



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**Estudio comparativo entre dos técnicas (Captura de Híbridos y RCP) para la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH) en áreas genitales de jóvenes con diagnóstico clínico sugestivo de infección viral.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO  
Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Dileytic Giambalvo Gómez como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología

Tutoras: Dra. María Correnti  
Prof. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela  
Febrero- 2011

## **RESUMEN**

El Virus de Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*. El genoma viral está compuesto por una molécula circular de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, que contiene aproximadamente 7.900 pb. Hasta el momento se han logrado identificar más de doscientos tipos virales, clasificados de la siguiente forma: bajo riesgo oncogénico, como los tipos 6, 11, 32, 42 y 43 y alto riesgo oncogénico, que incluye los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 56, 59, 66, 68 y 70. Los productos proteicos de los genes E6 y E7 de los tipos de VPH de alto riesgo, son capaces de inactivar las proteínas p53 y pRb, desencadenando un proceso que conlleva a la progresión de las lesiones a cáncer cérvicouterino. La infección por VPH es considerada actualmente como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo y como el principal factor etiológico de lesiones intraepiteliales y de cáncer cervicouterino. En Venezuela, cada año 4.116 mujeres son diagnosticadas con cáncer cervical y 1853 mueren a causa del cáncer cérvicouterino, según la Organización Mundial para la Salud. Por este motivo y debido al reciente desarrollo de las vacunas preventivas contra el VPH es de gran importancia el estudio y la comparación de técnicas de biología molecular que permitan el diagnóstico y tipificación de los diferentes tipos virales en la población. En tal sentido, en el presente trabajo se evaluaron muestras citológicas, tomadas en el área genital, de 80 mujeres jóvenes con diagnóstico clínico sugestivo de infección por VPH y 20 con diagnóstico clínico normal, como pacientes control; con edades promedio de  $24,78 \pm 5,27$  y  $21,30 \pm 3,96$ , respectivamente, que acudieron a la consulta de ginecología de la Organización de Bienestar Estudiantil de la Universidad Central de Venezuela (OBE-UCV). La detección y tipificación del VPH se llevó a cabo mediante RCP múltiple con el estuche comercial Seeplex® HPV4A ACE Screening de Seegene Inc., y el método de Captura de Híbridos 2 (Digene). Las muestras positivas para VPH fueron: 52,5% con la RCP Seeplex® y 58,75% con la CH2. Los controles positivos para VPH correspondieron a: un 55% con RCP Seeplex® y 60% con CH2. El tipo de VPH, más común, encontrado en las muestras y controles fue el de alto riesgo oncogénico. Se encontró un 68,75% de correlación entre los resultados positivos y negativos de RCP Seeplex® y CH2 en las muestras y un 75% en los controles, con asociación entre estos resultados ( $p < 0,05$ ) y grado de acuerdo moderado k. En cuanto a la tipificación, se obtuvo un 51,25% de coincidencia en las muestras y un 70% en los controles, con asociación entre los resultados ( $p < 0,05$ ) y grado de acuerdo moderado k. El método CH2 presentó mayor sensibilidad que la RCP Seeplex® (80% y 79,2%, respectivamente) y la especificidad de la RCP Seeplex® fue menor que la de CH2 (19,2% y 20% respectivamente). No se encontró asociación entre las variables: RCP/DC, CH2/DC, Factores de riesgo/VPH+ y Carga viral/DC. En conclusión, se encontró relación entre los métodos estudiados y las pacientes presentaron un alto porcentaje de infección por VPH de alto riesgo, diferente a los tipos más comunes (16 y 18) incluidos en las vacunas. Se sugiere que las pacientes control positivas, se encuentran en una fase latente de la infección viral, por presentar diagnóstico clínico normal y estar infectadas (en su mayoría), por VPH de alto riesgo oncogénico.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo especial de grado, fue financiado de manera general por el proyecto Misión Ciencia LPL-2007001088 y de manera parcial por Seegene, Inc. (Korea) y Laboratorios Géminis C.A (Venezuela).

## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas que me ayudaron a cumplir esta gran meta. En primer lugar, agradezco Dios por permitirme alcanzar este triunfo profesional y por poner en mi camino personas que me ayudaron a lograrlo. Gracias Dios por colocar en mi vida las situaciones, en el momento justo e indicado. A mi madre por el apoyo incondicional que me ha brindado durante toda la vida y a lo largo de la carrera.

A mi padre y a mis hermanos, por formar parte de las personas que me inspiran día a día a cumplir mis sueños.

A mi amor y a su familia por estar allí, siempre a mi lado, dándome fuerzas e inspiración. Gracias Fabio.

A todo el equipo del laboratorio de Genética molecular del Instituto de Oncología y Hematología, por hacer posible este Trabajo Especial de Grado. A mi tutora y jefa del laboratorio, Dra. María Correnti, muchas gracias por permitirme formar parte del laboratorio, desarrollar allí mi Trabajo Especial de Grado, por su guía, su aporte intelectual y profesional y el gran apoyo que me prestó. Andreina Fernandes, Dayahindara Veitía, Maira Ávila y Zoraya De Guglielmo muchas gracias por su apoyo y dedicación, son excelentes profesionales, un gran equipo de trabajo y de ustedes me llevo muchos aprendizajes y bellas experiencias.

A todo el personal de OBE-UCV, a la Dra. Martha Romero y en especial a la Dra. Cecilia Lozada por recibirme día a día de manera muy cordial y por apoyarme y ayudarme en la recolección de las muestras. Muchas gracias por su colaboración y dedicación.

A mi cotutora, Prof. Guillermina Alonso gracias por guiarme y apoyarme.

Le agradezco la colaboración de Armando Rodríguez y Gysell Plata con las pruebas estadísticas.

A Laboratorios Geminis C.A y a Seegene, Inc., por la dotación de los estuches comerciales de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening, en especial a la Lic. Carmen Delia Del Castillo por toda la colaboración y su aporte prestado a este estudio.

Por último, y no por eso son menos importantes, quiero agradecer el apoyo incondicional de mis amigas, compañeras y familiares: Leticia Espina, Jhohanna Borja, María Montilla, Elizabeth Cudemos, Yuliana Guevara, y Laynet Puentes.

## **DEDICATORIA**

Mi Trabajo Especial de Grado va dedicado, especialmente, a tres personas muy importantes en mi vida.

A ti madre, te dedico cada segundo de estudio, esfuerzo y dedicación que tuve a lo largo de mi carrera, por que fuiste tú la que me dio fuerzas y ánimo para concluirla exitosamente. Sólo tu mami, fuiste quien supo darme los mejores consejos y el apoyo que necesitaba en los momentos más difíciles que se me presentaron. Por eso y por muchas cosas más este trabajo es para ti, Te amo.

A ti abuela por darme tantas bendiciones y amor, por hacerme sentir la nieta más privilegiada del mundo por tener a una abuela tan hermosa como tú. Gracias por inspirarme y por todo tu cariño. Te amo.

A ti papá porque has sido, eres y serás muy especial en mi vida. Gracias por compartir conmigo momentos importantes y por ser más que mi padre mi amigo. Te amo.

## **ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.

**ARN:** Ácido Ribonucleico.

**ASC:** Atypical Squamous Cells, Células escamosas atípicas.

**ASC-H:** Atypical Squamous Cells, Células escamosas atípicas que no excluyen LIEAg.

**ASC-US:** Atypical Squamous Cells, Células escamosas atípicas de significado incierto.

**CH:** Captura de Híbridos de primera generación.

**CH2:** Captura de Híbridos de segunda generación.

**CO:** Cut off de CH2.

**DC:** Diagnóstico clínico.

**FA:** Fosfatasa Alcalina.

**FDA:** Food and Drugs Administration.

**FN:** Falsos negativos.

**FP:** Falsos positivos.

**HLA:** Complejo mayor de histocompatibilidad.

**IM:** Infección Mixta.

**IOH-MPPS:** Instituto de Oncología y Hematología adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Salud.

**LCR:** Long Control Region, Región larga de control.

**LIEAg:** Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto grado.

**LIEBg:** Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo grado.

**NIC I-II y III:** Neoplasia Intraepitelial Cervical de grados I, II y III.

**NIV I-II y III:** Neoplasia Intraepitelial Vulvar de grados I, II y III.

**OBE-UCV:** Organización de Bienestar Estudiantil de la Universidad Central de Venezuela.

**ORFs:** Open Reading Frames, Marcos abiertos de lectura.

**Pap:** Papanicolaou.

**pRB:** Proteína del Retinoblastoma.

**RCP:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**RV+:** Razón de Verosimilitudes positiva.

**RV-:** Razón de Verosimilitudes negativa.

**URL:** Unidades Relativas de Luz.

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana.

**VPH:** Virus de Papiloma Humano.

**VPH-AR:** Virus de Papiloma Humano de alto riesgo detectados por RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening.

**VN:** Verdaderos Negativos.

**VP:** Verdaderos Positivos.

**VPN:** Valor Predictivo Negativo.

**VPP:** Valor Predictivo Positivo.



## ÍNDICE

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
1.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y SU ORGANIZACIÓN GENÉTICA	15
1.2.- CLASIFICACIÓN DEL VPH	17
1.3.- EPIDEMIOLOGÍA	18
1.4.- MECANISMO DE INFECCIÓN DEL VPH Y CARCINOGENESIS	21
1.4.1.- Unión y entrada del virus	21
1.4.2.- Degradación de la cápside viral y transporte de material genético al núcleo celular	24
1.4.3.- Replicación, ensamblaje y liberación de las partículas virales	24
1.4.4.- Integración del ADN viral y transformación oncogénica	26
1.5.- TRANSMISIÓN	33
1.6.- PREVENCIÓN	34
1.7.- FACTORES DETERMINANTES Y COFACTORES	35
1.7.1.- Factores dependientes del virus.	35
1.7.2.- Factores ambientales	35
1.8.- MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VPH	38
1.8.1.- Diagnóstico clínico	38
1.8.2.- Detección y tipificación de VPH por métodos moleculares	40
<b>II.- ANTECEDENTES</b>	<b>42</b>
<b>III.- JUSTIFICACIÓN</b>	<b>52</b>
<b>IV.- OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>V.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>56</b>
5.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	56
5.2.- MÉTODOS	56
5.2.1.- Extracción de ADN	57
5.2.2.- RCP con los iniciadores genéricos (MY09 y MY11) de VPH y los iniciadores PC04 y GH20 de la la $\beta$ -globina	58
5.2.3.- Detección y tipificación de VPH por RCP (Seeplex® HPV4A ACE Sreening) y Captura de híbridos 2 (HC2 HPV DNA test)	59

<b>5.2.3.1. - RCP (Seeplex HPV4A ACE Sreening)</b>	<b>59</b>
<b>5.2.3.2.- Captura de híbridos 2</b>	<b>61</b>
<b>5.2.4.- Análisis de resultados</b>	<b>67</b>
<b>VI.- RESULTADOS</b>	<b>70</b>
<b>6.1.- CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS MUESTRAS Y CONTROLES.</b>	<b>70</b>
<b>6.2.- COMPROBACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN.</b>	<b>71</b>
<b>6.3.- DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH POR RCP (SEEPLEX®HPV4A ACE SREENING).</b>	<b>72</b>
<b>6.4.- DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH POR CH2 (HC2 HPV DNA TEST).</b>	<b>76</b>
<b>6.5.- RESULTADOS COMPARATIVOS Y ESTADÍSTICOS ENTRE RCP SEEPLEX® HPV4A ACE SREENING Y CH2 (HC2 HPV DNA TEST).</b>	<b>78</b>
<b>6.6.- FACTORES DE RIESGO PARA LA ADQUISICIÓN DE VPH Y PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER CÉRVICOUTERINO EN LAS PACIENTES ESTUDIADAS.</b>	<b>88</b>
<b>VII.- DISCUSIÓN</b>	<b>92</b>
<b>VIII.- CONCLUSIONES</b>	<b>107</b>
<b>IX.- RECOMENDACIONES</b>	<b>109</b>
<b>X.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>110</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>120</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representación esquemática del genoma de VPH.	<b>16</b>
<b>Figura 2:</b> Porcentaje estimado de incidencia del cáncer de cuello uterino comparado con otros tipos de cáncer en el mundo.	<b>19</b>
<b>Figura 3:</b> Vías de entrada del VPH por endocitosis.	<b>23</b>
<b>Figura 4:</b> Representación gráfica y esquemática de un epitelio infectado por VPH mostrando varias capas diferenciadas.	<b>26</b>
<b>Figura 5:</b> Integración viral y progresión de displasias de cuello uterino.	<b>28</b>
<b>Figura 6:</b> Representación del ADN viral no integrado e integrado.	<b>30</b>
<b>Figura 7:</b> Carcinogénesis mediada por VPH.	<b>32</b>
<b>Figura 8:</b> Proceso de detección de VPH mediante el uso de la prueba CH2.	<b>62</b>
<b>Figura 9:</b> Representación de la placa de CH2.	<b>64</b>
<b>Figura 10:</b> Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa para la detección y tipificación de VPH por medio de Seeplex® HPV4A ACE Sreening.	<b>73</b>
<b>Figura 11:</b> Distribución de la infección por VPH en las muestras y controles detectada por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening.	<b>74</b>
<b>Figura 12:</b> Tipificación de VPH en las muestras y controles positivos por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening.	<b>75</b>

**Figura 13:** Distribución de la infección por VPH en las muestras y controles detectada por medio de CH2 (HC2 HPV DNA test). **76**

**Figura 14:** Tipificación de VPH en las muestras y controles positivos por medio de CH2 (HC2 HPV DNA test). **77**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Datos epidemiológicos comparativos entre Venezuela, América del sur y el mundo.	<b>20</b>
<b>Tabla 2:</b> Reactivos y cantidades utilizadas en la RCP con los iniciadores consenso MY09 y MY11.	<b>58</b>
<b>Tabla 3:</b> Reactivos que contiene el estuche comercial Seeplex® HPV4A ACE Sreening.	<b>60</b>
<b>Tabla 4:</b> Genotipos de VPH amplificados por Seeplex® HPV4A ACE Sreening y tamaño en pb.	<b>60</b>
<b>Tabla 5:</b> Cantidades de reactivo de desnaturalización agregadas a los calibradores, controles y muestras.	<b>63</b>
<b>Tabla 6:</b> Características principales de las muestras y controles.	<b>70</b>
<b>Tabla 7:</b> Diagnóstico clínico de muestras y controles.	<b>71</b>
<b>Tabla 8:</b> Tipos de VPH de bajo riesgo detectados por los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).	<b>78</b>
<b>Tabla 9:</b> Tipos de VPH de alto riesgo detectados por los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).	<b>78</b>
<b>Tabla 10:</b> Comparación entre los tipos de infección por VPH (infección mixta y alto y bajo riesgo), detectados por los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 en muestras y controles.	<b>79</b>
<b>Tabla 11:</b> Comparación entre las muestras y controles positivas para VPH, por medio de los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2, con el diagnóstico clínico.	<b>80</b>
<b>Tabla 12:</b> Comparación de frecuencias entre los resultados positivos y negativos obtenidos del procesamiento de las muestras por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).	<b>82</b>

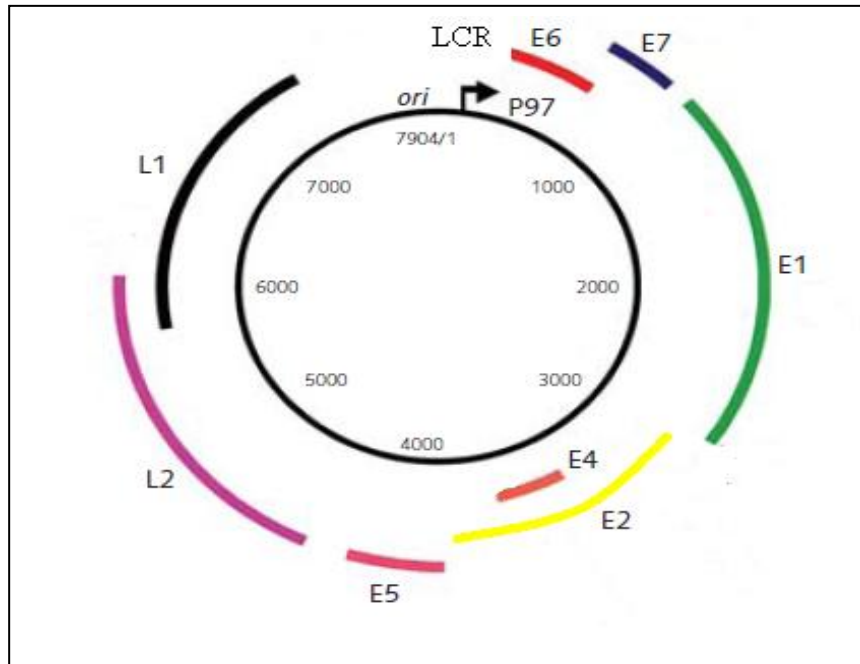
<b>Tabla 13:</b> Comparación de frecuencias entre los tipos de VPH obtenidos del procesamiento de las muestras por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).	<b>83</b>
<b>Tabla 14:</b> Comparación de frecuencias entre los resultados positivos y negativos obtenidos del procesamiento de los controles por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).	<b>84</b>
<b>Tabla 15:</b> Comparación de frecuencias entre los resultados positivos y negativos obtenidos del procesamiento de los controles por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).	<b>85</b>
<b>Tabla 16:</b> Relación entre el resultado de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y el diagnóstico clínico y cálculo de los índices de validez (Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, RV+ y RV-).	<b>86</b>
<b>Tabla 17:</b> Relación entre el resultado de CH2 (HC2 HPV DNA test) y el diagnóstico clínico y cálculo de los índices de validez (Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, RV+ y RV-).	<b>87</b>
<b>Tabla 18:</b> Factores de riesgo asociados a la adquisición de la infección por VPH y a la progresión de la infección por VPH a cáncer cérvicouterino en las muestras.	<b>89</b>
<b>Tabla 19:</b> Factores de riesgo asociados a la adquisición de la infección por VPH y a la progresión de la infección por VPH a cáncer cérvicouterino en los controles.	<b>89</b>
<b>Tabla 20:</b> Carga viral semicuantitativa de muestras y controles.	<b>91</b>

## **I.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) Y SU ORGANIZACIÓN GENÉTICA**

El Virus de Papiloma Humano (VPH) es una partícula de forma icosaédrica, de 55nm compuesta por 72 capsómeros (Dimmock y col., 2007). Cada capsómero es un pentámero conformado por la proteína principal L1; también contiene la proteína L2, aunque en menor cantidad. El genoma viral de VPH consiste en una molécula circular de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, que contiene aproximadamente 7.900 pb, asociados a histonas, que está funcionalmente dividido en tres regiones: la primera es una región reguladora no codificante de 400 a 1.000 pb, que se ha denominado región larga de control (LCR), o región reguladora superior. Esta región es la más variable de todo el genoma. La segunda región representa el 45% del genoma y consiste en marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) para las proteínas no estructurales de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7, cuya función es controlar la replicación del ADN e inducir la transformación maligna de la célula hospedera (Cortés y Leal, 2001; Burd, 2003).

El gen *E1* (figura 1) controla la replicación episomal del ADN; si esta zona del genoma se encuentra completa y funcional se produce una replicación normal, evitando la integración del ADN viral al genoma de la célula (Cortés y Leal, 2001).



**Figura 1:** Representación esquemática del genoma de VPH. Molécula de ADN, circular, doble cadena, de 7.900 pb aproximadamente. Las líneas de colores representan los 8 genes principales que codifican las proteínas virales. Los genes tempranos (E) y los genes tardíos (L). (Tomado y modificado de Burns y Maitland, 2005).

Se ha planteado que la proteína E2 juega un papel muy importante en el ciclo de vida del virus ya que posee la capacidad de reprimir o activar los promotores virales. El gen *E2* codifica un factor represor de transcripción (E2-TR), el cual bloquea la transcripción de los genes *E6* y *E7*. Aún no se conoce la función de la proteína E3. El gen *E4* produce proteínas que intervienen en la maduración de las partículas virales; este gen se pierde cuando el ADN viral se integra al genoma de la célula. El gen *E5* produce una proteína pequeña de 44 aminoácidos, que se une a la membrana citoplasmática. La pérdida o mutación de esta región, evita la replicación episomal del ADN y favorece su integración al cromosoma. Las regiones E6 y E7 (Ver figura 1) producen dos oncoproteínas transformantes, que suprimen la apoptosis y reactivan la síntesis de proteínas en



el hospedador, facilitando así la replicación viral (Cortés y Leal, 2001). Por último, la tercera región es la que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside del virus (Burd, 2003).

## **1.2.- CLASIFICACIÓN DEL VPH**

Taxonómicamente, el VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, compuesta por 16 géneros. Los tipos virales del género *alpha papillomavirus* se caracterizan por ser causantes de lesiones mucosas y cutáneas en humanos y primates (López y Aristizabal, 2006).

Hasta el momento, del género *alpha papillomavirus*, se han logrado identificar más de doscientos tipos virales clasificados según la homología de sus genomas y de acuerdo al potencial para inducir la transformación maligna. La clasificación de los diferentes tipos virales, en base a la homología de sus genomas, se realiza por comparación de la secuencia nucleotídica del gen *L1*, una de las regiones más conservadas dentro del genoma viral. Un nuevo tipo viral se define cuando se identifica un nivel de variación mayor al 10% en la secuencia de *L1* respecto a la secuencia de los tipos previamente clasificados, un subtipo se define con cambios entre el 10 y 2% y una variante con menos del 2% de cambios. De la misma manera, miembros de diferentes géneros comparten menos del 60% de homología en el marco abierto de lectura *L1*; las especies de un mismo género comparten entre el 60-70%, y los tipos de una misma especie, entre el 71-89% (López y Aristizabal, 2006; Quintero y col., 2008).

