infectadas con VIH, por lo que son más susceptibles a adquirir una infección por VPH y que esta progrese a una lesión intraepitelial de bajo o alto grado, con riesgo de generar hasta un cáncer cérvicouterino.

Además se realizó el análisis estadístico de independencia y concordancia para comparar los resultados de hisopado cervical y muestras de orina como se mencionó en los resultados; mediante la prueba no paramétrica Chi-Cuadrado con la que se evaluó independencia, encontrándose que dichos resultados no son independientes, sino similares ($p < 0,05$, $p = 0,01$). Para el análisis de concordancia se empleó la prueba estadística kappa. Se obtuvo una concordancia buena, respecto a los tipos virales identificados, con un $k = 0,609$ (incluido dentro del rango de 0,6-0,8), respecto a la escala establecida por Molinero, 2001.

La diferencia en el porcentaje de la detección de VPH empleando muestras de orina es ligeramente menor al obtenido con los hisopados cervicales. Sin embargo, según los estadísticos de prueba Chi cuadrado e índice Kappa, se obtuvo una buena concordancia. Esta diferencia pudiera eliminarse aplicando variaciones metodológicas como por ejemplo; utilizando un volumen mayor en la colecta de orina. A este respecto, el trabajo de Vorsters y col. (2012) consiste en una recopilación de 41 estudios, se describen volúmenes de colecta de orina que van desde 400-600 mL para la obtención aproximada de 200 μ l de células descamadas del canal uretral compactas en un pellet. Según los autores, si se aumenta el volumen de orina para el estudio, pudieran aumentarse los porcentajes de detección viral con este tipo de muestras y, por ende, se lograría una mayor estimación de dependencia y concordancia en los resultados.

En un estudio similar al presente realizado en Zimbabwe por Stanczuk y col. (2003) se emplearon muestras de orina e hisopados cervicales de 43 mujeres con cáncer cervicouterino invasor para efectuar un análisis de muestras apareadas, empleando la PCR anidada con cebadores degenerados para detectar e identificar los diferentes tipos de VPH.

Los autores detectaron VPH en 72% de las muestras de orina y 98% de las muestras obtenidas por hisopados cervicales, identificando VPH 16 en un 59% de las últimas, seguido de los tipos 33 (31%), 18 (14%) y 31 (2%). Registraron una concordancia entre los resultados del frotis cervical y las muestras de orina de 79%, indicando que en la mayoría de los casos un mismo tipo de VPH estuvo presente en el epitelio del cérvix y de la vejiga. Así estas observaciones coinciden con las obtenidas en el presente estudio en cuanto a la concordancia y la dependencia de los resultados obtenidos con ambos tipos de muestra. Sin embargo, es importante resaltar que en el caso de las muestras de hisopado cervical solo fue posible la identificación de VPH tipo 16 en contraste a lo descrito por Stanczuk y col. (2003).

En relación a los resultados de distintos estudios sobre detección de VPH con muestras de orina, hay gran variabilidad, incluyendo valores completamente negativos. Así, al comparar el porcentaje de detección de VPH con muestras de orina obtenido en este estudio 62,9%, con los de otros trabajos, como el de Tanzi y col. (2013) se considera como un valor menor, ya que los investigadores obtuvieron un porcentaje de detección de 64,5%, un poco más alto al obtenido en el presente trabajo. Esto pudiera explicarse por diferencias en las metodologías empleadas y en la severidad del diagnóstico clínico; debido a que tanto el protocolo de extracción como el método de detección y tipificación es distinto al planteado en este estudio, ya que Tanzi y col. Se basaron en un ensayo de PCR combinado con RFLP para la identificación de genotipos virales. Se ha señalado además que este protocolo es más sensible aunado al hecho de que el tamaño de la muestra fue mayor, y en las características de la población resaltaba el estado inmunológico comprometido de 107 pacientes femeninas (infectadas con VIH).

Otros trabajos reportaron porcentajes de detección viral menores al obtenido en el presente estudio, como el de Alameda y col. (2007) que evaluaron 50 muestras de orina de mujeres de Barcelona, España, con un rango de edad de ± 36 años, obteniendo un 22% (11/50) de positividad para ADN de VPH mediante PCR con primers MY09/MY11, o el de Sellors y col. (2000) que evaluaron 200 muestras de orina de mujeres en Hamilton, Canadá, con un promedio de edad de $\pm 31,5$ años, referidas por anomalías en la citología cervical, encontrando positividad del 35% (69/200) para el ADN del virus; esto

podiera atribuirse a las diferencias en las metodologías aplicadas en cada caso, así como a la ubicación geográfica y al riesgo asociado de las poblaciones estudiadas en cada trabajo, al igual que características como la edad promedio de las pacientes incluidas en el estudio.

A parte de la muestra estudiada compuesta por pacientes femeninas con historia de VPH, también se evaluó una muestra constituida por mujeres sin hallazgo clínicos y/o citológicos sugestivos de infección por VPH y sin antecedentes de la misma, encontrando 33,3% de positividad para el ADN del virus tanto en muestras de orina como en hisopados cervicales, detectando la existencia de posibles infecciones latentes en pacientes que se muestran sanas al examen clínico.