De acuerdo al potencial para inducir malignidad, los tipos de VPH se han dividido en bajo riesgo y alto riesgo oncogénico. Los tipos de VPH de bajo riesgo, que incluye los tipos 6, 11, 42, 43, y 44, se caracterizan por causar verrugas genitales o condilomas acuminados y por no producir cáncer; y los de alto riesgo, que incluye los tipos 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56 y 58, generalmente pueden causar cambios celulares y finalmente cáncer anal, de cuello uterino y de cabeza y cuello (Quintero y col., 2008).

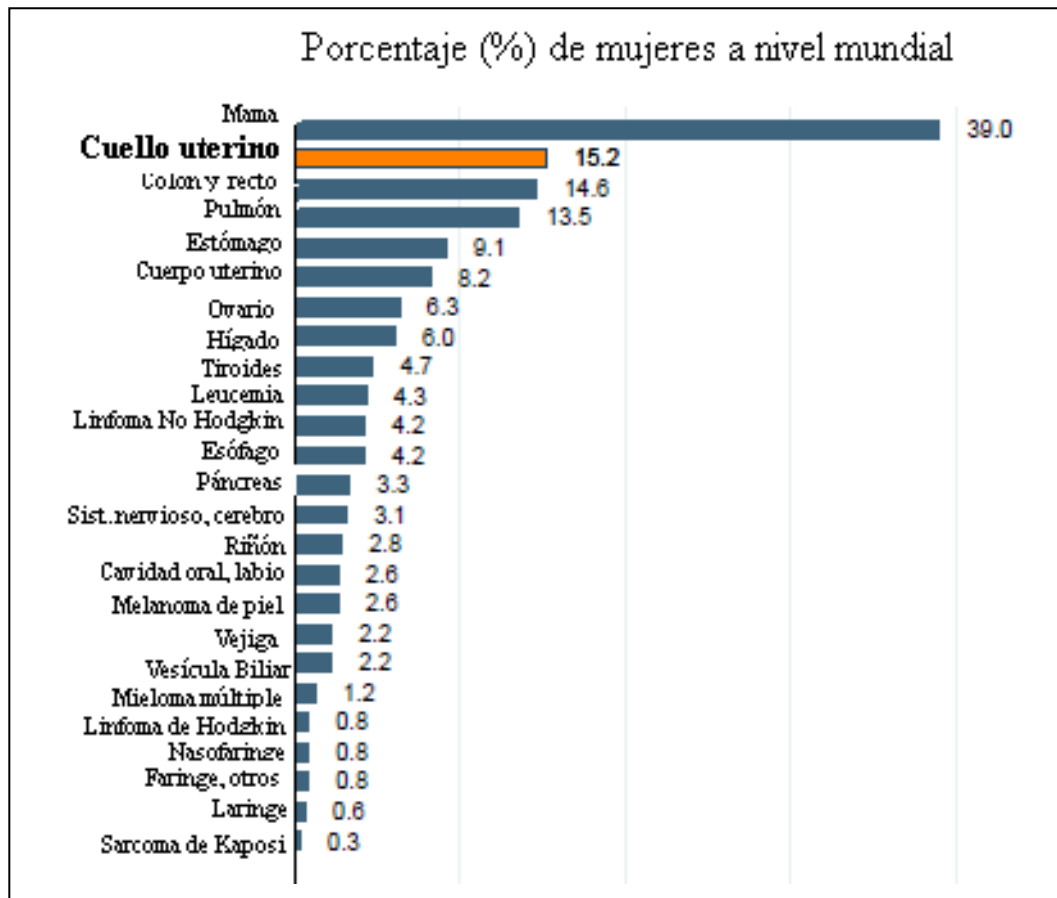
Entre los virus de alto riesgo oncogénico, el tipo 16 es el más común en todo el mundo, seguido por los tipos: 18, 45, 31 y 33. En Asia, los tipos 58 y 52 son los más comunes después de los tipos 16 y 18 (Zandi y col., 2010).

### **1.3.- EPIDEMIOLOGÍA**

La infección por VPH es considerada como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo y como el principal factor etiológico de lesiones intraepiteliales y de cáncer cérvicouterino (Rivera y col., 2002).

A escala mundial, el VPH es el responsable de un 5,2% de todos los tumores humanos, correspondiendo un 2,2% a los países desarrollados, y un 7,7% a los países en vías de desarrollo. Entre 70-80% de las mujeres y los hombres sexualmente activos, han estado expuestos al virus en algún momento de su vida (Diestro y col., 2007).

Se ha estimado que el cáncer de cuello uterino representa el 12% de todos los casos de cáncer, siendo el segundo más común en mujeres en todo el mundo (Ver figura 2); cada año un poco más de 500.000 mujeres desarrollan cáncer cervical y cerca de 275.000 mueren por esta causa. En América del Sur, se estima que alrededor del 13,2% de las mujeres con citología normal se encuentran infectadas por algún tipo de VPH y el 67,7% de los casos de cáncer invasor se atribuyen a los VPH tipo 16 o 18 (WHO/ICO HPV Information Centre, 2010).



**Figura 2:** Porcentaje estimado de incidencia del cáncer de cuello uterino comparado con otros tipos de cáncer en el mundo (Tomado y modificado de: WHO/ICO HPV Information Centre, 2010).

En muchos países en desarrollo, especialmente los pertenecientes a África y América Latina, el cáncer de cuello uterino ocupa el primer lugar en incidencia (López y Aristizábal, 2006).

**Tabla 1: Datos epidemiológicos comparativos entre Venezuela, América del sur y el mundo (WHO/ICO HPV Information Centre, 2010).**

Indicador	Venezuela	América del sur	Mundo
Tasa cruda de incidencia <sup>1</sup>	29,4	24,6	15,2
Tasa de incidencia (mujeres entre 15 y 44 años) <sup>1</sup>	31,4	24,1	15,3
Número de nuevos casos de cáncer anual	4116	47.881	529.828
Tasa cruda de mortalidad <sup>1</sup>	13,2	11,2	8,2
Tasa de mortalidad (mujeres entre 15 y 44 años) <sup>1</sup>	14,4	10.8	7.8
Número de muertes anuales	1.853	21.836	275.128

<sup>1</sup>Tasa por 100.000 mujeres al año.

Venezuela tiene una población de 9,20 millones de mujeres (en edades a partir de los 15 años), que están en riesgo de desarrollar cáncer cervical. Las estimaciones actuales indican que cada año 4.116 mujeres son diagnosticadas

con cáncer cervical y 1853 mueren a causa de la enfermedad. El cáncer de cuello uterino ocupa el segundo lugar en cuanto al tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres de Venezuela, y el primer lugar de los cánceres más frecuentes en las mujeres con edades comprendidas entre 15 y 44 años de edad. La tasa de mortalidad promedio en Venezuela es de 13 por cada 100.000 mujeres, al año, mientras que a nivel mundial es de 8 por cada 100.000 mujeres (Tabla 1). Así mismo se hace una proyección de 6.425 casos de cáncer cervical y 3070 muertes para el año 2025 en Venezuela (WHO/ICO HPV Information Centre, 2010).

#### **1.4.- MECANISMO DE INFECCIÓN DEL VPH Y CARCINOGENESIS**

El VPH infecta las mucosas y las superficies cutáneas y provoca la aparición de verrugas o tumores epiteliales. Para que los viriones puedan penetrar e iniciar un proceso infeccioso se requiere una continuidad de tejidos, de manera que el virus pueda ponerse en contacto con las células permisivas, que son las células basales de los epitelios (Cortés y Leal, 2001).

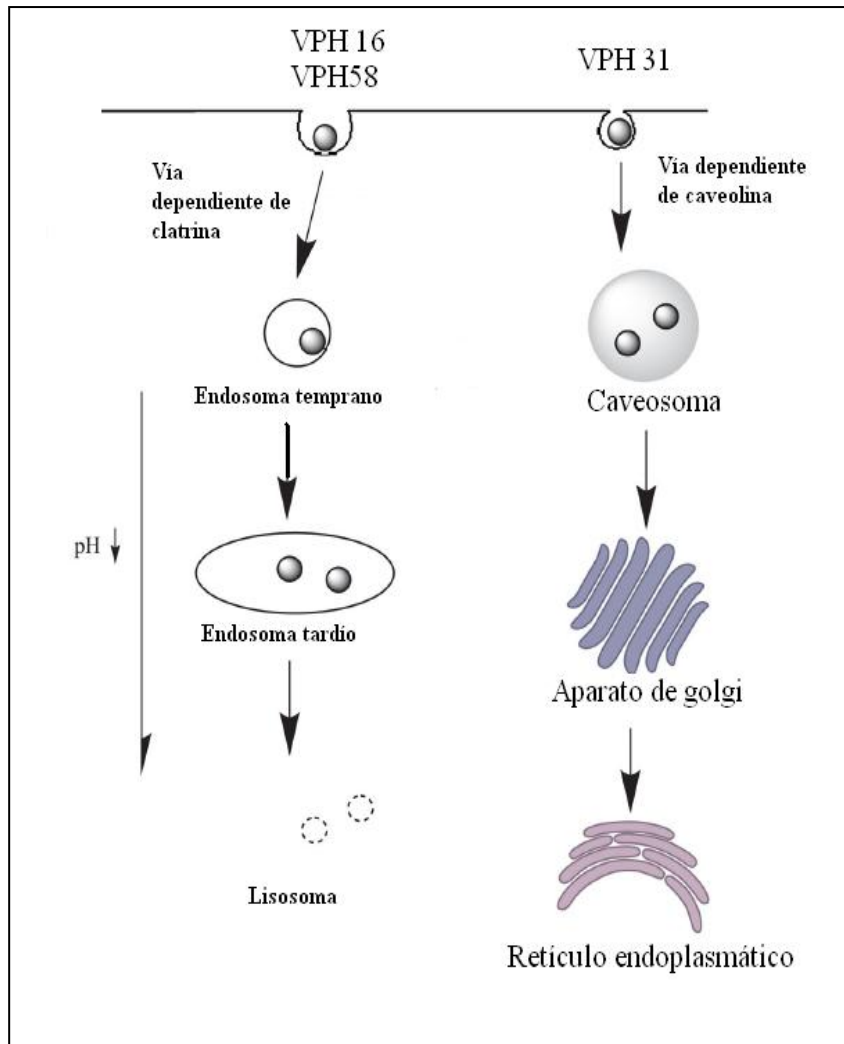
De manera general, las fases involucradas en el mecanismo de infección del VPH y en la carcinogénesis son las siguientes:

##### **1.4.1.- Unión y entrada del virus:**

El sitio inicial de infección se cree que es en las células basales o células primitivas del epitelio escamoso inmaduro, debido a la presencia de receptores

específicos para el VPH en esta zona (Kurman, 2002). Durante la actividad sexual, el microtrauma del epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, permite la exposición de las células basales, en activa proliferación, a los diferentes tipos de VPH, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi-terminal (Giroglou y col., 2001). Dicho receptor ha sido asociado estructuralmente con Heparán Sulfato para los tipos virales 16 y 33 y con Alfa-6-Integrina para VPH 6 (Letian y Zhang, 2010).

Una vez unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped, proceso que ha sido identificado como endocitosis. Varios sistemas han sido reconocidos; uno de ellos involucra un complejo proteico llamado Clatrina, utilizado por los tipos 16, 18 y 58; y otro, utiliza un grupo de proteínas, principalmente Caveolina, denominado endocitosis por caveolas, en el que participa el VPH 31 (Figura 3) (Rivera y col., 2006).



**Figura 3:** Vías de entrada del VPH por endocitosis. Los tipos de VPH 16 y 58 son capaces de ingresar al citoplasma por medio de una familia de proteínas llamadas clatrina, las cuales hacen posible la formación de endosomas tempranos, que posteriormente se convierten en endosomas tardíos en los que se comenzará la degradación a un pH entre 5 y 6 por la acción de enzimas lisosómicas. Al descender el pH, el genoma viral es liberado. El VPH tipo 31 ingresa a través de la vía dependiente de la proteína caveolina, la cual forma un caveosoma que se dirige a el Aparato de Golgi y luego al Retículo Endoplasmático (Tomado y modificado de Letian y Zhang, 2010).

#### **1.4.2.- Degradación de la cápside viral y transporte de material genético al núcleo celular:**

Posterior a la endocitosis, existe evidencia en modelos de infección por partículas virales tipo 11 y 16, que la cápside viral de 55 nm de diámetro experimenta degradación en el citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfido que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares de un diámetro aproximado a 39 nm, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (Rivera y col., 2006).

#### **1.4.3. Replicación, ensamblaje y liberación de las partículas virales:**

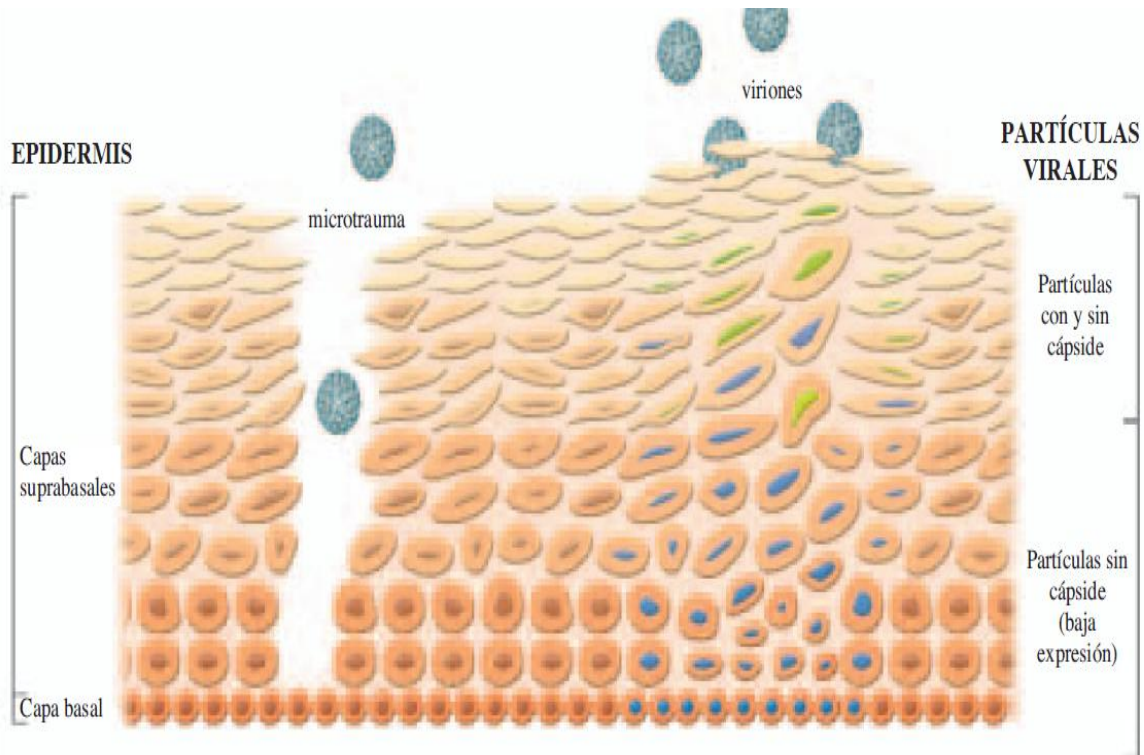
Una vez que el VPH ingresa en las células basales, este puede mantenerse en dos estados biológicos diferentes. Uno de estos estados es la infección no productiva o infección latente, en la cual el ADN del VPH reside en las células basales, pero no se producen viriones infecciosos. En esta etapa, un pequeño número de copias del genoma de VPH (30-50 copias por célula infectada) se encuentra en el núcleo bajo una forma extracromosómica circular, denominada episoma. Debido a que, aparentemente, en esta fase no se producen partículas virales completas, los efectos citopáticos característicos de una infección por VPH no se presentan y el virus solo puede ser detectado por métodos moleculares



(Kurman, 2002). Se postula que durante esta etapa, se podría asegurar que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias, se impediría la activación de la respuesta inmune (Ling y col., 2002).

La otra forma de infección por VPH es la denominada infección viral productiva, en la cual ocurre la replicación del ADN viral independientemente de la síntesis de ADN de la célula hospedadora. El ADN viral se localiza en las zonas intermedias y en la superficie del epitelio escamoso estratificado (Kurman, 2002).

En este proceso de infección por VPH, a medida que las células basales se diferencian y se desplazan hacia la superficie del epitelio (Figura 4), tienen lugar la replicación y la transcripción del ADN y se ensamblan las partículas virales en el núcleo. Los viriones completos son liberados por medio de los queratinocitos muertos. En una verruga o condiloma, la replicación viral se asocia a una proliferación excesiva de todas las capas epidérmicas, excepto de la capa basal (Mandell y col., 2006).



**Figura 4:** Representación gráfica y esquemática de un epitelio infectado por VPH mostrando varias capas diferenciadas. Un microtrauma permite la entrada del virus. La amplificación del genoma, la expresión de genes tardíos y la producción de los viriones ocurre en las capas suprabasales (Tomado y modificado de: Diestro y col., 2007).

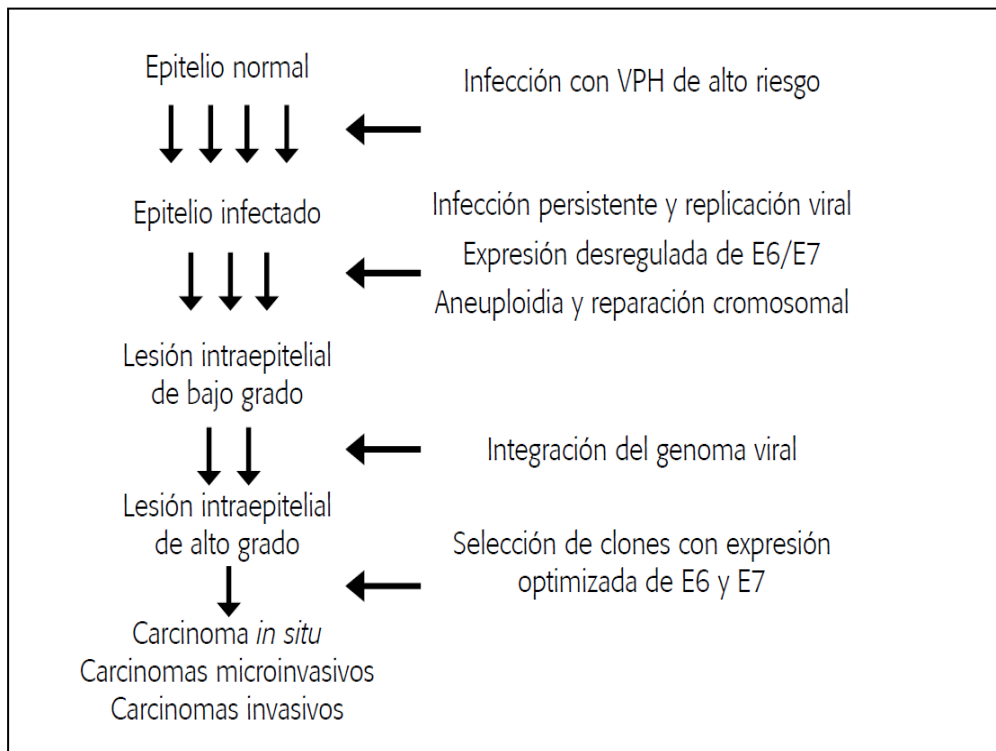
#### **1.4.4.- Integración del ADN viral y transformación oncogénica:**

El cáncer de cuello uterino, al igual que muchos otros tipos de cáncer, se desarrolla como resultado de múltiples alteraciones genéticas, epigenéticas e inmunológicas; adicionalmente otros factores como la interacción entre el medio ambiente y célula pueden facilitar la promoción de los procesos de transformación neoplásica. Una de dichas interacciones la constituye la infección por VPH de alto riesgo oncogénico. Este virus se ha detectado en el 90-100% de los casos de cáncer cervical y se cree que es una causa necesaria pero insuficiente para el

desarrollo de carcinomas invasivos de cuello uterino. Uno de los procesos que parece estar más involucrado en el origen de las células malignas es el evento de integración del virus al genoma del huésped, proceso considerado como una alteración genética importante que caracteriza las lesiones malignas y que está relacionado con la pérdida o inactivación de genes (López y Aristizábal, 2006).

Diferentes trabajos han demostrado que la integración viral es un evento importante en la progresión de lesiones intraepiteliales a carcinomas invasivos de cuello uterino; sin embargo, después de más de dos décadas de investigación acerca del papel del VPH, todavía no son claros los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de integración. Wentzensen y col., (2004) propusieron un modelo que intenta explicar el papel de la integración en el desarrollo de carcinomas invasivos (Figura 5). En etapas tempranas, la expresión de oncoproteínas virales, en células epiteliales, generalmente conduce al desarrollo de diferentes tipos de anormalidades cromosomales, no obstante, la posterior activación de los mecanismos de reparación celular facilita la inserción de secuencias foráneas como las de VPH. Así, se ha observado que la homología entre secuencias del virus y la región del genoma celular que se recombinan, es prácticamente nula, lo que permite considerar el proceso de inserción viral como un mecanismo que se facilita por eventos de recombinación no homóloga, proceso empleado frecuentemente por las células para la reparación de daños genéticos (López y Aristizábal, 2006).

La progresión de lesiones asociadas a VPH refleja el clásico escenario de selección en el cual ciertos eventos conducen a la expansión clonal de células alteradas biológicamente. Pese a que la integración de fragmentos virales ocurre paralelamente en múltiples clones celulares, el proceso de selección en etapas avanzadas promueve el crecimiento de clones celulares que por diferentes mecanismos, como el evento de integración, presentan aumento en la expresión de las oncoproteínas virales (López y Aristizábal, 2006).

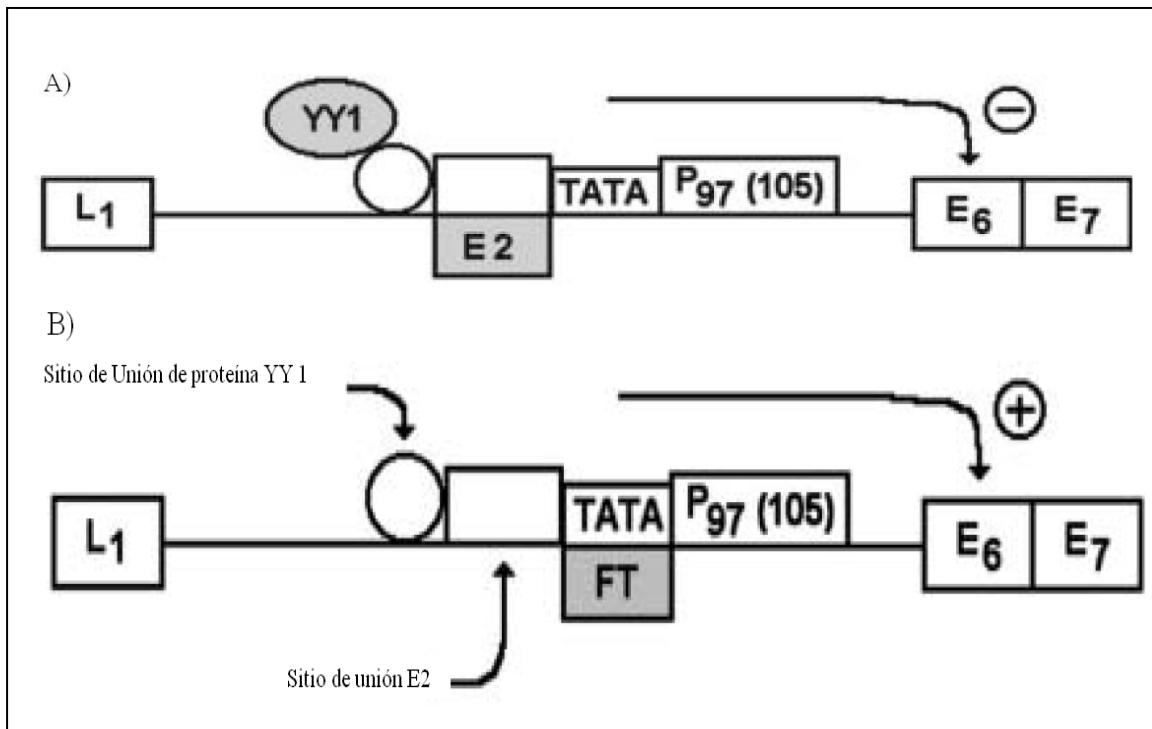


**Figura 5: Integración viral y progresión de displasias de cuello uterino.** La infección persistente del VPH de alto riesgo en el epitelio normal, produce una expresión desregulada de E6/E7 lo que produce el desarrollo de lesiones intraepiteliales. Al integrarse el genoma viral, estas lesiones progresan y pueden transformarse en una lesión de alto grado o en carcinoma *in situ*, carcinomas microinvasivos o carcinomas invasivos (Tomado de: López y Aristizábal, 2006; modificado de: Wentzensen y col., 2004).

En el proceso de integración, la linealización del genoma circular es una etapa necesaria que involucra el clivaje o ruptura de la doble cadena viral, principalmente en la región E1/E2. Adicional a la ruptura, en la mayoría de los casos, se presentan deleciones de fragmentos virales. En el caso del VPH 16 se han identificado diferentes patrones de ruptura de acuerdo a la secuencia viral afectada, actualmente se considera que el fragmento viral correspondiente a los genes *E1* y *E2* es la región con mayor tasa de ruptura. Sin embargo, dentro de esta región a su vez existen varias secuencias específicas que han sido reconocidas como blancos de ruptura viral. Es posible que así como la dinámica de integración varíe con la población de estudio, ocurra lo mismo con los sitios específicos de corte viral (López y Aristizábal, 2006).

Teniendo en cuenta que frecuentemente ocurren rupturas a nivel de la región E1 y E2, parte de los efectos de la integración viral van a depender de la alteración de las funciones biológicas de estos genes. La proteína E2 de VPH 16 controla negativamente la transcripción de los genes virales *E6* y *E7* al unirse al promotor viral P97. En presencia de la proteína E2, hay represión continua de la transcripción de las oncogenes *E6* y *E7*, contrariamente, la ausencia del represor E2 permite el libre acceso de factores de transcripción celulares que se agrupan en el promotor viral y regulan positivamente la transcripción de E6 y E7 (Figura 6) (Lewis y col., 1999). La función de los productos de los genes *E6* y *E7*, durante una infección productiva de VPH, es alterar las vías reguladoras del crecimiento celular y modificar el medio celular para facilitar la replicación viral en una célula terminalmente diferenciada (Burd, 2003).

Es importante destacar que la proteína E2 también ha sido relacionada con procesos de muerte celular por apoptosis en ausencia de factores de crecimiento. Cabe destacar que se ha demostrado que las proteínas E2 de tipos virales de alto riesgo localizadas en núcleo y citoplasma pueden inducir apoptosis, mientras que las derivadas de genotipos de bajo riesgo ubicadas exclusivamente en el núcleo no causan muerte celular (Blachon y col., 2005).



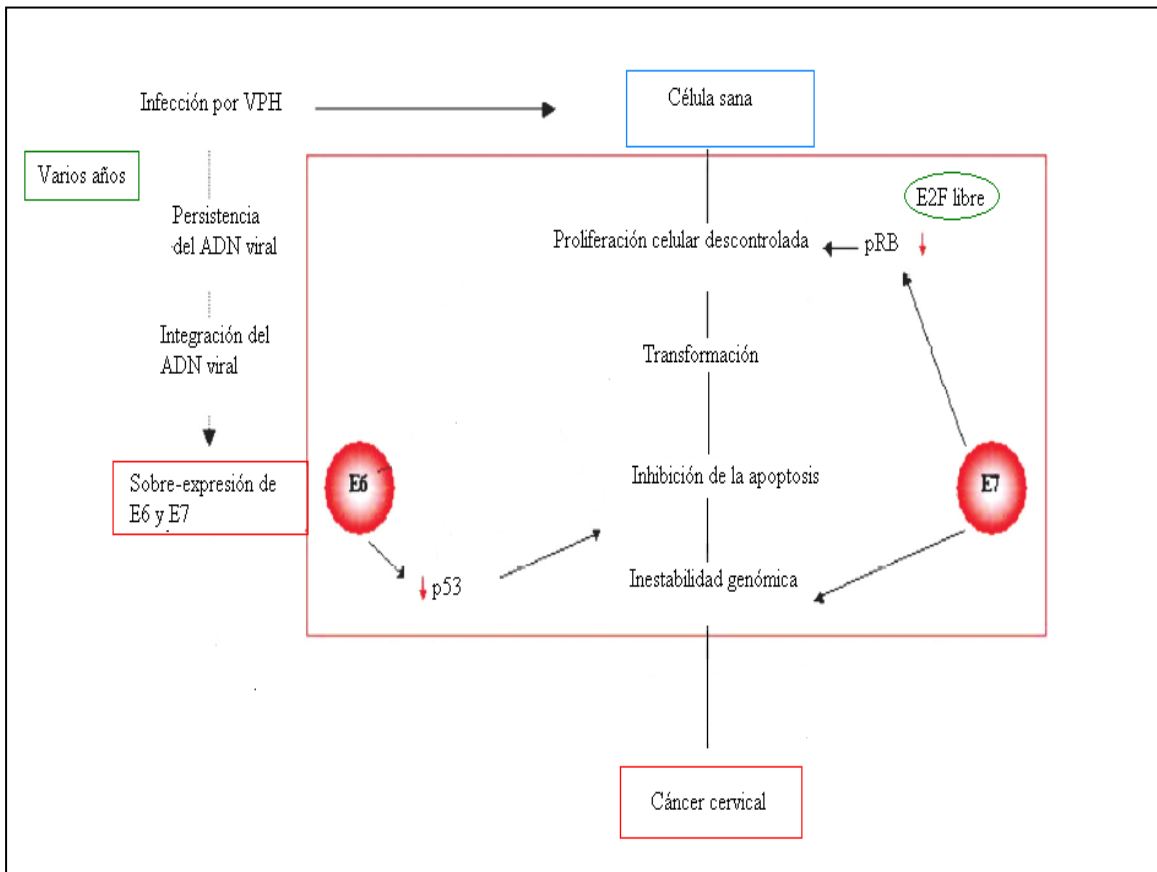
**Figura 6:** Representación del ADN viral no integrado e integrado. A) ADN viral integrado. La unión de E2 y la proteína Ying-Yang 1 (YY 1), a sus respectivos sitios de unión, reprimen la expresión de E6 y E7. E2 reprime al promotor P97 (VPH 16) o al P105 (VPH 18), ubicado próximo a la caja TATA, encargado de la transcripción de las proteínas E6 y E7. B) Integración del genoma viral. Al integrarse, se altera el marco abierto de lectura de E2, perdiéndose así el efecto inhibitorio sobre el promotor P97 o P105, que mantenía bloqueada la expresión de las proteínas E6 y E7, las que son ahora sintetizadas sin restricción vía factores de transcripción (FT). Tomado y modificado de: Rivera y col., 2006.

El crecimiento celular está regulado principalmente por dos proteínas; la proteína supresora de tumor p53 y el producto del gen de retinoblastoma, pRB. Luego de la integración y la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7, la primera, de 150 aminoácidos, forma un complejo con p53 y determina su rápida degradación por medio de la vía ubiquitina ligasa (Burd, 2003). El gen p53 se localiza en el cromosoma 17; la proteína p53 en condiciones basales, permite detener el ciclo celular en fase G1, y puede activar mecanismos de apoptosis frente a una carga viral elevada o ante mutaciones del ADN celular. Como consecuencia, su función protectora del genoma celular es alterada por la proteína E6 (Rivera y col., 2006).

El producto del gen E7 (100 aminoácidos), se une a la forma hipofosforilada de la familia de las proteínas de RB, a través de su extremo N-terminal (aminoácidos 20 a 30); esto interrumpe el enlace entre el complejo pRB y el factor de transcripción celular E2F-1, lo que produce la liberación de este factor que permite la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para que la célula entre en la fase S del ciclo celular. El resultado es la estimulación de la síntesis del ADN celular y la proliferación celular descontrolada (Figura 7) (Burd, 2003).

La inactivación de las proteínas p53 y pRb incrementa la tasa de proliferación celular y la inestabilidad genómica. Como consecuencia, la célula hospedadora acumula ADN dañado que permite la transformación de las células cancerosas. Además de los efectos producidos por estas proteínas, existen otros

mecanismos que contribuyen potencialmente a la progresión del cáncer de cuello uterino; entre ellos están los factores hormonales e inmunogenéticos (Méndez, 2007).



**Figura 7: Carcinogénesis mediada por VPH.** En la fase del desarrollo de los tumores malignos, el genoma del virus se integra en el ADN del hospedador, tras varios años de infección. Esta integración produce una sobre-expresión de las proteínas transformadoras E6 y E7, debido a estos altos niveles de expresión, forman complejos con otras proteínas celulares. E7 se une a la proteína del retinoblastoma (pRB), interrumpiendo el enlace entre el complejo pRB y el factor de transcripción celular E2F, lo que produce una proliferación celular descontrolada, una transformación celular y una inestabilidad genómica. Por otro lado, la proteína codificada por E6 se une a p53 y determina su rápida degradación por medio de la vía ubiquitina ligasa. Como consecuencia, las actividades normales de p53 (apoptosis, reparación del ADN y detención del ciclo celular en G1) son interrumpidas. La acción conjunta de E7 (inhibiendo pRb) y de E6 (degradando p53) es una potente combinación oncogénica que puede producir cáncer cervical. Tomado y modificado de: Sterlinko, 2009.



La integración del genoma viral al de la célula hospedadora no ocurre en todos los casos de cáncer cervical, pudiendo explicarse por mutaciones en zonas represoras como la región Ying- Yang (YYI), que mantendría la expresión continua de E6 y E7 o por la producción de ARN “quiméricos”, más estables, permitiendo mayor síntesis de estas oncoproteínas (Rivera y col., 2006).

A pesar de un alto porcentaje de mujeres jóvenes y sexualmente activas están expuestas a las infecciones por VPH, solo un porcentaje muy pequeño llega a desarrollar cáncer de cuello uterino. Varios estudios han sugerido que la mayoría de las mujeres eliminan con éxito la infección por VPH, probablemente por la acción de un sistema inmune competente. Sin embargo, aproximadamente el 90% de las lesiones se vuelven a manifestar espontáneamente luego de 12 a 36 semanas. La progresión a cáncer generalmente se desarrolla con la persistencia del virus de alto riesgo durante un período de 10 a 20 años. Algunas lesiones se vuelven cancerosas mucho más rápido (aproximadamente 2 años) (Méndez, 2007).

### **1.5.- TRANSMISIÓN**

La transmisión más efectiva del virus es por medio de las relaciones sexuales, aunque existen otras formas de transmisión comprobadas, pero con bajas probabilidades de infección, tales como: contacto íntimo con objetos usados por personas infectadas (toallas húmedas, sábanas, ropa íntima) y transmisión de

madre infectada a su hijo(a) durante el parto (si hay lesiones en el canal vaginal o vulva) (Correnti y col., 2002).

La infección por el virus requiere de la pérdida de continuidad de la piel o mucosa, lo cual sucede invariablemente durante las relaciones sexuales. La mayoría de las lesiones presentes en jóvenes están relacionadas con la actividad sexual, incrementando la posibilidad de riesgo con la iniciación temprana de ésta y el número de parejas sexuales (López, 2008).

## **1.6.- PREVENCIÓN**

Actualmente no existen métodos de prevención eficaces, con la excepción de evitar el contacto con las lesiones infecciosas. El uso de preservativos es bastante eficiente según algunos estudios realizados (Diestro y col., 2007).

En la década de los 90, se iniciaron en humanos los ensayos clínicos preliminares de la vacuna contra VPH y en los años 2005 y 2006, la Food and Drugs Administration (FDA), aprobó dos de estas vacunas: la que incluye VPH 16, 18, 6 y 11 (tetraivalente) y la que incluye los tipos 16 y 18 (bivalente). Estas vacunas profilácticas han sido diseñadas para prevenir infecciones por VPH de alto riesgo oncogénico (bivalente) y de alto y bajo riesgo oncogénico (tetraivalente), pero debido a los altos costos que implica la producción de estas vacunas, ha sido difícil aplicarlas en las poblaciones de países subdesarrollados (Diestro y col., 2007).

## **1.7.- FACTORES DETERMINANTES Y COFACTORES**

La asociación observada entre VPH y cáncer de cuello uterino, está entre las más consistentes de las identificadas en cancerología humana, existiendo un consenso creciente en calificarla como causa necesaria, pero insuficiente, ya que no todas las infecciones por VPH persisten o progresan a carcinoma de cuello uterino. Los factores determinantes que describen Diestro y col. (2007) para la adquisición del VPH y para la progresión de la infección por VPH a cáncer cérvicouterino son:

### **1.7.1.- Factores dependientes del virus:**

- Tipo viral.
- Persistencia de la infección en exámenes repetidos.
- Carga viral (probable).

### **1.7.2.- Factores ambientales:**

- Anticoncepción hormonal oral: cuando se consumen durante cinco años o más, aunque el riesgo tiende a desaparecer en los 5 años siguientes a la interrupción del consumo.

- Número de embarazos (paridad): Cuando se tienen más de 5 embarazos. Este factor junto con el anterior, sugieren una asociación positiva entre VPH y esteroides.

- Tabaquismo: Se han aislado sustancias carcinogénicas del tabaco presentes en el moco cervical, aunque no se conoce bien la dinámica de la interacción.

- Edad de la primera relación sexual: es un conocido factor de riesgo. La prevalencia de VPH más alta comprende las edades inmediatas al inicio de las relaciones sexuales, y responde a los patrones de comportamiento sexual de la comunidad. En grupos de edad de 15 a 25 años, si tienen compañeros sexuales distintos, llegan a tener prevalencias del 30-40%. Después de este pico, le sigue una disminución muy marcada, estabilizándose en edades de 25 a 40 años en un 3-10%, interpretándose esta cifra como una medida indirecta del número de mujeres portadoras crónicas de la infección viral, y por tanto, del grupo de alto riesgo para progresión neoplásica. En algunas poblaciones se ha observado un segundo pico de prevalencia en mujeres postmenopáusicas, postulándose el reflejo de la reactivación de una infección latente que se asociaría a la reducción fisiológica de la inmunidad natural con la edad.

- Coinfecciones: *Chlamydia trachomatis* parece ser un cofactor que actúa por inducción de inflamación crónica y metabolitos mutagénicos. El Herpes Simple tipo 2 también parece actuar como cofactor, con una evidencia algo más dudosa.

- Deficiencias nutricionales y bajos niveles de antioxidantes son otros factores propuestos.

- Estado inmunológico: Además de la pérdida de inmunidad natural con la edad, los polimorfismos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y del gen supresor tumoral p53 son otros determinantes inmunológicos de susceptibilidad.

Especial consideración merece el papel del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), como muestran los estudios en los que se detectó que en mujeres VIH positivas el riesgo de infección por VPH de alto y bajo riesgo sería de entre 1,8 y 2,7 veces superior.

El VPH también se relaciona con el cáncer de vulva. Este tipo de cáncer responde a dos modelos etiológicos. El primero ocurre en mujeres menores de 50 años, está ligado a infección por VPH y cursa con lesiones precursoras como neoplasia vulvar intraepitelial de alto grado (NIV II-III). El segundo tipo se produce en mujeres mayores de 50 años, es independiente de la infección viral y no cursa con lesiones precursoras. La fracción de casos atribuible a VPH sería aproximadamente un 50%.

Otras localizaciones expuestas al virus donde también se pueden producir neoplasias, serían el pene, la vagina y la cavidad oral y orofarínge.

También se ha considerado que una baja condición socioeconómica es el factor de riesgo de numerosos problemas de salud, incluido el cáncer cérvicouterino. Las mujeres con una baja condición socioeconómica a menudo tienen bajos ingresos, limitaciones para acceder a los servicios de atención de salud, nutrición deficiente y escasa concientización acerca de los temas de salud y de una conducta preventiva. Todos estos factores pueden hacerlas más proclives a enfermarse o a padecer enfermedades que pueden prevenirse, como el cáncer cérvicouterino (Dos Santos y Beral, 1997).

## **1.8.- MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VPH**

Actualmente se emplean técnicas y/o métodos tanto clínicos como de biología molecular para sugerir la presencia de infección viral o detectar la presencia del genoma viral en material citológico y biopsias. Las técnicas moleculares permiten detectar la presencia del genoma viral aún si la infección es subclínica o el número de partículas virales es bajo.

### **1.8.1.- Diagnóstico clínico:**

El método convencional de pesquisa de cáncer cérvicouterino ha sido la citología cérvico-vaginal y su interpretación se basa en la clasificación de Papanicolaou (Pap). Sin embargo, el método tiene limitaciones importantes entre las cuales se encuentran el impedimento de una automatización completa de la técnica, variaciones constantes para mejorar su sensibilidad, la sobrevaloración y

la subvaloración de los hallazgos citológicos, sobre todo en las evaluaciones de los cambios morfológicos, aunado a que la citología únicamente permite sugerir la presencia de una infección por VPH, pero hasta ahora no es posible hacer la detección directa del virus, indicar si hay una infección viral mixta y determinar los genotipos correspondientes (Cavazza y Correnti, 2004). Lo anteriormente expuesto condujo a la creación de una nueva clasificación citológica: el Sistema Bethesda, que sustituye la clasificación de Pap. Este sistema, modificado en el año 2001, clasifica las anomalías de las células escamosas en 4 categorías: células escamosas atípicas (Atypical Squamous Cells o ASC), Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo grado (LIEBg), Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto grado (LIEAg) y carcinoma de células escamosas. La categoría ASC contiene 2 subcategorías: las células escamosas atípicas de significado incierto (ASC-US, por sus siglas en inglés) y las células escamosas atípicas que no pueden excluir LIEAg (ASC-H, por sus siglas en inglés) (Burd, 2003).

Las LIEBg (o NIC I), se caracterizan por poseer un patrón de diferenciación del epitelio escamoso infectado similar al patrón de diferenciación del epitelio normal, observándose células inmaduras de tipo basal confinadas en el tercio inferior del epitelio y una correcta maduración en superficie. Las células superficiales presentan signos de coilocitosis (tamaño aumentado de los núcleos, hiperchromasia e irregularidad en el contorno de la membrana nuclear). En las LIEAg (o NIC II y NIC III) y en las neoplasias invasoras, histológicamente todo el epitelio está formado por células inmaduras de tipo basal. En estas lesiones la

ausencia de maduración de las células epiteliales reduce la replicación del virus (Ordi, 2005).

### **1.8.2.- Detección y tipificación de VPH por métodos moleculares:**

El rol del VPH en la génesis del cáncer cérvicouterino, como de otras áreas genito-anales, ha impulsado el desarrollo de técnicas para el diagnóstico capaces de detectar la presencia viral y de genotipificarlo mediante ensayos de biología molecular, ya que este virus no se replica en monocapas convencionales de cultivo celular. En la actualidad, existen muchos protocolos descritos en publicaciones que se utilizan de rutina en los laboratorios para la detección de VPH, entre ellos la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y la de Captura de Híbridos 2 (CH2) (Martínez, 2010).

Muchos laboratorios a nivel mundial utilizan ensayos de RCP con iniciadores consenso, generalmente de la región conservada del genoma L1. Los iniciadores consenso descritos incluyen los GP5/GP6 y los degenerados GP5+/GP6+, los MY09/MY11 y los degenerados PGMY09/PGMY11 y los SPF. La amplificación con cada uno de estos pares de iniciadores da como resultado productos de diferentes tamaños, y diversas sensibilidades para la detección de ciertos genotipos de VPH, según las características y condiciones del material biológico utilizado en la prueba. Luego de aplicar la RCP, el análisis de los productos y la tipificación del VPH se puede obtener por secuenciación o por



hibridación con sondas específicas utilizando varios métodos como: el Dot Blot, Southern Blot, Reverse Line Blot Strip Assays (ensayos de hibridación lineal reversa) y ensayos en formatos de microarreglos. La tipificación también se puede realizar mediante RCP múltiple (Monsonogo, 2006).