El análisis de pacientes aparentemente sanas al examen clínico resulta importante por distintas razones, dentro de éstas se encuentra que la infección por VPH es tejido específica y en general produce diferentes tipos de lesiones iniciando con una infección latente, que se caracteriza por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de enfermedad. Sin embargo, el virus está ahí y en ocasiones puede ser detectado por técnicas moleculares específicas como la PCR (Lizano y col., 2009). Debido a esto, el establecimiento de la detección de ADN de VPH en apoyo al análisis clínico como método de despistaje es de vital importancia para el cuidado y seguimiento de las pacientes con sospecha de infección por VPH, sin lesiones aparentes o con lesiones pasadas, lo cual contribuiría con la prevención del desarrollo subsiguiente de lesiones o neoplasias intraepiteliales y cáncer de cuello uterino, así como con un mayor control epidemiológico. Debido a esto, las muestras de orina también son útiles en la detección de infecciones subclínicas o latentes.

En relación a lo anterior, en otros trabajos como la recopilación de Vorsters y col. (2012) varios de los autores señalan la importancia de incorporar la detección del ADN viral en programas de pesquisa junto con la citología convencional, por considerar que ello contribuiría con la detección de infecciones latentes y esto, a su vez, incrementaría la eficiencia de programas de control y prevención, además de contribuir con la correcta vigilancia de pacientes y el éxito de los tratamientos.

La orina como muestra para la detección de VPH ha sido objeto de un gran número de estudios, debido a las ventajas como método no invasor, para uso frecuente y que puede ser tomada por el mismo sujeto de estudio/paciente. Por otro lado, permitiría la obtención rápida y análisis de un gran número de muestras. Uno de los problemas en este tipo de muestras es que las concentraciones de ADN obtenidas de la orina no son constantes durante la micción. Para la mayor parte de los individuos la primera micción es la que contiene la mayor concentración de ADN (Johnson y col., 2007).

Respecto a lo antes mencionado algunos autores consideran que, aunque el uso de frotis o hisopado cervical permite mayor sensibilidad que el uso de orina para la detección de VPH, la sensibilidad con esta última podría incrementar utilizando un mayor volumen o repitiendo el proceso de extracción para captar una mayor cantidad de ADN del virus. En general, aún en condiciones de baja sensibilidad, su uso permite por lo menos identificar al grupo de mujeres que, por estar crónicamente infectadas por VPH, corren un mayor riesgo de tener o de contraer un cáncer cervicouterino (Stanczuk y col., 2003).

Así, aunque el Papanicolaou es la prueba de referencia por excelencia a nivel mundial para el despistaje de cambios citológicos, la detección del ADN viral mediante métodos moleculares como la PCR a través de frotis o hisopado cervical al igual que con la inclusión de muestras en actual estudio como las de orina, poseen mayor sensibilidad y permiten el hallazgo de infecciones subclínicas o latentes.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apuntan y resaltan el potencial y la utilidad de las muestras de orina en procedimientos de despistaje y diagnóstico clínico del VPH. Sin embargo, es necesaria la realización de estudios con poblaciones mayores, abarcando distintos rangos de edades así como diferentes manifestaciones clínicas y grados de lesiones asociadas a CCU para poder recomendar el uso generalizado de muestras de orina con este propósito.

También es importante la comparación con hallazgos citológicos y cofactores de la infección por VPH, así como de distintos métodos o procedimientos de detección y tipificación viral en base a este tipo de muestras.

CONCLUSIONES

En la población de mujeres estudiadas con un diagnóstico clínico de infección por VPH, la prevalencia general de infección por este virus fue de 68,6% en muestras de hisopado cervical y 62,9% en muestras de orina.

Entre las pacientes positivas para VPH en hisopados cervicales, 45,8% presentó VPH de bajo riesgo oncogénico (6 y/u 11), 4,1% de alto riesgo oncogénico (16) y 50% no se logró tipificar por la metodología utilizada.

De las pacientes positivas para VPH en muestras de orina 36,36% presentó VPH de bajo riesgo oncogénico (6 y/u 11), 9,09% de alto riesgo oncogénico tipo 16 y 4,54% de alto riesgo para los tipos 18 y 33, 9,09% infección mixta (VPH de bajo y alto riesgo oncogénico 6 y/u 11 y 16) y 36,36% no se logró tipificar por la metodología empleada.

Del grupo de pacientes que no presentó lesiones sugestivas de infección por VPH al examen clínico la prevalencia general de infección por este virus en ambos tipos de muestras fue del 33,3%, lo cual resalta la utilidad de técnicas moleculares en la detección de infecciones subclínicas y la importancia de usar procedimientos que permitan la identificación directa del virus.

De este grupo, en aquellas muestras correspondientes a hisopados cervicales el 16,6% presentó VPH de bajo riesgo oncogénico, 11% de alto riesgo oncogénico y 5,5% no

se logró tipificar por la metodología utilizada. En las muestras de orina se encontró que el 5,6% presentó VPH de bajo riesgo oncogénico y 27,8% no se logró tipificar por la metodología empleada.

Con el estadístico Chi-cuadrado se obtuvo un grado de independencia bajo ($p=0,01$) correspondiente a un $p<0,05$, lo que permite establecer similitud entre ambos tipos de muestra y una concordancia Buena de los resultados ($k=0,609$), mediante la detección y tipificación viral a través de la técnica PCR convencional y múltiple.