Muchas metodologías no han sido estandarizadas, por este motivo se han creado pruebas para detección y tipificación viral de VPH como: la prueba de Roche Diagnostics (Amplicor, Indianapolis, Ind., USA) que detecta 13 tipos de VPH de alto riesgo, el Linear Array Assay (Roche Diagnostics, Amplicor, Indianapolis, Ind., USA) y los sistemas de microarreglo (Biomedlab Company, Seoul-Korea). Este último requiere de equipos costosos y ninguno de los nombrados ha sido aprobado por la FDA (Monsonogo, 2006).

La técnica CH2 para VPH de Digene Corporation, Gaithersburg, MA, está aprobada por la FDA y es un método estandarizado y disponible comercialmente (Cañadas y col., 2006). Esta técnica proporciona una sensibilidad cercana a la RCP, detectando 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 tipos de bajo riesgo oncogénico (6, 11, 42, 43 y 44). La prueba consiste en la producción de señales de luz, aproximadamente proporcionales a la cantidad de ADN de VPH presente en la muestra, lo cual permite un análisis semicuantitativo del número de copias de ADN viral. Este análisis representa un parámetro importante al momento del tratamiento, seguimiento de los pacientes y evaluación de las posibles vacunas contra la infección por VPH de alto y bajo riesgo oncogénico (Cavazza y Correnti, 2004).

## **II.- ANTECEDENTES**

La certeza de un diagnóstico se ha desarrollado en forma paralela a la sensibilidad y especificidad de las técnicas que la ciencia ha ido incorporando a medida que el conocimiento se ha hecho mayor. Y de esas técnicas las más recientes involucran al diagnóstico molecular (Bossio, 1993).

En diversos trabajos comparativos, los autores han calculado índices de validez de las pruebas diagnósticas. Estos índices permiten evaluar cuánto se aproxima una medida al valor real que pretende medir. La sensibilidad y la especificidad son los más comunes y Pita y Pértegas (2003), los definen como: la sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos.

En cuanto a la sensibilidad y la especificidad, Burgueño y col., (1995), destacan que siempre que una cuestión clínica y el resultado de la prueba diagnóstica encaminada a resolverla, puedan plantearse en términos de dicotomía (presencia o ausencia de enfermedad), la exactitud de la prueba puede definirse en función de su sensibilidad y especificidad diagnósticas. Sin embargo, con

mucha frecuencia los resultados de las pruebas diagnósticas están distribuidos en una escala continua, por lo que es necesario seleccionar un valor límite adecuado que permita resumir estos resultados en dos categorías: positivo y negativo.

Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del paciente con respecto a la enfermedad. Sin embargo, cuando a un paciente se le realiza alguna prueba, el médico carece de información *a priori* acerca de su verdadero diagnóstico, y más bien la pregunta se plantea en sentido contrario: ante un resultado positivo (negativo) en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo (sano)?. Por medio de los valores predictivos se complementa esta información (Pita y Pértegas, 2003). Así pues, se definen los valores predictivos como: el valor predictivo positivo es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos. El valor predictivo negativo es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba.

Además de la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos, existen otro índices de valoración que son útiles clínicamente y no dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población a estudiar. Estos índices son

denominados razón de verosimilitudes, razón de probabilidad, o cociente de probabilidades. Estos valores miden cuánto más probable es un resultado concreto (positivo o negativo) según la presencia o ausencia de enfermedad. La razón de verosimilitudes positiva o cociente de probabilidad positivo se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en los pacientes enfermos entre la probabilidad de un resultado positivo entre los sanos. Es, en definitiva, el cociente entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos (1-especificidad). La Razón de verosimilitudes negativa o cociente de probabilidades negativo se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado negativo en presencia de enfermedad entre la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la misma. Se calcula por lo tanto, como el cociente entre la fracción de falsos negativos (1-sensibilidad) y la fracción de verdaderos negativos (especificidad) (Pita y Pértegas, 2003).

La literatura consultada, reporta valores de sensibilidad y especificidad para RCP y CH2 entre el 70% y el 100% (Ordi 2005; Garcez y col., 2006; Qiao, (2008), Tsiodras y col., 2010 y Shim y col., 2010).

Desde que surgió el diagnóstico molecular, se han publicado una variedad de trabajos científicos, con la finalidad de comparar resultados obtenidos a través de la aplicación de diversas técnicas, las cuales han permitido un mejor diagnóstico de la infección por VPH y su posterior tipificación. Los estudios enfocados en la comparación de métodos son diversos y cada uno ha aportado diferentes conclusiones e información de interés científico y clínico. El constante

desarrollo de la tecnología, así como los avances en la biología molecular ha hecho indispensable el desarrollo de este tipo de investigaciones. A continuación se presentan algunas publicaciones internacionales enfocadas en la detección y tipificación de VPH empleando diversas metodologías.

En el año 1996, Melbye y col., realizaron un estudio en 151 mujeres de Dinamarca, con la finalidad de predecir anomalías citológicas anales y cervicales por medio de pruebas de diagnóstico para VPH. Los investigadores utilizaron RCP (con iniciadores de la región consenso del gen que codifica L1 de la cápside del virus) y la prueba de Captura de Híbridos de primera generación (CH), concluyendo que las enfermedades anales y cervicales están relacionadas significativamente con la presencia de VPH, y que el método CH necesitaba una carga viral más alta que la RCP para detectar la presencia de VPH.

Cañadas y col., en el año 2006 realizaron una evaluación de las técnicas de detección de VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino, empleando 166 muestras cervicales procedentes de mujeres atendidas en una clínica de dermatología en Oviedo (España). Estos investigadores utilizaron dos variantes de RCP, PCR- Enzyme Immunoassay (PCR-EIA) y PCR- Reverse Line Blot Hybridization (PCR- LBH) y la técnica CH2. Los tres métodos utilizados detectaron solo VPH de alto riesgo oncogénico y no encontraron diferencias significativas entre los mismos, lo que permitió concluir que, en virtud que las técnicas son comparables, su elección debe basarse en las condiciones individuales de cada laboratorio y el volumen de muestras por procesar.

En el año 2006, Garcez y col., realizaron un estudio con 70 mujeres que acudían a una consulta ginecológica privada en Brasil. Dichas mujeres, fueron sometidas a la detección de VPH por RCP, solo en los casos en los que, anteriormente se encontraron diferencias entre los resultados de CH y Pap. Cuando realizaron la comparación entre el Pap y los métodos de biología molecular, los autores reportaron que los resultados positivos para el Pap no indicaban necesariamente la presencia del virus; esta diferencia fue atribuida a que ambos métodos moleculares (RCP y CH) detectan la infección latente, mientras que el Pap solo detecta alteraciones celulares microscópicas.

Recientemente, Monsonogo y col., (2008), realizaron una comparación entre CH2 de sondas de VPH de alto riesgo y el estuche comercial de Roche Molecular Systems, denominado Linear Array HPV Genotyping Test (LA). Esta última es una técnica cualitativa, basada en RCP que detecta 37 tipos de VPH de bajo, intermedio y alto riesgo. Estos investigadores concluyeron que a pesar de la diferencia que existe entre estos dos métodos, en cuanto a la cobertura de tipos de VPH que detectan, ambos presentan alto grado de concordancia en los resultados.

Castle y col., en el año 2008 realizaron una comparación entre dos métodos basados en RCP para tipificación de VPH. El primer método (Innolipa-SPF10) consistió en la amplificación de una región de 65 pb del gen L1 de VPH y una posterior hibridación reversa de los amplicones. El segundo método utilizado fue el LA, el cual, a diferencia del primero, utiliza los iniciadores MY09 y MY11 para

amplificar una región de 450 pb de *L1* de VPH, y posteriormente aplican una hibridación reversa de los amplicones. Este estudio destacó la importancia de ambos métodos para medir el impacto de las vacunas en ensayos clínicos con los VPH de tipo 16 y 18.

En febrero de 2010, Tsiodras y col., publicaron un estudio en el cual comparan el método CH2 que detecta VPH de alto y bajo riesgo, y RCP utilizando los iniciadores GP5+/GP6+ del gen *L1* para el diagnóstico de VPH. Así mismo realizaron una asociación de estos resultados con el diagnóstico citológico e histológico. El estudio se llevó a cabo con 1270 mujeres de Grecia, y encontraron un alto porcentaje de muestras positivas para VPH mediante métodos moleculares, que según los diagnósticos citológicos e histológicos eran “normales”. Estos investigadores destacaron la importancia que tiene la correlación clínico-patológica con estas pruebas, para establecer mejores estrategias de evaluación y estratificación de la población de riesgo infectada por el virus.

En Venezuela, diversos trabajos se han enfocado en la detección de VPH en áreas genitales, así como la relación que existe entre los tipos virales y las lesiones de cuello uterino y vulva. Es importante destacar, que los estudios de comparación de métodos son muy escasos en nuestro país. A continuación se presentan algunos trabajos relevantes.

Mendoza y col., en el año 2000, realizaron una comparación entre la citología y el método CH para el diagnóstico de VPH. El estudio se llevó a cabo en 101 mujeres que acudieron a la consulta de ginecología de la Sociedad Anticancerosa de Mérida, Estado Mérida. Los investigadores obtuvieron 10 muestras positivas para el método CH, dos de las cuales presentaron diagnóstico citológico de LIEBg. Los casos restantes fueron descritos como “otras alteraciones”. Las citologías “normales” resultaron negativas por el mismo método. Los investigadores concluyeron que la citología de células cervicales es un método poco sensible para establecer diagnóstico de infección por VPH. Se recomendó el uso del método CH en mujeres con citología anormal y para confirmación de casos dudosos.

En los años 2001-2002, Correnti y col., estudiaron 1046 mujeres y reportaron infección por VPH en la zona Oriental (85%), en la zona Occidental (40%) y en el área metropolitana (67%). Así mismo, se observó una alta presencia de VPH de alto riesgo oncogénico (70%), asociados a lesiones de LIEBg y LIEAg. Un hallazgo importante en esta investigación, fue la observación de un 45% de muestras positivas para VPH de alto riesgo oncogénico y citología normal, siendo el genotipo de mayor circulación encontrado el tipo 16 (Correnti y col., 2002).

En el año 2002, se realizó un trabajo de investigación por parte de Correnti y col., en el cual se estudio un grupo de 120 pacientes con una edad promedio de 24 años, de servicios de salud privados con diagnósticos clínicos sugestivos de infección por VPH. Todas estas muestras fueron analizadas mediante RCP con los



iniciadores consenso MY09 y MY11 (gen *L1*). El 66.6% resultó positivo para la infección por VPH y la tipificación arrojó un 45% de muestras infectadas por VPH de alto riesgo oncogénico, 26.6% con infección mixta (alto y bajo riesgo) y 5% con VPH de bajo riesgo (Correnti y col., 2002).

En este mismo año (2002), el mismo grupo de investigación (Correnti y col.) publicó un trabajo realizado en colaboración con la Organización de Bienestar Estudiantil de la UCV (OBE – UCV), en el cual se estudió un grupo de 107 pacientes con una edad promedio de 25 años, con diagnósticos clínicos de lesiones sugestivas de infección por VPH y/o NIC I, II y III. El 60.75% resultó positivo para la presencia del genoma viral. En muestras de cérvix positivas para VPH, el 80.5% correspondió a alto riesgo oncogénico, mientras que el 2.5% fue de bajo riesgo oncogénico. En vulva, el 75% se relacionó con VPH de alto riesgo oncogénico, mientras que el 8.33% se relacionó con VPH de bajo riesgo. En relación al estudio histopatológico, los investigadores detectaron en cérvix un bajo porcentaje (1.43%) de pacientes con NIC III y un 28.57% con NIC I. Se apreció que las muestras cervicales de pacientes con diagnóstico de cambios sugestivos por VPH presentaron VPH de alto riesgo oncogénico en un 81%. Los resultados obtenidos en este estudio alertan, debido al alto porcentaje de jóvenes infectadas por VPH de alto riesgo y en su mayoría con lesiones de bajo grado, las cuales tienen alta probabilidad de evolucionar a lesiones de alto grado. Por este motivo, los autores indican que la observación y el seguimiento colposcópico y citológico debe ser más estricto; además destacan que se debe llamar la atención en los

servicios de salud venezolanos, para que empleen programas de educación sexual acordes con la realidad del país (Correnti y col., 2002).

Muñoz y col., en el año 2003 presentaron un trabajo cuyo objetivo principal fue conocer la frecuencia de los tipos de VPH 16 y 18 en mujeres venezolanas. Estudiaron 271 mujeres que acudieron a diversos centros asistenciales de la ciudad de Mérida. Obtuvieron muestras tanto endo como exocervicales, para la realización de citología y CH. El 12.54% de las muestras resultaron positivas para VPH por CH. El 88.24% correspondió a VPH de alto riesgo oncogénico (18 casos fueron VPH tipo 18, 9 casos fueron VPH 16, 1 caso presentó infección mixta y 2 no correspondieron a estos tipos). Los autores encontraron subjetividad en la citología y una elevada detección de VPH de alto riesgo (tipos 18 y 16), destacando la importancia de la detección a tiempo de estos tipos virales como parte de la prevención del cáncer uterino.

De Guglielmo y col., en el 2008, realizaron una evaluación mediante RCP, de la infección por VPH en 70 muestras de pacientes con diagnóstico clínico o citológico, recibidas en el Instituto de Oncología y Hematología – MPPS. De las muestras evaluadas por RCP con los iniciadores consenso MY09 y MY11 y por RCP múltiple, 31 resultaron positivas, de las cuales 29 correspondieron a VPH de bajo riesgo (tipos 6 y 11), 1 a una infección mixta de bajo y alto riesgo (tipos 6 y 33) y a otra con coinfección con virus de alto riesgo (tipos 18 y 33). Estos resultados obtenidos, resaltaron la utilidad de la RCP en el diagnóstico y tipificación de VPH, y pusieron en evidencia la relación, ya establecida, entre VPH

de bajo riesgo y displasias leves, así como la sobreestimación de infección por VPH en los diagnósticos de referencia.

Correnti y col., en el año 2010 publicaron un trabajo en el cual determinaron la presencia de VPH por medio del ensayo de CH2 en lesiones de cuello uterino en una población venezolana. Se analizaron 1483 muestras de citología cervical. La edad promedio de las mujeres estudiadas fue de 28,8 años. La positividad de la infección por VPH que detectaron por CH2 fue de 54,6% (811/1483). De los casos positivos, el 17% presentó ADN de VPH de bajo riesgo oncogénico y el 82,9% correspondió a VPH de alto riesgo. Además de este análisis, los investigadores también realizaron una correlación con el diagnóstico citológico de los pacientes. La presencia de VPH de bajo riesgo fue detectado en 127 casos de LIE Bg, 9 de LIE Ag y 2 de ASC-US, mientras que VPH de alto riesgo fue detectado en la mayoría de los casos: 361 de LIE Bg, 308 de LIE Ag y 4 de ASC-US. El estudio demostró una alta presencia de infección por genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico en la muestra de la población Venezolana estudiada.

### **III.- JUSTIFICACIÓN**

En Venezuela, el cáncer cérvicouterino es un problema de salud pública (Correnti y col., 2002). Actualmente el VPH está considerado como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo, con un 60% de probabilidad de transmisión del VPH tipo 16 de alto riesgo oncogénico por hombres y mujeres (Rosenblatt y De Campos, 2009). Debido a la gran cantidad de personas infectadas por este virus en el mundo y su relación con el cáncer, la comunidad científica se ha interesado en el estudio y análisis de su genoma, así como en las técnicas moleculares para su diagnóstico y detección.

Considerando que en Venezuela el cáncer cérvicouterino es la primera causa de muerte oncológica en la mujer, así como el reciente desarrollo de vacunas preventivas para los tipos virales más comunes, son de mucha importancia los estudios que contribuyan a mejorar el diagnóstico de esta enfermedad y a conocer los tipos de VPH más comunes que se encuentran circulando en la población.

Además, la detección temprana de una infección por VPH de alto riesgo en jóvenes es importante para su seguimiento y tratamiento, ya que la diferencia en el riesgo para la progresión a carcinoma cervical radica en la persistencia de la infección y, por ende, en la integración del ADN viral al de la célula huésped, eventos asociados a VPH de alto riesgo oncogénico (Grillo y col., 2008).

El diagnóstico de VPH mediante biología molecular, no se realiza de rutina en los centros de salud del país, debido al costo de las pruebas y a que es necesario contar con un laboratorio especializado y con personal calificado. El Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología del Ministerio del Poder Popular para la Salud (IOH - MPPS), es un centro de referencia para este tipo de diagnóstico, de manera que los médicos puedan contar con el diagnóstico molecular en combinación con el diagnóstico clínico y/o histológico, lo que permite realizar una mejor o más completa evaluación de los pacientes, incluyendo la estratificación de la población de riesgo y la progresión de las lesiones. Además, los resultados de los estudios comparativos de técnicas moleculares para la detección y tipificación de VPH aportan a este tipo de laboratorios, las bases para la selección y establecimiento de futuros programas de cribado exitosos, que ayuden a evitar el cáncer de cuello uterino.

Como lo afirman Pita y Pértegas (2003), es fundamental saber calcular la validez y seguridad de las diferentes técnicas o pruebas diagnósticas con el fin de seleccionar la más adecuada para un estudio particular. La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos son los criterios tradicionalmente utilizados para valorar la capacidad predictiva de una prueba. Los estudios de evaluación de pruebas diagnósticas son el instrumento adecuado para obtener esta información. No obstante, no se debe olvidar que existen determinados aspectos en el diseño de este tipo de investigaciones que pueden afectar la precisión y la validez de las estimaciones realizadas. La población de estudio, la estrategia de muestreo y la

forma de aplicación de las pruebas diagnósticas son algunos de los elementos a cuidar para evitar la presencia de sesgos.

## **IV.- OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

- Comparar dos metodologías (Captura de Híbridos II y RCP), empleadas para la detección y tipificación de VPH en áreas genitales de jóvenes con diagnóstico clínico y citológico de infección por el virus, que acuden a la consulta de ginecología de la Organización de Bienestar Estudiantil de la Universidad Central de Venezuela (OBE-UCV).

### **Objetivos específicos:**

- Detectar la presencia del genoma de VPH mediante RCP en muestras de áreas genitales de jóvenes.
- Realizar la tipificación de VPH en muestras citológicas genitales empleando el estuche comercial RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening (Seegene Inc.).
- Evaluar muestras citológicas genitales mediante el método de captura de híbridos II (Digene Corporation).
- Comparar los resultados obtenidos en la evaluación de las muestras mediante los métodos mencionados, a través de pruebas estadísticas.
- Comparar los resultados obtenidos en la evaluación molecular con el diagnóstico citológico de las muestras.

## **V.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1.- MATERIAL BIOLÓGICO:**

Se estudiaron 80 muestras citológicas de jóvenes con diagnóstico clínico sugestivo de infección por VPH, tomadas en distintas regiones anatómicas (cuello uterino y vulva), las cuales acudieron a la consulta de ginecología de la Organización de Bienestar Estudiantil de la Universidad Central de Venezuela (OBE-UCV). Como controles se utilizaron 20 muestras de pacientes sin antecedentes de infección por VPH que acudieron a la consulta.

Las muestras fueron recolectadas por el médico especialista con el cepillo DNA with PAP de Digene Corporation, Gaithersburg, MD. Este cepillo contiene 1 ml de medio de transporte.

Cada paciente aceptó incluir su muestra en el estudio, por medio de un consentimiento informado (ver Anexo 1); además llenaron una encuesta que le otorgó a la investigación datos demográficos y clínicos de interés (ver Anexo 2).

### **5.2.- MÉTODOS:**

Para el procesamiento de las muestras citológicas se llevaron a cabo los siguientes protocolos:



### **5.2.1.- Extracción de ADN:**

La extracción de ADN genómico total se llevó a cabo con solventes orgánicos. Este método incluyó: lisis celular, extracción cloroformo- fenol y precipitación con etanol.

Se incubaron las muestras citológicas en 100 µl de proteinasa K (1000 µg/ml) y 100 µl de buffer de lisis (10Mm de Tris HCl, pH: 8 + 0.1 % de sarcosina) a 55 °C, durante 3 horas.

Para la extracción, se agregó igual volumen de cloroformo-fenol-isoamílico (200 µl) y se aplicó vortex durante 20 segundos aproximadamente. Luego se realizó una centrifugación a 14.000xg durante 10 minutos. Posteriormente, se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo eppendorf limpio, para agregar igual volumen de cloroformo (200 µl), se aplicó vortex y se centrifugó a 14.000xg durante 5 minutos. Se tomó la fase acuosa nuevamente, para ser transferida a otro tubo eppendorf y precipitar el ADN agregando 1/10 volumen de acetato de amonio 3M y un volumen doble de etanol absoluto frío, dejándose a -20 °C al menos por 1 hora. Luego se aplicó una centrifugación durante 15 min. a 14.000xg y se descartó el sobrenadante para luego agregar 500 µl de etanol al 75% y centrifugar a 14.000xg durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos en posición invertida a 37 °C, para eliminar el líquido restante. Finalmente, se resuspendió el ADN en 50 µl de H<sub>2</sub>O estéril libre de nucleasas.

**5.2.2.- RCP con los iniciadores genéricos (MY09 y MY11) de VPH y los iniciadores PC04 y GH20 de la la  $\beta$ -globina:**

Para la comprobación de la integridad del ADN extraído y la detección de VPH mediante RCP, se utilizaron los iniciadores genéricos MY09 (5` CGT CCA AGA GGA TAC TGA TC 3`) y MY11 (5` GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG 3`) (ver tabla 2), que reconocen la región consenso L1 del genoma viral para obtener un producto de amplificación de 450 pb. Esta RCP utiliza también los iniciadores PC04 (5` CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3`) y GH20 (5` GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3`) (ver tabla 2) para amplificar un fragmento del gen humano de la  $\beta$ -globina como control interno de la integridad y calidad del ADN y ausencia de inhibidores de la RCP, con los que se obtiene un producto de 268 pb.

**Tabla 2: Reactivos y cantidades utilizadas en la RCP con los iniciadores consenso MY09 y MY11.**

Reactivos	Cantidad por tubo ( $\mu$ l)
dNTPs [100 mM ]	0.4
MY09 [100 mM ]	0.2
MY11[100 mM ]	0.2
PC04 [100 mM ]	0.2
GH20 [100 mM ]	0.2
Buffer 10X	6.3
MgCl <sub>2</sub> [50 mM ]	4
Taq polimerasa	0.5
H <sub>2</sub> O	28
Muestra	10

Volumen total= 50  $\mu$ l por tubo.

Los productos obtenidos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, tratado con Bromuro de Etidio, para luego ser observados en un transiluminador. La reacción de RCP se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf, Modelo: AG22331) siguiendo el siguiente programa:

- Temperatura inicial de desnaturalización: 94°C por 4 minutos.
  - Temperatura de desnaturalización: 94°C por 15 segundos.
  - Temperatura de alineamiento: 50°C por 30 segundos.
  - Temperatura de extensión: 72°C por 45 segundos.
  - Temperatura de extensión final: 72°C por 7 minutos.
- } X 40 ciclos

### **5.2.3.- Detección y tipificación de VPH por RCP (Seeplex® HPV4A ACE Sreening) y Captura de híbridos 2 (HC2 HPV DNA test)**

#### **5.2.3.1. - RCP (Seeplex HPV4A ACE Sreening):**

La detección y tipificación viral por medio de Seeplex® HPV4A ACE Sreening de Seegene Inc., se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Este estuche comercial consta de los reactivos presentados en la tabla 3 y permitió la identificación de diversos tipos de VPH tanto de alto como de bajo riesgo (Tabla 4).

**Tabla 3: Reactivos que contiene el estuche comercial Seeplex® HPV4A ACE Sreening.**

<b>Reactivos</b>	<b>Descripción</b>
Iniciadores (5x HPV4A ACE PM)	Contiene iniciadores para VPH y para el control interno.
Premix (2X Multiplex Master Mix)	Contiene ADN polimerasa, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y MgCl <sub>2</sub> .
Solución MOP (8-MOP solution)	Solución para prevenir contaminación.
Marcador (HPV4A ACE Marker)	Es utilizado para identificar el tamaño aproximado del amplificado en gel de agarosa.
Control +	Mezcla de clones de 4 tipos de VPH
Control -	Agua esterilizada

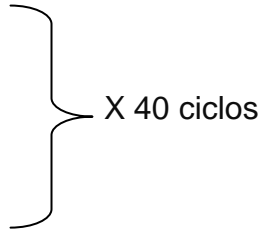
**Tabla 4: Genotipos de VPH amplificados por Seeplex® HPV4A ACE Sreening y tamaño en pb.**

<b>Genotipo</b>	<b>Tamaño del amplicon (pb)</b>
Control interno	1000
VPH-16	588
AR*	465
VPH-6/11	302
VPH-18	230

**AR\*: Tipos de alto riesgo (26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82).**

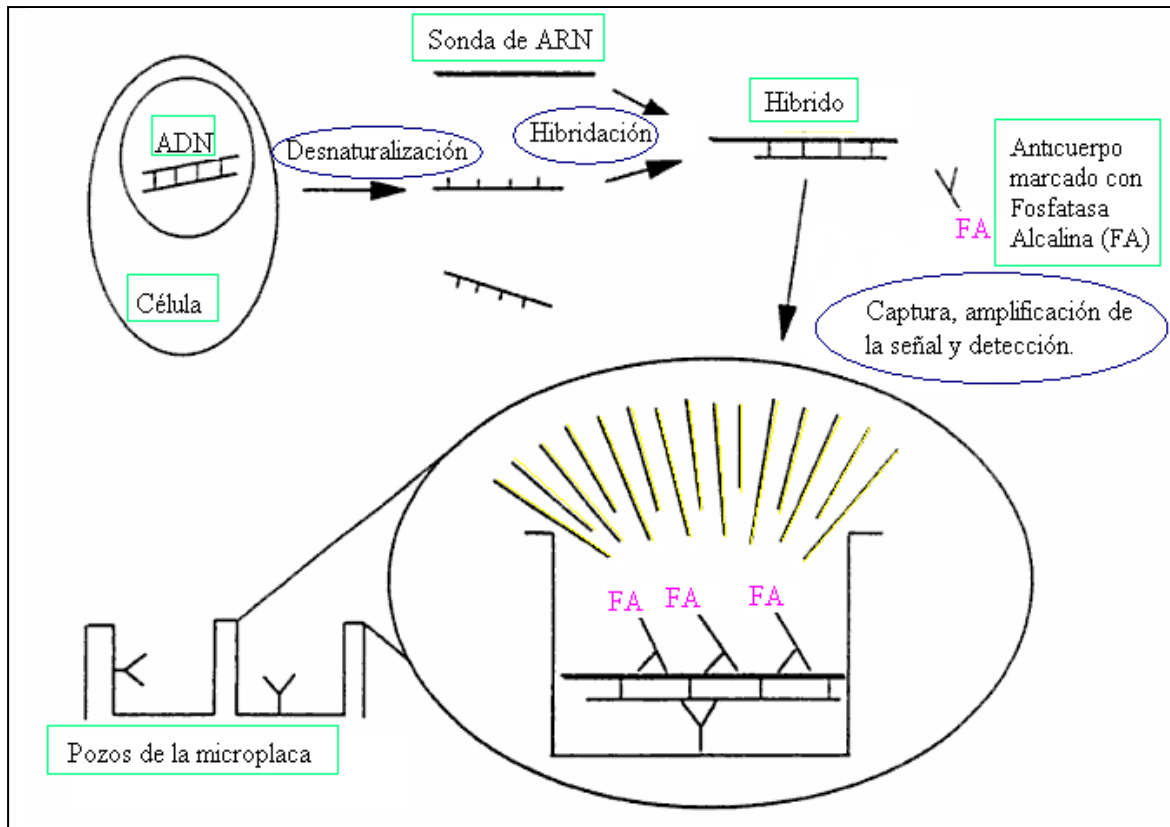
La mezcla de reacción se preparó con 4 µl de iniciadores, 3 µl de la solución MOP, 10 µl de Premix y 8 µl de la muestra. Los productos obtenidos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, tratado con Bromuro de Etidio, para luego ser observados en un

transiluminador. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf, Modelo: AG22331) siguiendo el siguiente programa:

- Temperatura inicial de desnaturalización: 94 °C por 15 minutos.
  - Temperatura de desnaturalización: 94 °C por 0.5 minutos.
  - Temperatura de alineamiento: 60 °C por 1.5 minutos
  - Temperatura de extensión: 72 °C por 1.5 minutos
  - Temperatura de extensión final: 72 °C por 10 minutos.
- 

#### **5.2.3.2.- Captura de híbridos 2:**

La prueba CH2 (HC2 HPV DNA test de Digene Corporation, Gaithersburg-USA), es un ensayo de amplificación de señal, que utiliza una combinación de captura de anticuerpos con la detección de señal por quimioluminiscencia (Figura 8). CH2 emplea un coctel de sondas de ARN (sondas del genoma completo), que detecta 13 tipos de VPH de alto riesgo oncogénico (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) y 5 de bajo riesgo (6/11/42/43/44), las cuales se unen al ADN de interés presente en la muestra en estudio. Los híbridos de ARN:ADN son retenidos en una fase sólida recubierta con anticuerpos de captura universales y específicos para dichos híbridos, los cuales son detectados con múltiples anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina. La señal resultante de la reacción de quimioluminiscencia es leída y los resultados son interpretados (Tsiodras y col., 2010).



**Figura 8:** Proceso de detección de VPH mediante el uso de la prueba CH2. En primer lugar ocurre la desnaturalización, luego la hibridación con sondas de ARN específicas para VHP, dichos híbridos serán capturados por anticuerpos específicos en los pozos de la microplaca. El revelado ocurre con anticuerpos anti-híbrido, marcados con fosfatasa alcalina. Por último, se lee la señal quimioluminiscente de manera automatizada y se interpretan los resultados. Tomado y modificado de Francois, 1998.

La prueba CH2 incluye: diluyente de sonda, sonda de VPH de bajo riesgo, sonda de VPH de alto riesgo, controles de calidad, calibrador negativo, calibrador de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico, microplaca de captura, reactivos y buffers.

Para la aplicación de este ensayo se llevó a cabo el siguiente procedimiento establecido por el fabricante:

1.-Etapa de desnaturalización: En esta etapa se agregó el reactivo de desnaturalización (diluido en hidróxido de sodio) a los calibradores, controles de calidad y muestras citológicas, de acuerdo a las cantidades descritas en la tabla 5.

**Tabla 5: Cantidades de reactivo de desnaturalización agregadas a los calibradores, controles y muestras.**

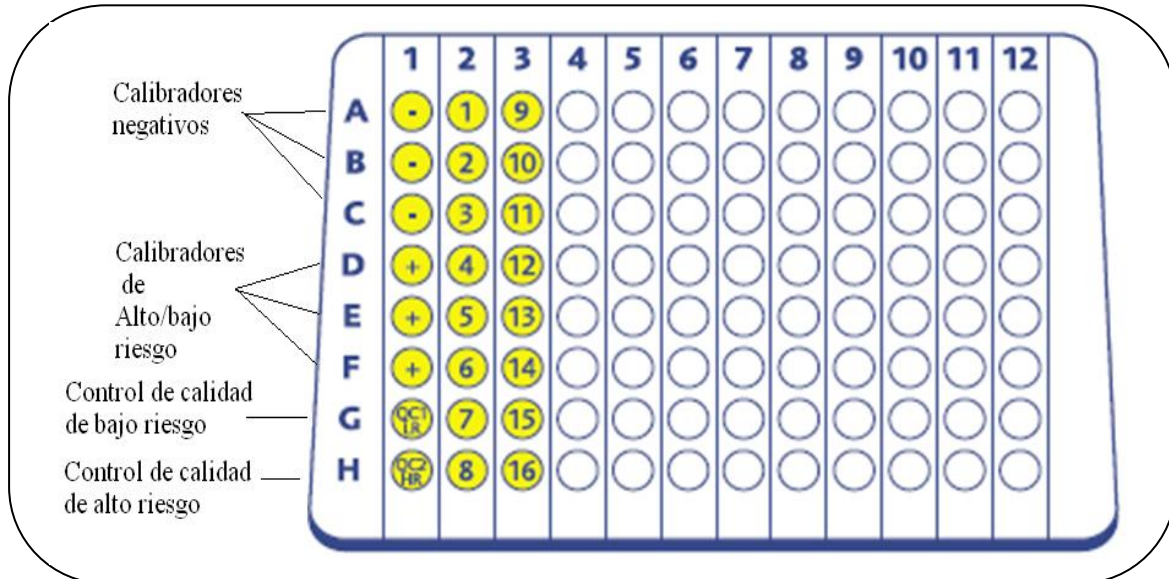
<b>Reactivos y muestra</b>	<b>Cantidad</b>
Calibrador Negativo	1000 µl
Calibrador de Bajo Riesgo	500 µl
Calibrador de Alto Riesgo	500 µl
Control Calidad de Bajo Riesgo	500 µl
Control de Calidad de Alto Riesgo	500 µl
Muestra	500 µl

Se aplicó vórtex a cada tubo durante 5 segundos y se incubaron a 65 °C durante 45 minutos.

En el período de incubación se prepararon las sondas de alto y bajo riesgo oncogénico. Así mismo, es importante destacar que el control de calidad de bajo riesgo contiene 5 pg/ml (500.000 copias/ml) de clones de ADN de VPH 6 y el control de calidad de alto riesgo contiene 5 pg/ml (500.000 copias/ml) de clones de ADN de VPH 16.

2.-Etapa de hibridación: Una vez desnaturalizadas las muestras, se colocaron 75 µl de los calibradores, los controles de calidad y las muestras en estudio dentro de los pozos de la microplaca (Figura 9). Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se añadieron 25 µl de la sonda, incubándose nuevamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se colocó la placa

en un agitador rotatorio a 1100 rpm durante 3 minutos; por último se incubó a 65°C durante 1 hora.



**Figura 9:** Representación de la placa de CH2. En los pozos A1, B1 y C1 así como los pozos A7, B7 y C7 se coloca el calibrador negativo. En los pozos D1, E1 y F1 se coloca el calibrador de bajo riesgo y en los pozos D7, E7 y F7 el calibrador de alto riesgo. Por último los controles de calidad de bajo y alto riesgo se colocan en los pozos G1/H1 y G7/H7 respectivamente. En el resto de los pozos se colocan las 40 muestras por duplicado (lado de bajo riesgo y lado de alto riesgo).

3.- Etapa de captura de híbridos: Se transfirió el contenido de cada uno de los pozos de la microplaca de hibridación (aproximadamente 100 µl) a la microplaca de captura, utilizando una pipeta multicanal. Luego se colocó en el agitador rotatorio a 1100 rpm durante 60 minutos.

Durante este tiempo, se preparó el buffer de lavado colocando 33,3 ml de este para un volumen final de 1 L. Cuando la captura se completó, se eliminó el líquido de la microplaca.



4.-Detección de híbridos: Se agregaron 75 µl del Reactivo de Detección 1 (Fosfatasa alcalina) en el interior de cada pozo de la y se incubó a temperatura ambiente durante 30-45 minutos.

5.- Lavado de la microplaca: Se removió el Reactivo de Detección 1 y se realizaron 6 lavados consecutivos con el buffer de lavado.

6.- Etapa de amplificación de la señal: Se colocaron 75 µl del Reactivo de Detección 2 (CDP-Star con Emerald II, sustrato quimioluminiscente) dentro de cada uno de los pozos de la microplaca. Todos los pozos se observaron de color amarillo en esta etapa. Se incubó a temperatura ambiente durante 15- 30 minutos. La microplaca se leyó en un luminómetro (Hybrid Capture System de Digene, modelo: DML 2000).

### **Interpretación de resultados:**

Luego de que el sustrato reaccionó con la fosfatasa alcalina unida a los híbridos emitiendo luz, se procedió a realizar la lectura de la placa y a interpretar los resultados.

La intensidad de la luz emitida es medida en unidades relativas de luz (URL) y denota la presencia o ausencia de ADN de VPH de bajo y alto riesgo en las muestras. El parámetro empleado como calibrador positivo de bajo y alto

riesgo, es una solución con 1pg/ml de ADN de VPH de BR (tipo 11) y AR (tipo 16) respectivamente.

Tomando en cuenta los calibradores de alto y bajo riesgo se calculó el Cut Off (CO), o el promedio de los 3 valores. Al obtener el CO, se calculó el cociente URL/CO y se toma como positivas aquellas muestras cuyo valor URL/CO fue mayor a 1.

### **Carga viral:**

El cociente URL/CO ha sido utilizado por muchos investigadores para medir semicuantitativamente la carga viral y así verificar si existe o no relación con este parámetro y la progresión de las lesiones causadas por los tipos de VPH.

En el presente trabajo de investigación se tomó en cuenta la relación 1pg/ml=1 URL (de los calibradores de bajo y alto riesgo) y se utilizó y modificó la clasificación descrita recientemente por Hwang y col. (2010), para determinar la carga viral de la siguiente manera:

- Carga viral MUY BAJA  $1 \leq \text{URL/CO} \leq 2.5$
- Carga viral BAJA  $2.5 < \text{URL/CO} < 100$
- Carga viral MEDIA O INTERMEDIA  $100 \leq \text{URL/CO} < 500$
- Carga viral ALTA  $\text{URL/CO} \geq 500$

Siguiendo esta clasificación, se registraron las cargas virales obtenidas en cada muestra positiva del método CH2.

#### **5.2.4.- Análisis de resultados:**

Los resultados obtenidos de la RCP con el estuche Seeplex HPV4A ACE Screening y de la CH2, fueron valorados y medidos por medio de los índices de validez tomados de Pita y Pértegas (2003).

Para el cálculo de estos índices, se utilizaron las siguientes fórmulas:

#### **Fórmula 1.- Sensibilidad:**

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN}$$

Donde:

VP= Verdaderos positivos.

FN= Falsos negativos.

#### **Fórmula 2.- Especificidad:**

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

Donde:

VN: Verdaderos negativos.

FP: Falsos positivos.

**Fórmula 3.- Valor predictivo positivo:**

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

Donde:

VPP: Valor predictivo positivo.

VP: Verdaderos positivos.

FP: Falsos positivos.

**Fórmula 4.- Valor predictivo negativo:**

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

Donde:

VPN: Valor predictivo negativo.

VN: Verdaderos negativos.

FN: Falsos negativos.

**Fórmula 5.- Razón de verosimilitudes positiva (RV+):**

$$RV+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}}$$

**Fórmula 6.- Razón de verosimilitudes negativa (RV-):**

$$RV- = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

**Análisis estadístico:**

Para realizar el análisis estadístico entre los métodos evaluados se utilizó la prueba de independencia Chi-cuadrado ( $X^2$ ) y el índice de concordancia Kappa. Estas pruebas permitieron evaluar la relación entre las variables.

El cálculo de Chi-cuadrado y del índice de kappa se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS Statistic versión 17.0.

## VI.- RESULTADOS

### 6.1.- CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS MUESTRAS Y CONTROLES.

Las 80 muestras fueron tomadas de pacientes jóvenes con diagnóstico clínico (colposcópico, citológico e histológico) sugestivo de infección por VPH y los 20 controles correspondieron a pacientes sin diagnóstico sugestivo de infección por VPH. Las pacientes acudieron a la consulta de ginecología en OBE-UCV. Todas las muestras y controles fueron tomadas en mujeres.

Las pacientes de las cuales se tomaron las 80 muestras se ubicaron en un promedio de edad de  $24,78 \pm 5,27$  años; y las pacientes del grupo control de  $21,30 \pm 3,96$  años (Tabla 6).

**Tabla 6:** Características principales de las muestras y controles.

	<b>Muestras</b>	<b>Controles</b>
<b>N=100</b>	80	20
<b>Edad promedio</b>	$24,78 \pm 5,27$	$21,30 \pm 3,96$
<b>Localización</b>	Cuello Uterino 73,75% (59/80) Vulva 25% (20/80) Vagina 1,25% (1/80)	Cuello uterino 95% (19/20) Vulva 5% (1/20)

Tanto las muestras como los controles fueron tomados en su mayoría en el cuello uterino (73,75% y 95%, respectivamente).

En cuanto al diagnóstico clínico, se observó que las pacientes con NIC I y con antecedentes de infección por VPH representaron el 26%, respectivamente. Las muestras con condilomatosis vulvar representaron el 12%, con NIC I y NIV I-II el 5%, con NIC I y condilomatosis vulvar el 4%, con NIV I 3%, con colposcopia atípica 2% y con NIC II y NIV I más condilomatosis vulvar el 1%. Los controles, en su totalidad, presentaron un diagnóstico clínico normal (Tabla 7).

**Tabla 7: Diagnóstico clínico de muestras y controles.**

Diagnóstico clínico	Normal	NIC I	NIC II	NIV I	CA	CV	NIC I+ NIV I-II	NIC I + CV	NIV I + CV	A
Porcentaje en muestras y controles (n=100)	20%	26%	1%	3%	2%	12%	5%	4%	1%	26%

CA= Colposcopia atípica.

CV= Condilomatosis vulvar.

A= Antecedentes de infección por VPH.

## **6.2.- COMPROBACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN.**

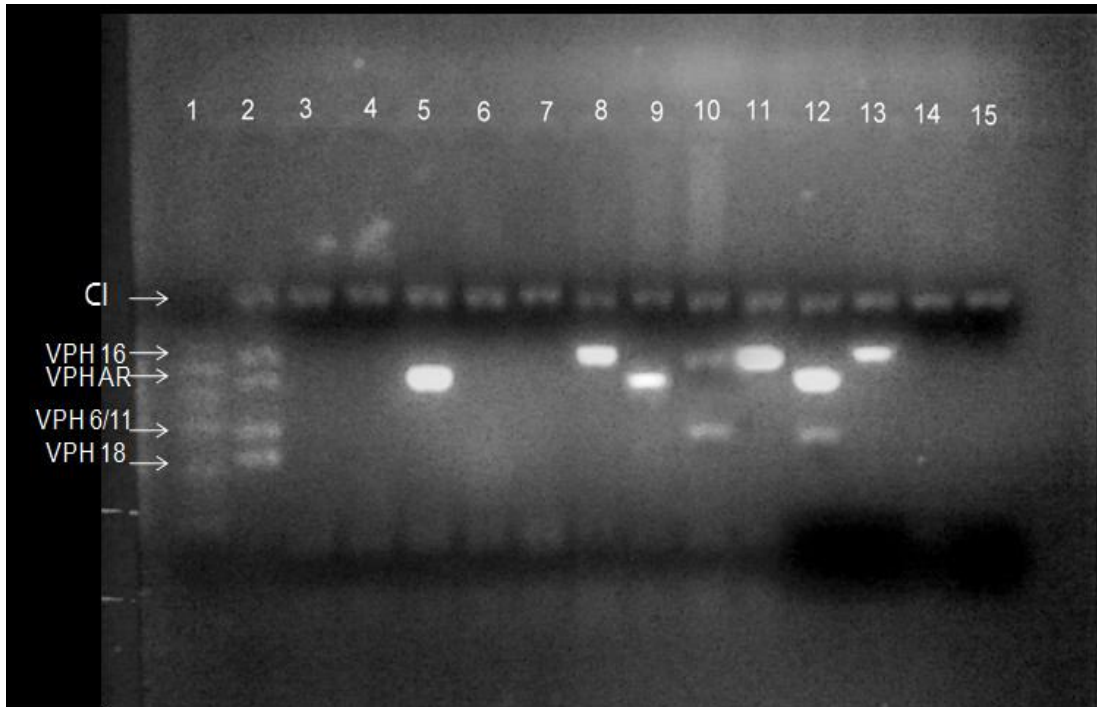
La RCP con los iniciadores genéricos MY09 y MY1, que reconocen la región consenso L1 del genoma viral, y con los iniciadores PC04 y GH20, que amplifican un fragmento del gen humano de la  $\beta$ -globina, determinó que, las 80

muestras y los 20 controles presentaron la banda de 268 pb de la  $\beta$ -globina. Esto indicó que, el 100% de las muestras y controles presentaron una cantidad y calidad adecuada del ADN a ser utilizado, posteriormente, para la comparación de las técnicas seleccionadas.