De forma general los resultados observados son alentadores puesto que existe similitud entre los obtenidos con cada tipo de muestra, apuntando así a la posibilidad de usar muestras de orina como método de apoyo o alternativo para la detección de la infección viral en mujeres con deficiente atención ginecológica o con limitaciones culturales y religiosas, así como en regiones geográficas de difícil acceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aedo S, Melo A, García P, Guzmán P, Capurro I, Roa J. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Revista Médica Chile*. 2007; 135(2):167-173.
2. Alameda F, Bellosillo B, Fusté P, Musset M, Mariñoso M, Mancebo G, Lopez M, Carreras R. Human papillomavirus detection in urine samples: an alternative screening method. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2007; 11(1):5-7.
3. Alameda F, Bellosillo B, Fusté P, Musset M, Mariñoso ML, Mancebo G, et al. Detection of human papilloma virus in urine samples: an alternative method of screening. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2008; (11):5-7.
4. Almonte M, Alberoc G, Molano M, Carcamo C, García P, Pérez G. Risk factors for Human Papillomavirus Exposure and Co-factors for Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean, London School of Hygiene and Tropical Medicine. 2008; 16-36.
5. Álvarez L, y López E. Regulación genética de los Papilomavirus humanos genitales. *Salud Publica de México*. 1995; 37: 240-247.
6. American Cancer Society. Atlanta. 2013, 30: 102-303. Disponible en: <http://www.cancer.org>.
7. Arenas R, Henríquez D, González M. Cáncer de cuello uterino en mujeres menores de 35 años y mayores de 60 años. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 2011; 71 (4):2552-264.
8. Berek J, Hillard P, Adashi E. *Ginecología de Novak*. 12ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana. 1996; 1057-1110.
9. Bosch F, de Sanjose S. Chapter 1. Human papillomavirus and cervical cancer- Burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2003; 31:3-13.

10. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research*. 2002; 89: 249-261.
11. Canche J, Canul J, Suárez R, De Anda R, González M. Infección por el Virus del Papiloma Humano en mujeres recluidas en Centros de Readaptación Social en el sureste de México. *Salud Pública*. Yucatán, México. 2011; 3: 13; 575-620.
12. Cañadas M, Lloveras B, Lorincz A, Ejarque M, Font R, Bosch X, De Sanjosé S. Evaluación de las técnicas de detección de VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud pública de México*. 2006; 5: 48.
13. Carrillo A, Mohar A, Meneses A. Usefulness of combining universal oligonucleotides in detecting human papillomavirus in cervical cancer and premalignant lesions. *Salud pública*. México. 2004; 46: 7-11.
14. Castellsagué X, Muñoz N. Cofactors in human Papillomavirus carcinogenesis. Role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. Instituto Catalá de Oncología, Servicio de Epidemiología en Registro del cáncer, Hospital de Llobregat, Barcelona, España. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2003; 31:20-28.
15. Castillo J, Stalin E. Detección del virus del papiloma humano (VPH) por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Medigraphic*. México. 2004; 29, 1:106.
16. Correnti M, Cavazza M, Lozada C, Alfonso B. La infección por el VPH: Un Problema de Salud Pública en Venezuela. *VITAE*. 2002; 13: 1-10. En: <http://caibco.ucv.ve/Vitae/VitaeTrece/Portada/homevitae>.
17. Cortés E, Leal C. Papilomavirus Humano. *Biología Molecular y Patogénesis*. Revista. *Salud Pública y Nutrición*. 2001; 2:10-15.
18. D'Hauwers K, Depuydt C, Bogers J, Stalpaert M, Vereecken A, Wyndaele J, et al. Urine sample with swab in the detection of human papilloma virus: study in both sexes. *Asian Journal of Andrology*. 2007; 9 (5): 705-710.
19. Dawar M, Deeks S, Dobson S. Human papillomavirus vaccines launch a new era in cervical cancer prevention. *Canadian Medical Association Journal*. 2007; 177:456-460.

20. De Guglielmo Z, Rodríguez A, Ávila M, Veitía D, Fernandes A, Correnti de Plata M. Virus de Papiloma Humano y Factores de Riesgo en el Desarrollo de Cáncer Cérvico Uterino. *Revista Venezolana de Oncología*. 2010; 22(1):32-38.
21. De la Fuente Villarreal D. Epidemiología de la Infección y Detección de Tipos Oncogénicos del VPH por Tecnología de Captura de Híbridos en Mujeres sin Aparentes Factores de Riesgo. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Madrid. 2011.
22. De Oliveira D. ADN de virus en el cáncer humano: Una visión general integral de los mecanismos fundamentales de la oncogénesis viral. *Cartas de cáncer*. 2007; 247: 182-196.
23. De Palo G, Dexeus S, Chanen W. Patología y tratamiento del tracto genital inferior. 2ª edición. Barcelona: Masson. 2007; 1: 101-157.
24. Delgado R. Cofactores Oncogénicos, Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia, XXI Congreso Nacional Cádiz. 2009. Disponible en: http://www.aepcc.org/download/congresos/xxi/ponencias/comino_delgado.html.
25. DiPaolo J, Woodworth C, Coutlee F, Zimonin D, Bryant J, Kessous A. Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 Bg/II N sub-fragment Xho2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. *Institute Journal Cancer*, 1998; 76:865-71.
26. DiPaolo J. The role of Herpes Simplex 2 in the development of HPV-positive cervical carcinoma. *Papillomavirus*. 1999; 10: 1-7.
27. Doorbar J. The life cycle of papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 32S: S7-S15.
28. Dzul-Rosado K, Puerto M, González M. Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. Yucatán, México, *Revista Biomédica*. 2004; 15:233-241.
29. Espín J, Mérida J, Sánchez-Montesinos I. *Lecciones de Anatomía Humana*. Librería Fleming, Granada, 2003.
30. Feller L, Wood N, Khammissa R, y Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head & Face Medicina*. 2010; 6:14.

31. Fenton R, Longo D. Cancer cell biology and angiogenesis. In *Harrisons principles of internal medicine*. 16th edition. Edited by Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Lango D, Jameson J. New York: Graw-Hill. 2005; 453-464.
32. Fernández P, Díaz P. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de la Coruña (España)*. 2003; 10: 120-124.
33. Franco E, Franco ED, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canadian Medical Association Journal* 2001; 7: 164.
34. Ghaffari S, Sabokbar T, Mollahajian H, Dastan J, Ramezanzadeh F, Ensani F, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women with normal and abnormal cervical cytology in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2006; 7(4):529-532.
35. Gillison M. Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24: 5623-5625.
36. Globocan (IARC) Section of Cancer Information. Most common cancers: women. Quick Stats. (2008). Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
37. Hara Y, Kimoto T, Okuno Y, Minekawa Y. Effect of herpes simplex virus on the DNA of human papillomavirus 18. *Journal Medical Virology*, 1997; 53:4-12.
38. Hildesheim A, Herrero R, Castle P, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *British Journal of Cancer*. 2001; 84(9): 1219–1226.
39. Instituto Catalán de Oncología. El ICO se convierte en un referente mundial de la OMS en VPH y cáncer de cuello de útero. Cataluña; 2007. En:http://www.iconcologia.net/castella/noticies/2007/desembre/071204_np_vphoms_cast.pdf.
40. International Agency for Research on Cancer. 2010. Disponible en: <http://www.iarc.fr>.

41. Janicek M, Averette H. Cervical cancer: Prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer Journal of Clinical*. 2001; 51:92-114.
42. Jastreboff A, Cymet T. Role of human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Medical Journal*. 2002; 78:225-228.
43. Jenkins D. Diagnosing human papilloma viruses: recent advances. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2001; 14: 53-62.
44. Johnson D, Calderaro A, Roberts K. Variation in nuclear DNA concentrations during urination. *Journal Forensic Sciens*. 2007; 52 (1): 110-3.
45. Jones C. Cervical cancer: is herpes simplex virus type II a cofactor? *Clinique Microbiology*. 1995; 8:549-56.
46. Karin M, LiuZg, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997; 9(2): 240-6.
47. Kumar M, Path V, Abbas A, Fausto N, y Jon Aster. Cervix: premalignant and malignant neoplasms. Saunders (Elsevier) (ed.). *Cotran & Robbins Pathologic Basis of Disease*. 2009; 11: 315–319.
48. Latarjet M, Ruíz Liard A. *Anatomía Humana*. Editorial Médica Panamericana, Barcelona. 1998.
49. Lizano M, Carrillo A, Contreras A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. UNAM. 2009; 205-216.
50. Longworth M, Lamiris L. Pathogenesis of human papilloma virus in epithelial differentiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004; 68: 362-372.
51. Manos M, Wright DK, Lewis A, Broker T, Wolinsky S. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papilloma viruses. *Cancer Cells*. 1989; 7: 209-14.
52. Mateu-Aragón J. Epidemiología del cáncer cervical. En: *Cáncer del cuello uterino*. Barcelona: Editorial Jims. 1982; 51-74.
53. Medina F, Sánchez J, Calderaro F, Borges A, Rennola A, Bermúdez C, et al. Cáncer de Cuello Uterino. Consenso Nacional para el Diagnóstico y Tratamiento 2010. Sociedad Venezolana de Oncología, Ministerio del Poder Popular para la Salud, *Revista de Oncología Venezolana*. 2011; 23(2):102-129.

54. Méndez S. y Pérez E. La PCR múltiple en microbiología clínica. 2004; 22(3): 183-9.
55. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de Mortalidad 2009. Caracas-Venezuela, 2011. Gaceta Oficial N° 39.434 y N° 39.442.
56. Molinero L. Medidas de concordancia para variables cualitativas. Asociación de la sociedad española de hipertensión, Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial, 2001. En: bioestadística@alceingenieria.net. Actualizado Diciembre 2001.
57. Moore K. Anatomía Humana con Orientación Clínica. Editorial Médica Panamericana, Barcelona, 1999.
58. Moreno V, Bosch F, Muñoz N, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. 2002; 359(9312): 1085-1092.
59. Morin P, Trent J, Collins F, Vogelstein B. Cancer genetics. In Harrison's principles of internal medicine 16th edition, México D.F.: McGraw Hill. 2006: 501-507.
60. Morin P. Claudin Proteins in Human Cancer: Promising New Targets for Diagnosis and Therapy. 2005; 65: 9603-9606.
61. Mork J, Lie A, Glatte E, Hallmans G, Jellum K, Moller B, et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous-cell carcinoma of the head and neck. The New England Journal of Medicine. 2001; 334: 1125-1131.
62. Morris M, Bodurka D. Cáncer cervical. En: Copeland, editor. Ginecología. 2ª edición. Argentina: Médica Panamericana. 2002; 1359-1386.
63. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez A, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006; 24S3: S1-10.
64. Muñoz M, Mendoza JA, Téllez L, Noguera M, Moret O, López M, et al. Detección de VPH-16 y 18 en muestras de cerviz de mujeres que acuden a centros de la ciudad de Mérida- Venezuela. Revista Biomédica. 2003; 14(2):61-68.
65. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. 2002; 359: 1093-1101.
66. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. Journal Clinical Virology. 2000; 19: 1-5.