### **6.3.- DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH POR RCP (SEEPLEX® HPV4A ACE SREENING)**

La Figura 10 representa la detección y tipificación de VPH por medio de RCP Seeplex ® HPV4A ACE Sreening. Se pueden observar las bandas de ADN de los diferentes tipos de VPH. Todas las muestras presentan la banda de 1000 pb del control interno de la RCP. Las muestras localizadas en las líneas 3, 4, 6, 7 y 14 son negativas para VPH. Las líneas 5 y 9 contienen muestras positivas para VPH-AR (26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82.), siendo representado por una banda de 465 pb. Las líneas 8, 11 y 13 también contienen muestras positivas para VPH de alto riesgo, pero en este caso tipo 16 (588 pb). La muestra de la línea 10 es positiva para VPH, presentando una infección mixta (I.M) de los tipos 16 y 6/11 de alto y bajo riesgo respectivamente; de igual manera, la muestra de la línea 12 presenta una I.M de VPH-AR y de bajo riesgo 6/11. Por último, la línea 15 representa el control negativo.

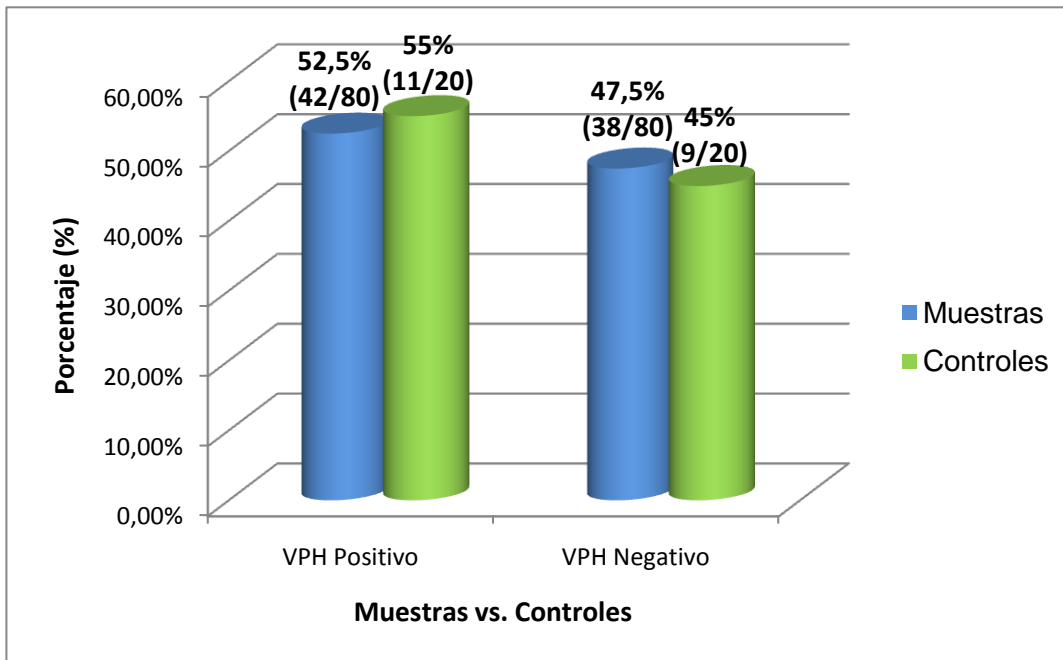




**Figura 10: Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa para la detección y tipificación de VPH por medio de Seeplex® HPV4A ACE Sreening.**

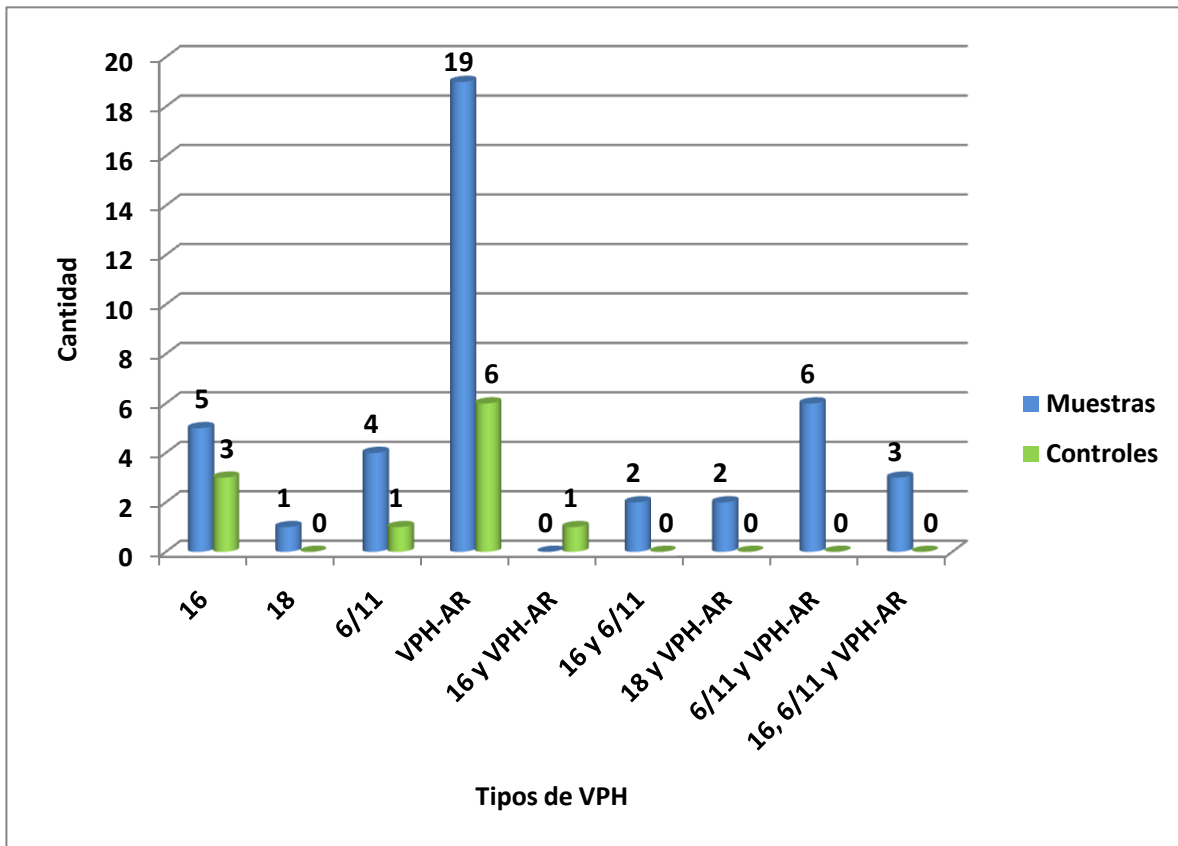
Línea 1: Marcador de peso molecular (1000 pb), Línea 2: control positivo de HPV4A, Líneas 3, 4, 6, 7 y 14: muestras negativas para VPH, Línea 5: muestra positiva para VPH-AR (465 pb), Línea 8: muestra positiva para VPH tipo 16 (588 pb), Línea 9: muestra positiva para VPH-AR, Línea 10: muestra positiva para VPH tipos 16 y 6/11 (302 pb), Línea 11: muestra positiva para VPH tipo 16, Línea 12: muestra positiva para VPH-AR y 6/11, Línea 13: muestra positiva para VPH tipo 16 y Línea 15: control negativo. Todas las muestras y controles presentan la banda de 1000 pb del control interno de la RCP.

El genoma de VPH fue detectado en el 52,5% (42/80) de las muestras y el 55% (11/20) de los controles por medio de la RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening (Figura 11). Es importante destacar, que el 100% de muestras y controles presentaron la banda de 1000 pb del control interno de la RCP.



**Figura 11:** Distribución de la infección por VPH en las muestras y controles detectada por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening.

De las 42 muestras positivas para VPH por RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening, 27 pacientes (64,3%) presentaron infección por VPH de alto riesgo oncogénico, en 11 (26,2%) se detectó infección mixta con virus de alto y bajo riesgo oncogénicos y en 4 (9.5%) pacientes se observó VPH de bajo riesgo oncogénico (Figura 12).



**Figura 12: Tipificación de VPH en las muestras y controles positivos por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening.**

VPH-AR: 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82.

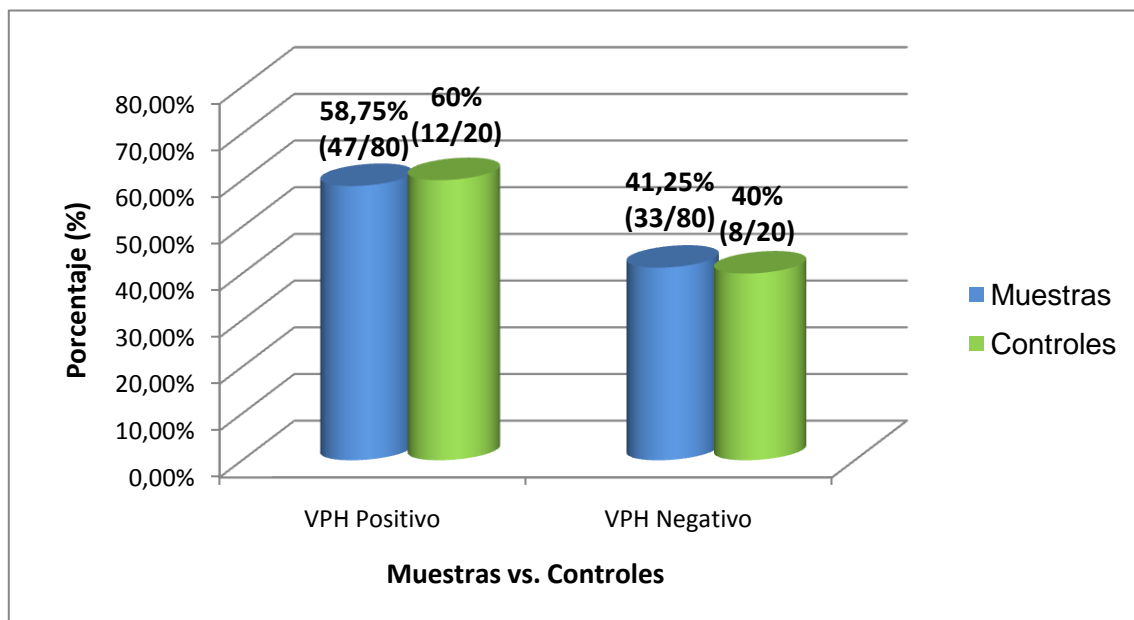
En la Figura 12, también se puede observar que 5 pacientes tienen infección simple con el tipo 16 de alto riesgo oncogénico, 3 poseen infección mixta y coinfección del genotipo 16, con VPH-AR y 6/11 de bajo riesgo oncogénico; mientras que sólo 2 casos presentaron infección mixta de VPH tipo 16 de alto riesgo oncogénico con VPH 6/11 de bajo riesgo oncogénico.

La tipificación de los 11 controles positivos para VPH, resultó de la siguiente manera: 6 controles (54,54%) con la presencia del genoma viral de VPH-AR, 3 (27,27%) con infección simple por VPH de alto riesgo tipo 16, un control (9,09%)

con VPH de bajo riesgo tipo 6/11 y un caso (9,09%) con coinfección de VPH tipos 16 y VPH-AR (Figura 12).

Es importante destacar, que en el 23,8% (10/42) de las muestras positivas por RCP, se detectó VPH de alto riesgo oncogénico tipo 16 y en los controles, este genotipo se detectó en el 36,4% (4/11) de las muestras; de este modo, el genotipo 16 ocupa el segundo lugar de incidencia luego del VPH-AR en los controles.

#### 6.4.- DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH POR CH2 (HC2 HPV DNA TEST)

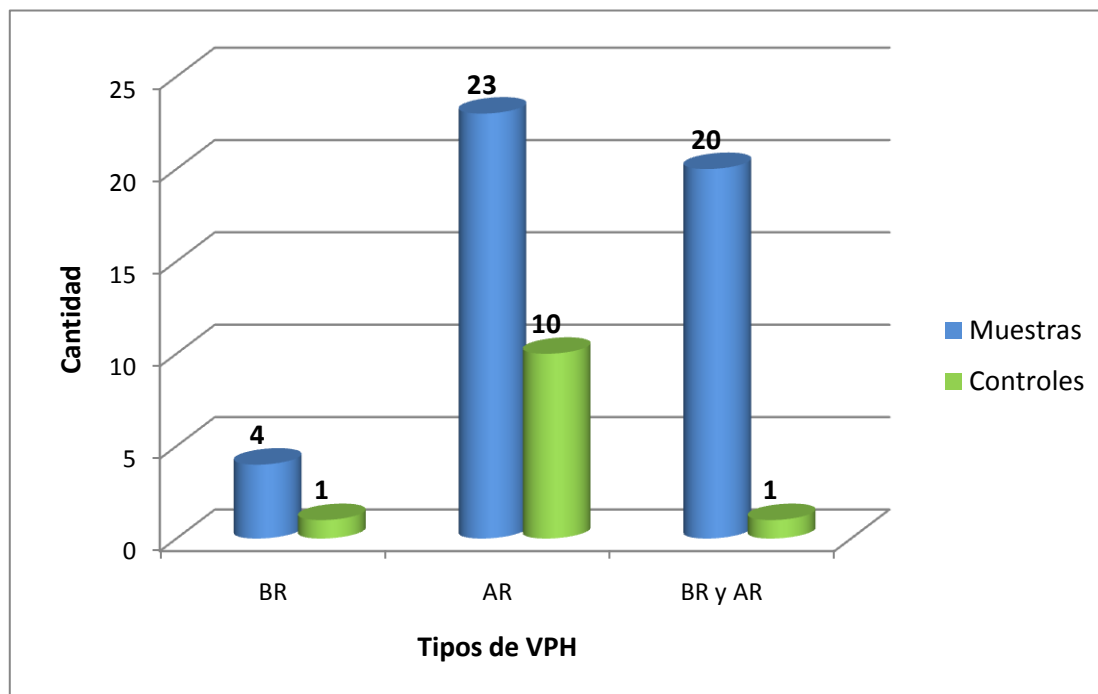


**Figura 13:** Distribución de la infección por VPH en las muestras y controles detectada por medio de CH2 (HC2 HPV DNA test).

El genoma de VPH fue detectado en el 58,75% (47/80) de las muestras y el 60% (12/20) de los controles por medio de CH2 (Figura 13).

De las 47 muestras positivas para VPH por CH2, 23 muestras (48,94%) resultaron infectadas por VPH de alto riesgo, 20 muestras (42,55%) presentaron infección mixta por VPH de bajo riesgo y alto riesgo y 4 muestras (8,51%) registraron el genoma viral de VPH de bajo riesgo (Figura 14).

Los 12 controles positivos para VPH fueron tipificados de la siguiente manera: 10 controles (83,33%) infectados por VPH de alto riesgo, 1 control (8,33%) infectado por VPH de bajo riesgo y 1 control (8,33%) infectado por VPH de alto y bajo riesgo (Figura 14).



**Figura 14:** Tipificación de VPH en las muestras y controles positivos por medio de CH2 (HC2 HPV DNA test).

AR: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

BR: 6, 11, 42, 43 y 44.

**6.5.- RESULTADOS COMPARATIVOS Y ESTADÍSTICOS ENTRE RCP SEEPLEX® HPV4A ACE SREENING Y CH2 (HC2 HPV DNA TEST)**

Los métodos RCP y CH2 tipifican un rango amplio de VPH. Las tablas 8 y 9 representan de manera comparativa estos tipos. La RCP detecta los 2 tipos de VPH de bajo riesgo más comunes en el mundo (6 y 11), a diferencia del método CH2 que detecta 5 tipos de bajo riesgo, dentro de los cuales están los dos más comunes en el mundo y los tipos 42, 43 y 44 (Tabla 8).

La RCP amplifica el ADN de 18 tipos de VPH de alto riesgo, mientras que la CH2 detecta 13 tipos de alto riesgo. Los tipos 26, 53, 66, 73 y 82 no están incluidos en la CH2.

**Tabla 8: Tipos de VPH de bajo riesgo detectados por los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).**

Método	Tipo de VPH				
	Bajo riesgo				
	6	11	42	43	44
<b>RCP</b>	x	x			
<b>CH2</b>	x	x	X	x	x

**Tabla 9: Tipos de VPH de alto riesgo detectados por los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).**

Método	Tipo de VPH																	
	Alto riesgo																	
	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	66	68	73	82
<b>RCP</b>	X	X	X	X	x	x	x	X	X	x	x	x	x	x	x	X	x	
<b>CH2</b>	X	X		X	X	x	x	X	X	x		x	x	x		x		

**Tabla 10:** Comparación entre los tipos de infección por VPH (infección mixta y alto y bajo riesgo), detectados por los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 en muestras y controles.

	Tipo de infección por VPH	RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening	CH2
<b>Muestras</b>	<b>AR</b>	64,3% (27/42)	48,9% (23/47)
	<b>IM</b>	26,2% (11/42)	42,6% (20/47)
	<b>BR</b>	9,5% (4/42)	8,5% (4/47)
<b>Controles</b>	<b>AR</b>	90,9% (10/11)	83,3% (10/12)
	<b>IM</b>	0% (0/11)	8,3% (1/12)
	<b>BR</b>	9,1% (1/11)	8,3% (1/12)

AR= Alto Riesgo.  
IM= Infección Mixta.  
BR= Bajo Riesgo.

La tabla 10 representa la comparación entre las dos técnicas, RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2, en cuanto a los tipos de infección por VPH en las muestras y controles. En las muestras positivas, tanto por RCP como por CH2, se obtuvo un 64,3% (27/42) y un 48,9% (23/47) de infección por VPH de alto riesgo oncogénico, respectivamente. En los controles, el mayor porcentaje de positividad, también se obtuvo para VPH de alto riesgo oncogénico con un 90,9% (4/42) para RCP y un 83,3% (10/12) para CH2. La RCP detectó un 26,2% (11/42) de infección mixta en las muestras y la CH2 un 42,6% (20/47). En los controles se observó una disminución en las infecciones mixtas, con un 0% por RCP y un 8,3%

por CH2. Los tipos de VPH de bajo riesgo, se detectaron entre un 8,3% y un 9,5% tanto en muestras como en controles por ambos métodos.

**Tabla 11:** Comparación entre las muestras y controles positivas para VPH, por medio de los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2, con el diagnóstico clínico.

		Diagnóstico Clínico									
		Normal	NIC I	NIC II	NIV I	CA	CV	NIC I+ NIV I-II	NIC I + CV	NIV I + CV	A
Métodos	RCP (VPH +)	55% (11/20)	88,5% (23/26)	100% (1/1)	100% (3/3)	0% (0/2)	41,6% (5/12)	20% (1/5)	100% (4/4)	100% (1/1)	15,4% (4/26)
	CH2 (VPH +)	60% (12/20)	84,6% (22/26)	100% (1/1)	100% (3/3)	0% (0/2)	50% (6/12)	100% (5/5)	75% (3/4)	100% (1/1)	23,1% (6/26)

CA= Colposcopia atípica.

CV= Condilomatosis vulvar.

A= Antecedentes de infección por VPH.

En la tabla 11 se puede observar que, tanto la RCP como la CH2, detectaron presencia de genoma de VPH en el 100% de las pacientes con NIC II, NIV I y NIV I más condilomatosis vulvar. Del total de pacientes con NIC I, el 88,5% (23/26) resultaron positivas para VPH por RCP y el 84,6% (22/26) por CH2. En los casos con condilomatosis vulvar, se apreció un 41,6% (5/12) de positividad para VPH por RCP y un 50% (6/12) por CH2. Las muestras con NIC I y NIV I-II, que se detectaron positivas para VPH, representaron, el 20% (1/5) para RCP y el 100% (5/5) para CH2, las que presentaron NIC I más condilomatosis vulvar



representaron el 100% (4/4) para RCP y el 75% (3/4) para CH2. Los casos de colposcopia atípica, fueron negativas para VPH por ambos métodos.

En el total de pacientes, existe un grupo control con diagnóstico clínico normal. Sin embargo, se observó un 55% (11/20), de estos casos, positivos para VPH por RCP y un 60% (12/20) por CH2. Por último, en la tabla 11, se observa un grupo de pacientes con antecedentes de infección por VPH, de los cuales el 15,4% (4/26) resultaron positivos por RCP y el 23,1% (6/26) por CH2.

La tabla 12, muestra el porcentaje de muestras que arrojaron el mismo resultado, y el porcentaje de muestras que presentaron diferencias entre ambos métodos (RCP y CH2). Las muestras detectadas como positivas y negativas por ambos métodos representan el 40% el 28,75% respectivamente, lo cual indica que el 68,75% de las muestras presentó el mismo resultado en la evaluación de los dos métodos. El resto de las muestras (25/80) presentaron resultados diferentes al comparar los métodos.

Es importante destacar que la RCP no detectó el genoma viral de 15 muestras que fueron positivas para CH2, de igual manera la CH2 no detectó la presencia del genoma viral de 10 muestras que fueron positivas para RCP. A pesar de esto, se encontró que existe asociación entre estas pruebas ( $p < 0,05$ ), con un grado de acuerdo moderado ( $k = 0,369$ ), en las muestras (Tabla 12).