67. Organización Mundial de la Salud. «El impacto del cáncer ». 2005; 2008. Disponible en: http://screening.iarc.fr/doc/pact1006_sp.pdf.
68. Organización Panamericana de la Salud. Vacunas contra el virus del papiloma humano: Una nueva herramienta para la prevención de cáncer cervicouterino. Washington. 2005. En: <http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/IM/HPV-FactSheet1.pdf>.
69. Paludan S, Malmgaard L, Ellermann-Eriksen S, Boosca L, Mogensen S. Interferon (IFN)-gamma and Herpes simplex virus/tumor necrosis factor-alpha synergistically induce nitric oxide synthase 2 in macrophages through cooperative action of nuclear factor-kappa B and IFN regulatory factor-1. *Europe Cytokine Network*. 2001; 12:297-308.
70. Parkin D, Almonte M, Bruni L, Clifford G, Curado MP, Piñeros M. Burden and Trends of Type-Specific Human Papillomavirus Infections and Related Diseases in the Latin America and Caribbean Region. *Vaccine*. 2008; 26(11): L1–15.
71. Parkin M, Bray M, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2005; 55: 74-108.
72. Richart R. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1967; 10: 748-784.
73. Richart R. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical Obstetrics Gynecology*. 1990; 75: 131-133.
74. Ross M, Kaye G, Pawlina W. *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*. (4ª Ed.). Panamericana, México. 2005.
75. Rouvière H, Delmas A. *Anatomía Humana. Descriptiva, Topográfica y Funcional*. (10ª Ed.). Masson S.A., Barcelona. 1999.
76. Salazar E. Detección del virus de papiloma humano en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino. *Revista de Obstetricia y Ginecología Venezolana*. 2007; 67(1):47-54.
77. Schiffman M, Kjaer S. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *Journal National Cancer Institute Monographic*. 2003; (31): 14-9.

78. Schiffman M, Castle P, Jeronimo J, Rodríguez A, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370: 890-907.
79. Scucces M, Paneccasio A. Lesión intraepitelial cervical asociada a virus papiloma humano. *Revista de Obstetricia y Ginecología Venezolana*. 2001; 61(2):101-107.
80. Sellors J, Lorincz A, Mahony J, Mielzynska I, Lytwyn A, Roth P, Howard M, Chong S, Daya D, Chapman W, Chernesky M Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions. *Canadian Medical Association Journal*. 2000; 163(5): 513-518
81. Shields T, Brinton L, Burk R, Wang S, Weinstein S, Ziegler R. A case- control study of risk factors for invasive cervical cancer among US women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Biomarkers*. 2004; 13: 1574-1582.
82. Smith J, Green J, Berrington A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: A systematic review. *Lancet*. 2003; 361: 1159-1167.
83. Smith J, Herrero R, Bosetti C, et al. "Herpes simplex virus-2 as a cofactor of HPV in the etiology of invasive cervical cancer". *Journal of the National Cancer Institute*. 2002; 94(21): 1604-1613.
84. Snell R. *Anatomía Clínica para Estudiantes de Medicina*. 6ª Edición. McGraw-Hill, México, 2000.
85. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and Typing of Human Papillomavirus by Nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(7): 3176-3184.
86. Stalin E, y Castillo J. Detección del virus del papiloma humano (VPH) por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 2004; 29(75): 1.
87. Stanczuk G. Detection of human papillomavirus in urine and cervical swabs from patients with invasive cervical cancer. *Journal Medical Virology*. 2003; 71: 110-114. Consultar la siguiente referencia web: www.paho.org/Spanish/DD/PUB/v14n5p357.pdf.
88. Stanley M. The immunology of genital human papillomavirus infection. *European Journal of Dermatology*. 1998; 8: 8- 12.

89. Steben M, Duarte E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Journal of Gynecologic Oncology*. 2007; 107: S2-S5.
90. Stephen R. Subcategorization of Pap smears diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance. 2001; 116:631-634.
91. Syrjnen S. Human papillomavirus infections and oral tumours. *Medical Microbiology and Immunology*. 2003; 192: 123-128.
92. Tanzi E, Bianchi S, Fasolo M, Frati E, Mazza F, Martinelli M, Colzani D, Beretta R, Zappa A, Orlando G. High Performance of a New PCR-Based Urine Assay for HPV-DNA Detection and Genotyping. *Journal of Medical Virology*. 2013; 85: 91-98.
93. Urbano L, Alvarez R, Acosta C. Virus de Papiloma Humano: Infección y Enfermedad. 2007; 13: 1-10.
94. Ville L. Epidemiología y evolución de los papilomas virus humanos. *Acta Cancerológica*. 1993; 33: 33-48.
95. Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European Journal of Cancer*. 2002, 38: 2229-2242.
96. Vonka V, Kanka J, Roth Z. Herpes simplex type 2 virus and cervical neoplasia. *Advances in Cancer Research*. 1987; 48: 149-91.
97. Vorsters A, Micalessi I, Bilcke J, Ieven M, Bogers J, Van Damme P. Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. *Euro Journal Clinical Microbiology Infection Disease*. 2012; 31:627–640.
98. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*. 1999; 189(1): 12-19.
99. Watson M, Saraiya M, Benard V, Coughlin S, Flowers L, Cokkinides V, Schwenn M, Huang Y, Giuliano A. Burden of cervical cancer in the United States, 1998-2003. *Cancer*. 2008; 113; S2855-S2864.
100. Wieland U, Pfister H. Papillomavirus in human pathology: Epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. In: Gross G, Barrasso R. *Human Papilloma Virus Infection*. Editorial: Ullstein Mosby, Alemania, 1997; 1-16.

- 101.**Williams P. Anatomía de Gray. (40ª Ed.). Harcourt Brace de España S.A., Madrid, 2002.
- 102.**Williamson A, Passmore J, Rybicki E. Strategies for the prevention of cervical cancer by human papillomavirus vaccination. Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, South Africa. 2005; 19(4): 531-544.
- 103.**Yerena C, Miñón A, Ortiz R, Ramírez J. Detección del Virus del Papiloma Humano por PCR anidada con MY09/11 y GP5+/6+, en muestras endocervicales de pacientes con papanicolaou normal, de la ciudad de Xalapa, Veracruz, México. 2009; 34: 65-66.
- 104.**York I, Roop C, Andrews D, Riddell S, Graham F, Johnson D. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. Cell. 1994; 77:525-35
- 105.**Young B, Heath W. Wheater's. Histología Funcional, Texto y Atlas en Color. Elsevier 4ª Ed. Harcourt, Madrid, 2000.

ANEXOS

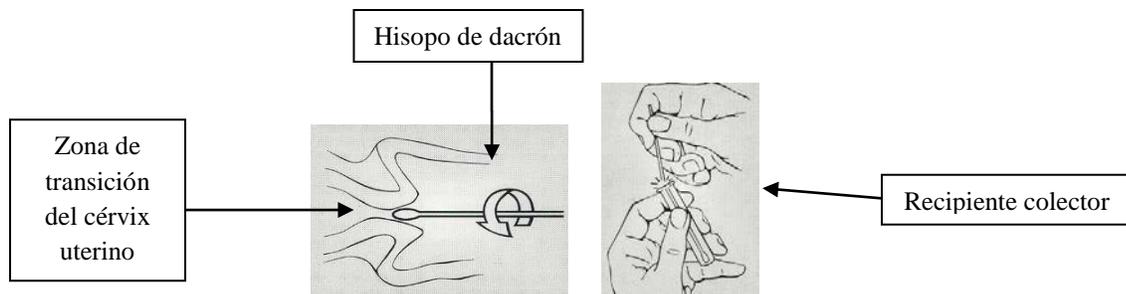
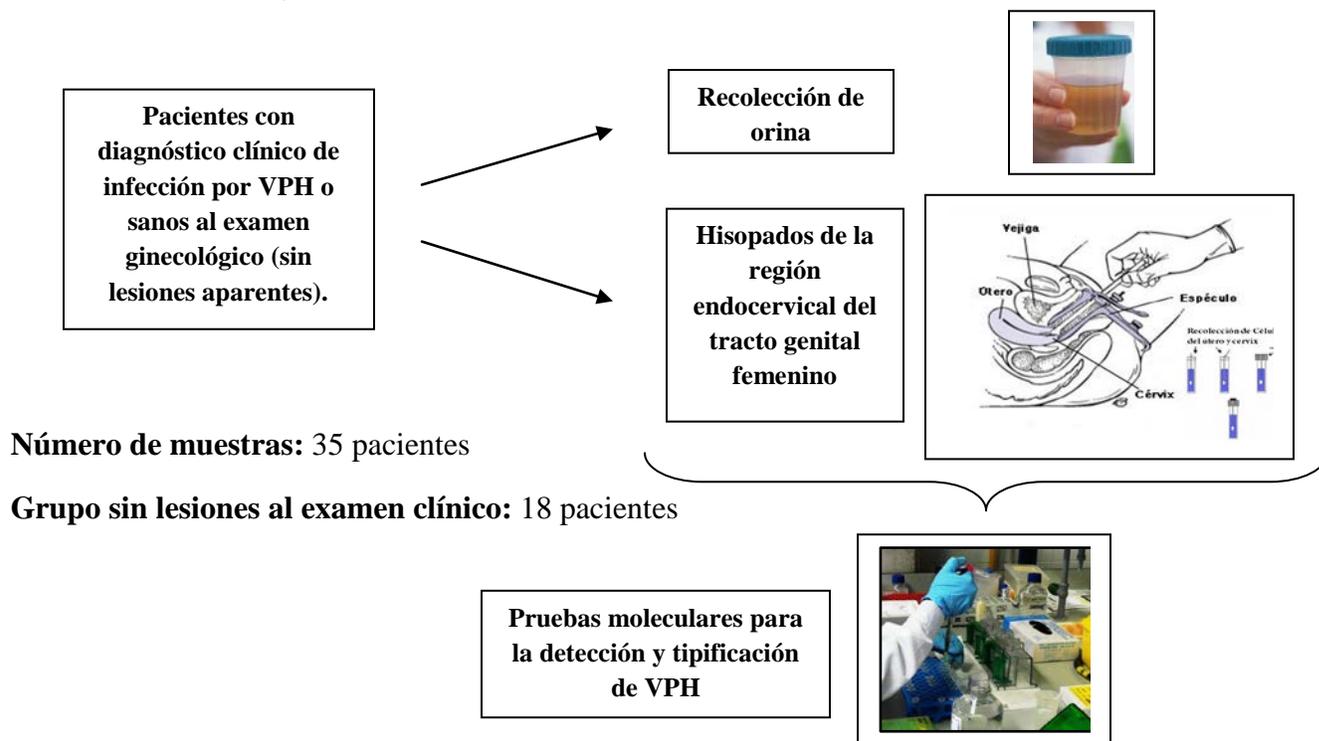