**Tabla 12:** Comparación de frecuencias entre los resultados positivos y negativos obtenidos del procesamiento de las muestras por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).

		RCP	
		Positivo	Negativo
CH2	Positivo	<b>32/80</b> (40%)	<b>15/80</b> (18,75%)
	Negativo	<b>10/80</b> (12,5%)	<b>23/80</b> (28,75%)

Chi cuadrado (p): 0,001 (p<0,05)

Kappa (k): 0,369

En cuanto a la relación entre los genotipos de VPH detectados por cada método en las muestras, se encontró un 51,25% de coincidencia. Las diferencias más amplias se encontraron en 10 muestras que la RCP tipificó como VPH de alto riesgo y la CH2 como VPH de bajo y alto riesgo y 9 muestras que la RCP encontró negativas mientras que la CH2 las tipificó como positivas para VPH de alto riesgo (Tabla 13).

**Tabla 13:** Comparación de frecuencias entre los tipos de VPH obtenidos del procesamiento de las muestras por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).

		RCP			
		**BR	*AR	BR y AR	Negativo
<b>CH2</b>	<b>****BR</b>	<b>1/80</b> (1,25%)	<b>0/80</b> (0%)	<b>1/80</b> (1,25%)	<b>2/80</b> (2,5%)
	<b>***AR</b>	<b>0/80</b> (0%)	<b>12/80</b> (15%)	<b>2/80</b> (2,5%)	<b>9/80</b> (11,25%)
	<b>BR y AR</b>	<b>1/80</b> (1,25%)	<b>10/80</b> (12,5%)	<b>5/80</b> (6,25%)	<b>4/80</b> (5%)
	<b>Negativo</b>	<b>2/80</b> (2,5%)	<b>5/80</b> (6,25%)	<b>3/80</b> (3,75%)	<b>23/80</b> (28,75%)

Chi cuadrado (p): 0,006 (p<0,05)

Kappa (k): 0,273

\*AR-RCP: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82.

\*\*BR-RCP: 6/11

\*\*\*AR-CH2: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

\*\*\*\*BR-CH2: 6, 11, 42, 43 y 44

La tipificación de VPH, por ambos métodos en las muestras, presentó asociación entre las variables (p<0,05), con un grado de acuerdo débil (k=0,273), entre ambas pruebas (Tabla 13).

El porcentaje de los controles que arrojaron el mismo resultado, y el porcentaje de controles que presentaron diferencias entre ambos métodos (RCP y CH2) se representan en la Tabla 14. Los controles positivos por ambos métodos representan el 45% y los negativos el 30%, lo cual indica que el 75% de los

controles presentó el mismo resultado en la evaluación de ambos métodos. El resto de los controles (5/20) presentaron resultados diferentes.

**Tabla 14:** Comparación de frecuencias entre los resultados positivos y negativos obtenidos del procesamiento de los controles por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).

		RCP	
		Positivo	Negativo
CH2	Positivo	9/20 (45%)	3/20 (15%)
	Negativo	2/20 (10%)	6/20 (30%)

Chi cuadrado (p): 0,028 (p<0,05)  
Kappa (k): 0,490

Se encontró asociación entre RCP y CH2 (p<0,05), con un grado de acuerdo moderado (k=0,490), en los controles (Tabla 14).

La Tabla 15 muestra la relación entre los genotipos de VPH detectados por cada método en los controles. Se encontró un 70% de coincidencia, destacando que la RCP no detectó el genoma viral de 3 controles que fueron positivos para CH2 y esta no detectó la presencia del genoma viral de 2 controles que fueron positivos para RCP (Tabla 14).

**Tabla 15:** Comparación de frecuencias entre los resultados positivos y negativos obtenidos del procesamiento de los controles por medio de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test).

		RCP			
		BR	AR	BR y AR	Negativo
CH2	BR	<b>1/20</b> (5%)	<b>0/20</b> (0%)	<b>0/20</b> (0%)	<b>0/20</b> (0%)
	AR	<b>0/20</b> (0%)	<b>7/20</b> (35%)	<b>0/20</b> (0%)	<b>3/20</b> (15%)
	BR y AR	<b>0/20</b> (0%)	<b>1/20</b> (5%)	<b>0/20</b> (0%)	<b>0/20</b> (0%)
	Negativo	<b>0/20</b> (0%)	<b>2/20</b> (10%)	<b>0/20</b> (0%)	<b>6/20</b> (30%)

Chi cuadrado (p): 0,000 ( $p < 0,05$ )

Kappa (k): 0,576

\*AR-RCP: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82.

\*\*BR-RCP: 6/11

\*\*\*AR-CH2: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

\*\*\*\*BR-CH2: 6, 11, 42, 43 y 44.

La tipificación de VPH, por ambos métodos en los controles, presentó asociación entre las variables ( $p < 0,05$ ), con un grado de acuerdo moderado ( $k=0,576$ ), entre ambas pruebas (Tabla 15).

La Tabla 16 muestra la relación entre los resultados de RCP y el diagnóstico clínico de las muestras y controles. De las 100 muestras y controles 42 fueron catalogadas como verdaderos positivos (VP) y 9 como verdaderos negativos (VN). Por otro lado, se pudieron identificar 11 falsos negativos (FN) y 38

falsos positivos (FP). Esta relación permitió el cálculo de los índices de validez para la prueba RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening, así la sensibilidad del método resultó ser 79,2%, la especificidad 19,2%, el Valor Predictivo Positivo (VPP) 53%, el Valor Predictivo Negativo (VPN) 45%, la Razón de Verosimilitudes Positiva (RV+) 0,98 y la Razón de Verosimilitudes Negativa (RV-) 1,08.

**Tabla 16:** Relación entre el resultado de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y el diagnóstico clínico y cálculo de los índices de validez (Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, RV+ y RV-).

		Diagnóstico clínico	
		Positivo	Negativo
Resultado de RCP	Positivo	42 (VP)	11 (FN)
	Negativo	38 (FP)	9 (VN)

Chi cuadrado (p): 0,521 (p>0,05)  
 Kappa (k): 0,015  
 Sensibilidad: 79,2%  
 Especificidad: 19,2%  
 VPP: 53%  
 VPN: 45%  
 RV+: 0,98  
 RV-: 1,08

La relación entre los resultados de CH2 y el diagnóstico clínico de las muestras y controles puede observarse en la Tabla 17. De las 100 muestras y controles, 47 resultados fueron VP y 8 VN. Además, se identificaron 12 FN y 33 FP. Esta relación también permitió el cálculo de los índices de validez para el

método CH2 (HC2 HPV DNA test), así la sensibilidad del método resultó ser 80%, la especificidad 20%, el VPP 59%, el VPN 40%, la RV+ 1,00 y la RV- 1,00.

**Tabla 17:** Relación entre el resultado de CH2 (HC2 HPV DNA test) y el diagnóstico clínico y cálculo de los índices de validez (Sensibilidad, Especificidad, VPP, VPN, RV+ y RV-).

		Diagnóstico clínico	
		Positivo	Negativo
Resultado de CH2	Positivo	47 (VP)	12 (FN)
	Negativo	33 (FP)	8 (VN)

Chi cuadrado (p): 0,564 (p>0,05)

Kappa (k): 0,007

Sensibilidad: 80%

Especificidad: 20%

VPP: 59%

VPN: 40%

RV+: 1,00

RV-: 1,00

La prueba de independencia Chi-cuadrado, también permitió la determinación de la relación entre los métodos y el diagnóstico clínico. Con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ), se obtuvo un nivel de significación  $p>0,05$  entre las variables RCP/Diagnóstico clínico y CH2/Diagnóstico clínico, con un nivel pobre o muy débil de concordancia k. Esto permite concluir que no existe asociación entre dichas variables (Tablas 16 y 17).

## **6.6.- FACTORES DE RIESGO PARA LA ADQUISICIÓN DE VPH Y PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER CÉRVICOUTERINO EN LAS PACIENTES ESTUDIADAS**

Los factores de riesgo para la adquisición del virus y para la progresión de esta infección a cáncer cérvicouterino son diversos. En las tablas 18 y 19 se observa un resumen de la evaluación de estos factores en las pacientes estudiadas.

En las pacientes que formaron parte de la muestra se registraron 24 mujeres (30%) que utilizan anticonceptivo hormonal oral, de las cuales 16 están infectadas por VPH de alto riesgo oncogénico. En cuanto al número de embarazos, sólo 1 paciente ha tenido 6 embarazos y se encuentra infectada por VPH de alto riesgo oncogénico, lo cual es considerado un factor de riesgo.

De las 80 pacientes 17 (21,25%) indicaron fumar cigarrillo y 10 de ellas se encuentran infectadas por VPH de alto riesgo oncogénico. El promedio de cigarrillos diario es 5. La mayoría de las pacientes manifestaron poseer entre 1 y 4 parejas sexuales (Tabla 18).

De las 20 pacientes control, 6 (30%) manifestaron utilizar anticonceptivos hormonales orales, de las cuales 4 se encuentran infectadas por VPH de alto riesgo oncogénico, el 50% manifestó tener hábitos tabáquicos y la mayoría de las pacientes indicaron tener entre 1 y 2 parejas sexuales (Tabla 19).



**Tabla 18: Factores de riesgo asociados a la adquisición de la infección por VPH y a la progresión de la infección por VPH a cáncer cérvicouterino en las muestras.**  
\*Promedio de cigarrillos diario= 5

<b>Factor de Riesgo</b>	<b>Característica</b>	<b>Cantidad</b>	<b>VPH-AR +</b>
Anticonceptivo hormonal oral	Lo usan	24/80	16/24
Nº de embarazos (paridad)	1	8/80	6/8
	2	4/80	2/4
	3	1/80	0/1
	6	1/80	1/1
Tabaquismo*	Si fuman	17/80	10/17
Nº de parejas sexuales	1	38/80	22/38
	2	5/80	4/5
	3	9/80	7/9
	4	11/80	7/11
	5	5/80	2/5
	6	8/80	7/8
	7	1/80	1/1
	8	1/80	1/1
	14	1/80	1/1
	20	1/80	0/1

**Tabla 19: Factores de riesgo asociados a la adquisición de la infección por VPH y a la progresión de la infección por VPH a cáncer cérvicouterino en los controles.**  
\*Promedio de cigarrillos diario= 3

<b>Factor de Riesgo</b>	<b>Característica</b>	<b>Cantidad</b>	<b>VPH-AR +</b>
Anticonceptivo hormonal oral	Lo usan	6/20	4/6
Nº de embarazos (paridad)	1	5/20	3/5
Tabaquismo*	Si fuman	10/20	4/10
Nº de parejas sexuales	1	6/20	5/6
	2	6/20	3/6
	3	1/20	0/1
	4	2/20	1/2
	6	1/20	0/1
	9	1/20	0/1

Otro factor importante para la adquisición del virus es la edad de inicio de las relaciones sexuales. La edad promedio de la primera relación sexual en las muestras fue de 17,6 años  $\pm$  2,32 años y en los controles 17,95  $\pm$  3,05 años.

El análisis estadístico de los factores de riesgo, no encontró asociación entre estas variables y el número de muestras y controles positivos para VPH de alto riesgo oncogénico ( $p > 0,05$ ).

Por otro lado, la carga viral ha sido estudiada como un factor probable de la progresión a cáncer cérvicouterino de la infección por VPH. En el caso de la CH2 la carga viral es un valor semicuantitativo. En la tabla 20 se presentan los valores obtenidos en las muestras y controles.

La mayoría de las muestras positivas para VPH de bajo riesgo por el método CH2 presentaron una carga viral entre muy baja y baja, al igual que la mayoría de las muestras positivas para VPH de alto riesgo. En cuanto a los controles se pudo apreciar, al igual que en las muestras, que la mayoría de los VPH positivos para bajo y alto riesgo presentaron una carga viral entre muy baja y baja (Tabla 20).

**Tabla 20:** Carga viral semicuantitativa de muestras y controles.

Tipo de VPH	Carga Viral		
	Muy baja- Baja (1-100 URL/CO)	Media (100-500 URL/CO)	Alta (más de 500 URL/CO)
BR (Muestras)	16	4	4
AR (Muestras)	35	7	1
BR (Controles)	2	0	0
AR (Controles)	9	1	1

Es importante destacar que, el análisis estadístico entre el diagnóstico clínico y la carga viral obtenida, arrojó que no existe asociación entre estas variables, es decir  $p > 0,05$ .

## **VII.- DISCUSIÓN**

El estudio comparativo entre los métodos específicos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test), se llevó a cabo en un grupo de 100 mujeres jóvenes que asisten a la consulta ginecológica en OBE-UCV. La edad promedio de la muestra estudiada correspondió a  $24,78 \pm 5,27$  años, y la de las pacientes control a  $21,30 \pm 3,96$  años. Tomando en cuenta estos datos es importante destacar que, los datos epidemiológicos actuales demuestran que el cáncer cérvicouterino ocupa el primer lugar de los cánceres más frecuentes en las mujeres con edades comprendidas entre 15 y 44 años en Venezuela (WHO/ICO HPV Information Centre, 2010), de aquí podemos realzar la importancia que tiene este tipo de estudio en la población joven venezolana.

En cuanto al diagnóstico clínico de las pacientes, se observó que la mayoría presentaron lesiones de bajo grado, antecedentes de infección por VPH y condilomatosis vulvar (Tabla 7).

En la actualidad, la detección y tipificación de VPH puede realizarse por diversos métodos, sin embargo, no todos poseen las mismas características, objetivos y costos. Los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 (HC2 HPV DNA test), fueron utilizados para la detección y tipificación de VPH en las pacientes, así como para el estudio comparativo y analítico.

Los resultados obtenidos en la comprobación del material genético resultaron satisfactorios, ya que el 100% de las muestras y controles amplificaron la banda de la  $\beta$ -globina, corroborándose de esta manera la calidad de la toma de muestra, así como su conservación y el adecuado procedimiento de extracción de ADN.

Por otro lado, el método RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening detectó la presencia del genoma de VPH en 52,5% (42/80) de las muestras y 55% (11/20) de los controles y CH2 en 58,75% (47/80) muestras y en 60% (12/20) de los controles. Correnti y col., (2010) encontraron un porcentaje similar (54,6%) en la detección de VPH por CH2 en un grupo de mujeres venezolanas.

Las pacientes tomadas como control, tienen la característica de ser mujeres jóvenes sin diagnóstico clínico sugestivo de infección por VPH, es decir pacientes “sanas”, a pesar de esto el porcentaje de positividad fue alto. Diversos estudios llevados a cabo en pacientes “sanas”, han reportado presencia de genoma de VPH. Recientemente Horto y col., (2010), Jing y col., (2010) y Shim y col., (2010) en sus estudios en Brasil, China y Korea encontraron un porcentaje de 27,4% (66/241), 13,3% (665/4.987) y 23,3% (55/235) respectivamente, de muestras positivas para VPH en mujeres sin antecedentes de alteraciones cervicales y con citología normal. Así mismo, De Sanjosé y col. (2007) realizaron una revisión sistemática de la literatura (78 estudios), para estimar la edad y la prevalencia de VPH en mujeres con citología normal de todo el mundo, registrando una prevalencia global de VPH en 15.879 mujeres con citología cervical normal de 10,4%, las estimaciones correspondientes por regiones fueron: África 22,1%,

América Central y México 20,4%, América del Norte 11,3%, Europa 8,1% y Asia 8%. .En todas las regiones del mundo estudiadas, la prevalencia de VPH fue más alta en mujeres menores a los 35 años de edad. En nuestro país, Correnti y col., (2002) también encontraron en un estudio un 45% de muestras positivas para VPH, en pacientes con citología normal. Estos registros son evidencia que el VPH se presenta en un porcentaje importante de mujeres como infección latente, que se caracteriza por el mantenimiento del virus en un nivel bajo, sin formación o con mínima formación de viriones completos. Ordi (2005) y Ling y col., (2002), exponen que en la infección latente, el ADN vírico permanece en el núcleo en forma episómica y en esta forma de infección no se detectan alteraciones citológicas ni histológicas, y la infección puede detectarse únicamente por métodos moleculares muy sensibles, como la RCP. A pesar de estos resultados en las pacientes control, es importante resaltar que, algunos estudios han sugerido que la mayoría de las mujeres eliminan con éxito la infección por VPH (Méndez, 2007). Sin embargo, si estas pacientes se mantienen infectadas por VPH de alto riesgo oncogénico por 10 o 20 años, corren el riesgo de tener una progresión a cáncer cérvicouterino.

La RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y el método CH2 permitieron, además de detectar el genoma viral de VPH, identificar los tipos virales presentes en las muestras y controles, siendo el genoma viral de alto riesgo el de mayor porcentaje en las muestras estudiadas por ambos métodos (90,5% (38/42) y 91,5% (43/47), respectivamente). En los controles se logró identificar, de igual manera, un 90,9% (10/11) de positividad para VPH de alto riesgo oncogénico por

RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y un 91,6% (11/12) por CH2, evidenciándose así, una vez más, que las pacientes control posiblemente estén en un estado latente de la infección por VPH, ya que están afectadas por el genoma viral de alto riesgo oncogénico y no presentan lesiones citológicas e histológicamente detectables. Lo contrario ocurre con VPH de bajo riesgo oncogénico, el cual presenta, en su mayoría, lesiones de tipo verrugosas de fácil detección.

Otra característica, que posiblemente está relacionada con la infección por VPH de alto riesgo en las pacientes control, es la carga viral semicuantitativa calculada por CH2 (Tabla 20). Tirado y col., (2005), destacaron a la carga viral de VPH de alto riesgo calculada por CH2, como un cofactor y posible promotor del desarrollo de lesiones malignas en el cuello uterino e indicaron que puede contribuir a mejorar la prevención y detección temprana de la enfermedad. Los tipos de VPH de alto riesgo detectados en los controles, en su mayoría (9/11), presentaron una carga viral entre muy baja y baja, sin embargo, las muestras también presentaron esta característica. Ordi (2005), explica que la expresión del ADN viral en algunas mujeres tiene lugar (probablemente) de forma transitoria o intermitente, lo que explica la gran variación en los resultados cuando se realizan múltiples estudios en el tiempo y con diferentes metodologías. Tomando en cuenta esto, se destaca que, en el presente estudio no se encontró asociación entre las lesiones presentadas por las pacientes en su diagnóstico clínico con la carga viral detectada por CH2, sin embargo es evidente que las muestras y controles en

general, presentan lesiones de bajo grado (Tabla 7) con carga viral entre muy baja y baja (Tabla 20).

En relación a la presencia de coinfecciones, de más de un genotipo viral, se detectó por RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening un 26,2% (11/42) en muestras y un 9,09% (1/11) en controles. Las pacientes infectadas con VPH de bajo riesgo oncogénico, presentaron un porcentaje bajo, tanto en la muestra (9,5%) como en los controles (9,09%).

Los tipos de VPH más comunes, detectados en este estudio fueron en primer lugar el grupo de VPH-AR (26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82), en segundo lugar VPH de bajo riesgo tipo 6/11, en tercer lugar VPH de alto riesgo 16 y por último VPH tipo 18. En el mundo, los tipos de VPH más comunes son el 16 y el 18, sin embargo estos resultados resaltan un mayor porcentaje en la prevalencia de otro grupo de VPH de alto riesgo (VPH-AR) por el método RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening. Horto y col., (2010), encontraron en Brasil en primer lugar el tipo 16, seguido de los tipos: 31, 66, 53, 71, 11, 61 y 59; el tipo 18 fue detectado apenas en un 0,8% (2/241) de la muestra estudiada. De igual manera Watt y col., (2009) reportaron los tipos de VPH 45 y 58 como los más comunes en un estudio realizado en Jamaica.

En cuanto a los controles, se evidenció que el 63,6% (7/11) se encuentran infectados por uno o algunos de estos tipos de VPH-AR, lo que corresponde con los estudios realizados por De Sanjosé y col., (2007), quienes afirman que a nivel



mundial la contribución relativa de VPH 16 y 18 es sustancialmente menor en las mujeres citológicamente normales. Es importante destacar que, aunque existan evidencias de trabajos científicos que indican la prevalencia, en mayor proporción, de otros tipos de VPH del alto riesgo diferentes a los tipos 16 y 18, no son determinantes para concluir que en Venezuela existe esta tendencia; en nuestro país no existen datos epidemiológicos de la población concluyentes en cuanto a los tipos de VPH más comunes en la población. A pesar de esto, es una realidad que existen otros tipos de VPH circulando en la población que no están incluidos en la vacuna bivalente ni tetravalente. Al respecto Horto y col., (2010) indican que a pesar que no existe una respuesta para la cobertura de los tipos de VPH no incluidos en las vacunas, algunos estudios sugieren la inmunidad de las vacunas contra otros tipos de VPH oncogénicos por reacción cruzada. Mientras no se obtiene respuesta ante estos casos, es importante reforzar los programas de educación sexual en jóvenes y los programas de cribado en todos los países del mundo. Refiriéndose al mismo tema de los diferentes tipos de VPH circulante, Diestro y col., (2007), indican que por la distinta prevalencia de tipos virales a nivel mundial, podrían generarse combinaciones de vacunas de VPH distintas, dependiendo de la población en la que se aplique el programa de inmunoprofilaxis.

La problemática mundial relacionada con VPH y el cáncer cérvicouterino, ha llevado a los investigadores a desarrollar una gran variedad de metodologías dirigidas a la detección molecular del virus. En este caso, los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 fueron diseñados para tal fin. Ambos métodos detectan VPH de alto y bajo riesgo oncogénico, sin embargo poseen sus

diferencias. La RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening permite tipificar por separado los tipos 16, 18, 6/11 y agrupa genotipos de alto riesgo (VPH-AR), mientras que la CH2 incluye en un grupo los tipos de bajo riesgo y en otro los de alto riesgo. La CH2 detecta 3 tipos más de VPH de bajo riesgo oncogénico que la RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y esta detecta 5 tipos más de VPH de alto riesgo oncogénico que la CH2 (Tablas 8 y 9). Otras características importantes de la CH2, es que esta aprobado por la FDA y permite procesar hasta 40 muestras al mismo tiempo.