Figura 8. Esquema de toma de muestra con hisopo de dacrón.

Plan de recolección y evaluación de muestras



Número de muestras: 35 pacientes

Grupo sin lesiones al examen clínico: 18 pacientes

Figura 9. Plan de recolección y evaluación de muestras

CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN HISOPADOS Y MUESTRAS DE ORINA EN MUJERES DE LA CONSULTA DE DERMATOLOGIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS (HUC)

Primera Parte: De la descripción de la propuesta de investigación.

1.- El Virus de Papiloma Humano (VPH) representa hoy en día la primera causa de infección por transmisión sexual de origen viral en nuestra población. Se ha estudiado la infección por este virus en mujeres, dado su papel etiológico en el cáncer cervical. El siguiente protocolo de investigación tiene como objetivo fundamental Identificar, mediante PCR, el genoma de VPH en muestras de orina de mujeres y hombres con lesiones sugestivas de infección por VPH. Se evaluarán 30 pacientes que acudan de manera espontánea e independiente a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas y de 15 controles que corresponden a pacientes sanos. Los resultados generados, serán manejados con hermética confidencialidad y en el caso de algún tipo de infección los médicos que participen en el estudio, realizarán una junta médica para sugerir el tratamiento médico, farmacológico pertinente a los fines de brindar un beneficio directo al paciente afectado.

Objetivos específicos de la investigación

- Detección de VPH mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional en muestras citológicas y de orina en pacientes masculinos y femeninos que asisten al servicio de dermatología-HUC, con primers MY09 y MY11.
- Tipificación de las muestras positivas en la detección viral mediante PCR múltiple.
- Comparar los resultados obtenidos en la detección viral respecto a ambos tipos de muestra y a los procedimientos de detección usados, evaluando eficiencia en cada caso.

2.- A continuación, se presenta la descripción detallada del procedimiento de investigación, especialmente los aspectos significativos que pudiesen afectar su disposición a participar, tales como riesgos físicos, incomodidad o experiencias desagradables.

Historia Clínica

Se realizará una encuesta médica con formato de historia clínica para recolectar datos personales, familiares, epidemiológicos y clínicos. La información contenida en esta historia clínica es absolutamente confidencial y el grupo de médicos y de investigadores asume el total compromiso de confidencialidad y secreto médico.

Toma de Muestra

Las muestras de cuello uterino serán tomadas con aplicadores de dacrón por el médico tratante en el momento de evaluación del paciente, los procedimientos de toma de muestras uterinas no implican riesgo alguno, se trata de una simple muestra citológica para el estudio sobre infecciones.

Se les solicitará también muestras de orina, las cuales serán colectadas por el propio paciente antes de la toma de muestras citológicas, de igual manera no implican riesgo alguno.

3.- Plan de Trabajo

Fase 1: Recopilación de los datos clínicos y recolección de las primeras citologías y muestras de orina. Procesamiento de las mismas en cuanto a análisis de detección y tipificación viral.

En resumen, todo paciente que, como usted, consienta su participación en este estudio será evaluado desde el punto de vista molecular, a los fines de llevar un control estricto de la detección de la infección por VPH en muestras citológicas y de orina.

4.- Por toda incomodidad que resulte en la aplicación de la historia clínica y/o la toma de la muestra, el paciente tendrá absoluto derecho a reclamarla y exigir los correctivos a que haya lugar. Podrá presentar su queja ante los responsables del proyecto de investigación, **Lic. Dayahindara Veitía y Dra. María Correnti (Lab. de genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología-MPPS. Tlf: 0212-6050647) y Dra. Mary Carmen Ferreiro (Servicio de Dermatología ITS-HUC).**

5.- Este estudio no comprende pruebas con fármacos ni procedimientos quirúrgicos que no sean requeridos por el personal médico responsable para tratamiento de la enfermedad.

- 6.-** Su participación es voluntaria y puede, con todo su derecho, tomar la decisión de retirarse en cualquier momento de la investigación sin que ello conlleve represalias o pérdida de algún beneficio.
- 7.-** Los beneficios esperados como resultado de la investigación consiste en el diagnóstico oportuno y veraz de VPH en muestras citológicas de cuello uterino así como la implementación del uso de muestras de orina para tal fin. En caso de requerir tratamientos adicionales será debidamente informado por la Dra. Mary Carmen Ferreiro ante los médicos tratantes.
- 8.-** Todos los datos, especialmente los publicados al término de la investigación, mantendrán el compromiso de confidencialidad y sin causar identificación o daño personal.
- 9.-** El proceso de información será continuo, de acuerdo con las características de la investigación, a fin de que el participante pueda evaluar los hechos de la investigación.
- 10.-** El participante estará amparado por: La constitución de la República Bolivariana de Venezuela, la ley del código civil, ley de ejercicio de la medicina y en caso de ser menor de edad por la ley orgánica para la protección de niños, niñas y adolescentes.
- 11.-** El artículo 50 de la Lopna sobre salud sexual y reproductiva indica que los y las adolescentes mayores de catorce (14) años de edad tienen derecho a solicitar por si mismo y recibir estos servicios.
- 12.-** Los resultados serán guardados con estricta confidencialidad y serán suministrados al paciente. En calidad de paciente voluntario, se podrá retirar del estudio en el momento que lo crea conveniente sin ninguna consecuencia.
- 13.-** El protocolo de investigación se realizará en un número total de 45 pacientes y tendrá una duración de dos (2) años.
- 14.-** Auditores y algunas autoridades debidamente identificadas tendrán acceso a su historia clínica para la verificación de procedimientos y/o datos, sin violar su confidencialidad.

Segunda Parte: De la comprensión del proyecto de investigación por parte del participante.

Declaro haber comprendido el propósito y los términos de mi participación en el proyecto de investigación “**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN HISOPADOS Y MUESTRAS DE ORINA EN MUJERES DE LA CONSULTA DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS (HUC)**”. Enmarcado en el proyecto Misión Ciencias LPL-20070001088, el cual consiste en estudios clínicos que servirán para establecer la relación entre ciertos agentes infecciosos y el desarrollo de Cáncer de cuello uterino mediante métodos moleculares.

Declaro entender también que mi participación es voluntaria y que en cualquier momento de la investigación, puedo retirarme de la misma si así lo deseo, sin que mi decisión conlleve a represalias o a la pérdida de cualquier beneficio como producto de la investigación.

Así lo declaro y firmo a los ____ días del mes de _____ del año 20____.

Nombre y Apellido

Firma de la paciente

Huella Digital si no sabe escribir ó tiene algún

Cédula de Identidad

Impedimento para firmar



Se hacen dos copias del mismo documento.

Tercera Parte: del consentimiento definitivo para formar parte del proyecto de investigación por parte del participante.

Este **CONSENTIMIENTO** establece un común acuerdo con la persona participante (paciente), con el tiempo previo que sea necesario para que esta última pueda ampliar su consulta y comprenderla, de manera que pueda tomar conscientemente la decisión de participar en la investigación.

CONSENTIMIENTO acordado a los ____ días del mes de _____ del año 20__.

Lic. Dayahindara Veitía, Dra. María Correnti o
Dra. Mary Carmen Ferreiro

Firma del Participante

Firma Testigo 1

Firma Testigo 2

Cédula de Identidad

Cédula de Identidad



**HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS
CATEDRA Y SERVICIO DE DERMATOLOGIA**



Caracas, 23 de Septiembre de 2013.

Por medio de la presente me dirijo a usted en la oportunidad de hacer de su conocimiento la aprobación del proyecto de tesis titulado **“DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN HISOPADOS Y MUESTRAS DE ORINA DE MUJERES DE LA CONSULTA DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS”**, (HUC), el cual será realizado por la bachiller Yrneh Prado titular de la C.I: 18.937.534, estudiante de Biología de la Universidad Central de Venezuela, tomando la decisión de **APROBARLO**.



Dra. Mary Carmen Ferreiro
Coordinadora de I.T.S.
Servicio de Dermatología
Hospital Universitario de Caracas



INSTITUTO AUTÓNOMO
HOSPITAL UNIVERSITARIO
DE CARACAS

COMITÉ DE BIOÉTICA

INTEGRANTES:

DR. CLAUDIO UROSA- COORDINADOR
DR. OSCAR IVÁN SILVA. - SECRETARIO
DR. JOSÉ M. GUEVARA IRIBARREN
DR. JULIO BORGES ITURRIZA
DR. FRANK PÉREZ ACUÑA
DRA. MARGARITA SALAZAR
DR. Pbro. ALFREDO RINCÓN M.
DRA. OMAIRA VERA R.
DR. JOSÉ JOAQUÍN FIGUEROA
DR. GARCÍA FLORES FREDDY MANUEL
DR. ANGEL MILLAN CUETO
Dr. AMANDO MARTIN
DR. EZEQUIEL MUÑOZ OBANDO
LIC. BERTHA Y. ÁLVAREZ
DRA. CLARA PACHECO

CBE N°38/2013

Caracas, 06 de junio de 2013

Ciudadana:

Dra. María Correnti

Jefa del Laboratorio de Genética Molecular

Instituto de Oncología y Hematología

Presente.

En nombre del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas, me dirijo a usted, en la ocasión de informarle que en Reunión Ordinaria N° 10 de fecha 06-06-2013, hemos considerado y evaluado el Proyecto de tesis de Pre-grado Titulado **“DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN HISOPADOS Y MUESTRAS DE ORINA DE MUJERES DE LA CONSULTA DE DERMATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS (HUC)”**, que será realizado por la bachiller **Yrneh Prado**, estudiante de Biología de la Universidad Central de Venezuela, tomando la decisión de **APROBARLO**.

Sin otro particular a que hacer referencia, me suscribo de usted.

Atentamente,



DR. CLAUDIO L. UROSA P.
Coordinador