Realizando una comparación de frecuencias entre los resultados positivos y negativos obtenidos del procesamiento de las muestras por medio de ambos métodos, se obtuvo un 68,75% de las muestras y un 75% de los controles con el mismo resultado. El análisis estadístico con la prueba de independencia Chi-cuadrado determinó, que existe asociación entre los resultados positivo/negativo de muestras y controles procesados por ambos métodos, con un grado de acuerdo o concordancia moderado entre ambas ( $Kappa=0,369$  para muestras y  $Kappa=0,490$  para controles), estos resultados concuerdan con Cañadas y col., (2006) y Monsonego y col., (2008). El nivel de concordancia entre ambos métodos permite establecer una diferencia entre estos y el diagnóstico clínico, ya que el análisis estadístico entre RCP/Diagnóstico clínico y CH2/Diagnóstico clínico determinó que no existe asociación entre dichas variables. Por tal motivo, en la actualidad existen diversos debates sobre la posibilidad de incluir los métodos de biología molecular, para la detección de VPH, en los programas de cribado y en las consultas ginecológicas de rutina. En una revisión del cribado cervical, la

Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) reconoció que las pruebas moleculares de detección del VPH son una opción aceptable, afirmando que: “Existe evidencia suficiente, obtenida a partir de marcadores alternativos, que la eficacia de las pruebas de detección de VPH, como modalidad de cribado primario y utilizando un sistema validado, puede ser al menos igual de buena que la de la citología convencional” (HPV Today 20, 2009).

Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos en el diagnóstico clínico y las pruebas de biología molecular han sido reportadas en diversas publicaciones. Garcez y col., (2006), encontraron que un resultado positivo de Pap no indica necesariamente la presencia de VPH y además que la correlación existente entre RCP y CH2 y sus diferencias con el Pap, se pueden atribuir al hecho de que ambos métodos detectan infecciones latentes, mientras que el Pap detecta solo alteraciones celulares microscópicas.

En relación a los genotipos de VPH detectados por ambas técnicas, se observó que la correlación fue positiva, es decir, existe asociación entre los resultados de muestras y controles en cuanto a los tipos de VPH detectados por ambos métodos, con un grado de concordancia de débil a moderada ( $Kappa=0,273$  para las muestras y  $kappa=0,576$  para los controles). En las muestras se encontró un 51,25% de coincidencia y en los controles un 70%. Es importante destacar que, las diferencias más altas se encontraron en 10 muestras que la RCP tipificó como VPH de alto riesgo y la CH2 como VPH de bajo y alto riesgo, esto puede deberse a la diferencia que existe entre los métodos, en

relación a los 3 tipos de VPH de bajo riesgo que el método CH2 detecta y la RCP no.

Además de las pruebas estadísticas Chi-cuadrado y kappa, existen índices de validez que permiten determinar cuánto se aproxima una medida al valor real que pretende medir. La sensibilidad y especificidad son índices de validez por excelencia, basados en una prueba de referencia. En este caso se utilizó el diagnóstico clínico como prueba de referencia para el cálculo. Las sensibilidades calculadas para RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 fueron de: 79,2% y 80% respectivamente y la especificidad de 19,2% y 20% respectivamente. La literatura reporta valores de sensibilidad y especificidad para estos métodos entre el 70% y el 100% (Ordi 2005; Garcez y col., 2006; Qiao, (2008), Tsiodras y col., 2010 y Shim y col., 2010). Es importante resaltar que si bien la validez de un método depende exclusivamente del mismo método, las estimaciones numéricas que se obtienen de la misma dependen de las características clínicas de los pacientes estudiados.

La sensibilidad del 79,2% y 80%, representa la probabilidad de clasificar correctamente a una paciente positiva para la infección por VPH. Así, la especificidad de 19,2% y 20% representa la probabilidad de clasificar correctamente a una paciente como sana o negativa para VPH. Shah y col. (1997) en un estudio comparativo entre RCP y CH2 obtuvieron que la RCP tiene una alta sensibilidad (89% vs. 48%) pero una baja especificidad (43% vs. 93%) para la detección de VPH comparado con CH2. Además de estos investigadores, Shim y col., (2010), Tsi Monsonogo y col. (2008), reportaron una especificidad de CH2 de

39,3%, otros investigadores como Garcez y col., (2006) y Dillner, (2001), registran valores de especificidad para CH2 entre 59% y 61%. Los valores de las diferentes literaturas, indican que el cálculo de los índices de validez depende de las características de la muestra en cada estudio.

El VPP para RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening fue de 53%, mientras que para CH2 fue de 59%. Este índice indica la proporción de pacientes con resultado “positivo” que verdaderamente poseen la infección. Los valores obtenidos son intermedios en este índice, lo que indica un valor de predicción regular de los métodos para individuos con infección por VPH. El VPN para RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening fue de 45% y para CH2 40%, estos índices son relativamente bajos y representan la proporción de pacientes con resultados “negativos” que realmente son sanos.

Las razones de probabilidades son índices bastante útiles para los métodos diagnósticos ya que relacionan la sensibilidad con la especificidad. En el caso de la RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening se obtuvo un valor de razón de verosimilitud positiva de 0,98, esto quiere decir que un paciente positivo para VPH por este método es 0,98 veces más probable que realmente tenga la infección. El mismo análisis aplica para el valor de RV+ de CH2 (1,00). La RV- para RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening fue de 1,08 y para CH2 1,00. Esto significa que un paciente negativo para VPH por este método es 1,08 o 1,00 (dependiendo del caso) veces más probable que realmente sea sano.

De manera general, los métodos evaluados muestran valores de sensibilidad y especificidad relativamente altos y cercanos entre sí, y aunque estas dos técnicas son las más utilizadas a nivel mundial para la detección de VPH, ambas poseen ventajas y desventajas. Como lo describen Cañadas y col., (2006), la CH2 es una técnica que puede aplicarse en los laboratorios con facilidad, aunque puede tener cierto grado de reacciones cruzadas con algunos tipos de VPH y por los momentos la técnica no permite conocer los tipos específicos de VPH, lo que puede ser un factor limitante en los programas de cribado y vacunación. Los métodos basados en RCP permiten conocer los tipos específicos de VPH y las infecciones múltiples, lo que posibilita el seguimiento particular de la persistencia de la infección. A pesar de estos factores positivos de la RCP, existen desventajas como la necesidad de contar con espacios adecuados y personal con experiencia para minimizar los riesgos inherentes a las técnicas de amplificación, como por ejemplo: la contaminación.

La RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y la CH2 son dos métodos comparables para la detección y tipificación de VPH, ya que son técnicas estandarizadas que detectan un número similar de tipos de VPH. Es importante para las investigaciones sobre VPH, la introducción de nuevas pruebas que sean rápidas, fáciles, sensibles, específicas, con aplicación a gran escala y costo moderado para poder contribuir con la detección temprana de la infección y evitar la progresión a cáncer cérvicouterino. Estas nuevas técnicas deben acompañarse de una evaluación de la validez interna de las mismas (Cañadas y col., 2006).

En el estudio, también se realizó una encuesta que arrojó datos relacionados con los factores de riesgo asociados a la adquisición de la infección por VPH (edad de la primera relación sexual y número de compañeros sexuales) y los asociados a la progresión de la infección a cáncer cérvicouterino (paridad, uso de anticonceptivos orales y tabaquismo). El inicio de las relaciones sexuales en muestras y controles se registro en unas edades promedio de  $17,6 \pm 2,32$  años y  $17,95 \pm 3,05$  años respectivamente. En estudios se ha demostrado que la mayoría de las mujeres inician sus relaciones sexuales antes de los 20 años (Tirado y col., 2005). En cuanto al número de parejas sexuales, 46,45% de la muestra indicó tener más de 3 parejas sexuales a lo largo de su vida. Diestro y col., (2007) describen la prevalencia de las infecciones por VPH en grupos de edad entre los 15 a 25 años, indicando que esta cifra está entre el 30% y el 40%.

Con respecto al número de embarazos, se considera como factor de riesgo las mujeres que tiene más de tres. En la muestra sólo 2 de 80 mujeres indicaron presentar esta condición y en los controles ninguna paciente la posee. En un estudio realizado en cuatro continentes, se determinó que las mujeres con tres o cuatro embarazos tienen un riesgo 2,6 veces más alto de aparición de cáncer cérvicouterino que aquellas que nunca han estado embarazadas, las mujeres con 7 embarazos o más, presentan un riesgo 3,8 veces mayor (Muñoz y col., 2002).

En relación al consumo de cigarrillos, el 21,25% de la muestra reportó tener hábitos tabáquicos y consumir un promedio de hasta 5 cigarrillos diarios, en los controles se obtuvo un 50% de mujeres fumadoras con un promedio de 3

cigarrillos diarios. De las mujeres que presentaron hábitos tabaquicos, existen 14 infectadas por VPH de alto riesgo. El tabaquismo se encuentra entre los cofactores ambientales más uniformemente identificados con la probabilidad de influir en el riesgo de padecer cáncer cérvicouterino; los estudios revelan que el riesgo para las fumadoras actuales al menos duplica el de las no fumadoras (Szarewski y Cuzick., 1998, Hildeshelm y col., 2001 y Castellague y col., 2002).

Los anticonceptivos orales son utilizados por un total de 30 de las 100 pacientes, de las cuales 20 se encuentran infectadas por VPH de alto riesgo oncogénico. Existen investigaciones que indican que hay una relación potencial a largo plazo entre el uso prolongado de anticonceptivos orales y la aparición del cáncer cérvicouterino en pacientes infectadas por VPH de alto riesgo oncogénico (Moreno y col., 2002).

Otro factor que ha sido considerado de riesgo para la progresión a cáncer cérvicouterino es la intensidad de la infección. Existen algunos estudios donde se evalúa la relación de la carga viral con la presencia de displasias y cáncer *in situ*. Así mismo, se ha notificado la existencia de mujeres jóvenes con citología normal pero con carga viral alta del tipo 16, las cuales corren el riesgo elevado de desarrollar neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), sobre todo si esta carga viral persiste en el tiempo (Tirado y col., 2005). Las pacientes estudiadas presentaron carga viral por CH2 entre muy baja y baja, como se explicó anteriormente. Estas pacientes al ser jóvenes no presentan (en su mayoría) lesiones cérvicouterinas avanzadas como NIC II y NIC III o carcinoma *in situ* (Tabla



7), lo que puede explicar la baja carga viral semicuantitativa obtenida (Tabla 20). Sin embargo, si la carga viral de estas jóvenes aumenta y persiste en el tiempo, sumado a otros factores, existe una alta probabilidad de la iniciación de eventos cancerígenos como la integración viral y posteriores lesiones intraepiteliales.

La importancia de la detección temprana de las infecciones latentes en las pacientes control positivas para VPH con carga viral de media a alta, así como en las pacientes con diagnóstico clínico sugestivo de infección por VPH, radica en que permite realizar un diagnóstico temprano y ubicar las mujeres que se encuentran en riesgo probable de presentar una infección persistente (con un mismo tipo viral de alto riesgo), que en un período aproximado de 10 años, al persistir la infección, pueden desarrollar lesiones que pueden progresar a cáncer cérvicouterino. La concientización de la mujer joven, sobre la importancia de asistir periódicamente al ginecólogo para evaluar el estado del cuello uterino, es clave para lograr programas de cribado exitosos que permitan disminuir las tasas de incidencia del cáncer cérvicouterino en nuestro país y en el mundo.

Además de la detección temprana de VPH y el análisis comparativo y estadístico de los métodos, este estudio es importante debido a que el IOH-MPPS es el centro de referencia nacional para el diagnóstico de VPH y la utilización del método CH2, que es la prueba de oro o la “gold estándar” aprobada por la FDA para el diagnóstico molecular de la infección por VPH, permitió la dotación de los estuches comerciales de la nueva prueba RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening

por parte de la casa productora, con la finalidad de que dicho centro realice los análisis de concordancia y discordancia entre los dos métodos.

## VIII.- CONCLUSIONES

- Las pacientes presentaron una edad promedio de  $24,78 \pm 5,27$  años y la mayoría presentaron lesiones de bajo grado, antecedentes de infección por VPH y condilomatosis vulvar.
- La RCP con los iniciadores MY09 y MY11 permitió la comprobación de la calidad del ADN extraído, obteniéndose un 100% de las muestras con la banda de 268 pb de la  $\beta$ -globina amplificada.
- Las muestras positivas para VPH fueron: 52,5% con la RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y 58,75% con la CH2. Los controles positivos para VPH correspondieron a: un 55% con RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y 60% con CH2.
- El tipo de VPH más común encontrado en las muestras y controles, tanto por RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening como por CH2, fué el de alto riesgo oncogénico.
- La RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening detectó en mayor porcentaje (71,4% (30/42) para muestras y 63,6% (7/11) para controles) la banda de 465 pb de VPH-AR que incluye los tipos: 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82.
- Se encontró un 68,75% de correlación entre los resultados positivos y negativos de RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2 en las muestras y un 75% en los controles. Además, se registró una asociación entre estos resultados por la prueba estadística de independencia Chi-cuadrado y un

grado de acuerdo o concordancia moderado con la prueba estadística Kappa.

- La tipificación de VPH por los métodos RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening y CH2, obtuvo un 51,25% de coincidencia en las muestras y un 70% en los controles. La prueba estadística Chi-cuadrado encontró asociación entre los resultados con un grado de acuerdo moderado Kappa.
- Las pruebas estadísticas Chi-cuadrado y Kappa no indicaron asociación entre las pruebas RCP/Diagnóstico clínico y CH2/Diagnóstico clínico.
- El método CH2 presentó mayor sensibilidad que la RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening (80% y 79,2%, respectivamente) y la especificidad de la RCP Seeplex® HPV4A ACE Sreening fue menor que la de CH2 (19,2% y 20% respectivamente).
- Las pruebas estadísticas Chi-cuadrado y Kappa no indicaron asociación ( $p>0,05$ ), entre las variables factores de riesgo y pacientes positivas para VPH de alto riesgo oncogénico.
- No se encontró asociación entre la carga viral determinada por CH2 y el diagnóstico clínico de las pacientes.

## **IX.- RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar futuras investigaciones dirigidas a la población joven y con una muestra representativa, con la finalidad determinar los tipos de VPH más comunes, para confirmar la viabilidad de la introducción de la vacuna en el país.

Además, la investigación científica, el cálculo de índices de validez y las pruebas estadísticas de los nuevos métodos de detección de VPH, deben continuar desarrollándose a la par de los nuevos avances en la biología molecular y la medicina sobre las vacunas y los tratamientos para combatir el cáncer cérvicouterino.

## **X.- BIBLIOGRAFÍA**

- **Ávila, M., Cavazza, M., Vásquez, W., Ortega, J., López, Y., Correnti, M.** (2008). Genotipificación del virus de papiloma humano en pacientes con condilomas acuminados. *Rev Soc Ven Microbiol.* **28**: 127-133.
- **Blachon, S., Bellanger, S., Demeret, C.** (2005). Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. *J Biol Chem.* **280**: 3608-3620.
- **Bossio, J.** (1993). Aplicaciones diagnósticas de la reacción en cadena de la polimerasa. *Medicina,* **53**: 181-184. Disponible en: <http://books.google.co.ve/> (Consultado el: 28 de febrero del 2010).
- **Burd, E.** (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev.* **16 (1)**: 1-17.
- **Burgueño, M., García, J., González, J.** (1995). Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med Clin (Barc).* **104**: 661-670.
- **Burns, J., Maitland, N.** (2005). Human papillomaviruses and cáncer. *Microbiol Today.* **56**: 116-120.
- **Cañadas, M. P., Lloveras, B., Lorincz, A., Ejarque, M., Font, R., Bosch, X., De Sanjosé, S.** (2006). Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud Pública Mex.* **5**: 373-378.

- **Castellague, X., Bosch, F., Muñoz, N.** (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Vir Res.* **89**: 191-199.
- **Castle, E., Porras, C., Quint, W., Rodríguez, A., Schiffman, M., Gravitt, P., González, P. y colaboradores.** (2008). Comparasion of two PCR-Based Human Papillomavirus genotyping methods. *J Clin Microbiol.* **46**: 3437-3445.
- **Cavazza, M., Correnti, M.** (2004). Pruebas moleculares para la detección del Virus de Papiloma Humano. Desafíos y posibilidades. *Dermatol Venez,* **42**: 6-10.
- **Cortés, E., Leal, C.** (2001) Papilomavirus Humano. Biología Molecular y Patogénesis. *Rev. Salud Pública Nutr.* **2**: 10-15
- **Correnti, M., Cavazza, M., Alfonso, B., Lozada, C.** (2002). La infección por el Virus de Papiloma Humano: un problema de salud pública en Venezuela. *VITAE*, **13**. Disponible en: [http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE\\_3575.pdf](http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3575.pdf) (consultado el 14 de febrero de 2010)
- **Correnti, M., Cavazza, M., Herrera, O., Rodríguez, A.** (2010). Presence of human papillomavirus infection determinated by hybrid capture assay in cervical lesions in a Venezuelan population. *Invest Clin.* **51 (1)**: 27-35.
- **Damania, B., Pipas, J.** (2009). DNA Tumor Viruses. Springer. Nueva York, E.U.A.

- **De Guglielmo, Z., Ávila, M., Correnti, M., Veitía, D., Cavazza, M.** (2008). Evaluación, mediante RCP, de la infección por el virus de papiloma humano en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o citológico. *Rev Obstet Ginecol Venez.* **68 (4):** 240-247.
- **De Sanjsé, S., Díaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N., Bosch, F.** (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* **7:** 453-459.
- **Diestro, M., Serrano M., Gómez F.** (2007). Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al Virus del Papiloma Humano (VPH). *Oncología,* **30 (2):**42-59.
- **Dillner, J.** (2001). Primary screening for human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* **15:** 743-757.
- **Dimmock, J., Easton, J., Leppard, N.** (2007). Introduction to Modern Virology. Blackwell Publishing. Sexta edición. Oxford, Inglaterra.
- **Dos Santos, I., Beral, V.** (1997). Socio-economic differences in reproductive behavior. *IARC.* **138:** 285-308.
- **Francois F.** (1998). Gene quantification. Birkhauser. Nueva York, E.U.A.



- **Garcez, L., Carvalho, M., Simoes, A.** (2006). Diagnosis of human papillomatosis by Polymerase Chain Reaction in cases of divergence between results of Hybrid Capture and Papanicolaou cytology. *BJID*. **10 (3)**: 169-172.
- **Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R., Sapp, M.** (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface Heparan Sulfate. *J Virol*. **75 (3)**: 1565-1570.
- **Grillo, C., Martinez, M., Morales, B.** (2008). Virus del Papiloma Humano: aspectos moleculares y cáncer de cérvix. *Rev Col Obst Gin*. **59 (4)**: 310-315.
- **Hwang, J., Kwan, L., Jin, T., Kyung, M.** (2010). The association between fruit and vegetable consumption and HPV viral load in high-risk HPV-positive women with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Cause Control*. **21**: 51-59.
- **Hildeshelm, A., Herrero, R., Castle, P.** (2001). HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Brit J Cancer*. **84**: 1219-1226.
- **Horto, L., Diva, M., Faccini, E., Gil, F., Silva, L., Baeta, S., García, M.** (2010). Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. **43**: 4-8.
- **HPV Today 20.** (2009). Newsletter on Human Papillomavirus. BYPASS Ediciones. Brucelas. Disponible en: [www.hpvtoday.com](http://www.hpvtoday.com) (Consultado el: 08/11/2010).

- **Irazabal, L., Correnti, M., Avila, M., Guerrero, A., León, A.** (2008). Virus Papiloma Humano (VPH) en contexto ecológico Venezolano (I): diagnóstico citológico y molecular. *Salus online*, **12**: 68-77.
- **Jing, Y., Xiaodong, C., Xiaojing, C., Feng, Y., Weiguo, L., Xing, X.** (2010). Prevalence and risk profile of cervical human papillomavirus infection in Zhejiang province, southeast China: a population – based study. *Virology*, **7**: 66-77.
- **Kurman, R.** (2002). Blustein's pathology of the female genital tract. Springer. Quinta edición. Nueva York, E.U.A.
- **Letian, T., Zhang, T.** (2010). Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *J Virol*, **7 (2)**: 1-7.
- **Lewis, H., Webster, K., Sanchez, A.** (1999). Cellular transcription factors regulate human papillomavirus type 16 gene expression by binding to a subset of the DNA sequences recognized by the viral E2 protein. *J Gen Virol*, **80**: 2087-2098.
- **Ling, P., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., y col.** (2002). Life cycle heterogeneity in animal models of Human Papillomavirus-Associated disease. *J Virol*, **76 (20)**: 10401-10416.
- **López, G.** (2008). Infección por Virus de Papiloma Humano. *Rev Fac Med UNAM*, **51(6)**: 243-244.

- **López, J., Aristizábal, F.** (2006). Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev Col Cienc Quím Farm.* **35 (1):** 5-32.
- **Martínez, M.** (2010). Diagnóstico microbiológico de infecciones de transmisión sexual. Parte II. ITS virales. *Rev Chilena Infectol.* **27(1):** 60-64
- **Mandell G., Bennett J., Dolin R.** (2006). Enfermedades infecciosas. Elsevier España C.A. Sexta edición. Madrid, España.
- **Melbay, M., Smith, E., Wohlfahrt, J., Osterlinnd, A., Orholm, M., Bergmann, O., Mathiesen, L. y colaboradores.** (1996). Anal and cervical abnormality in women. Prediction by human papillomavirus test. *Int J Cancer,* **68:** 559-564.
- **Mendéz, A.** (2007). Human papillomavirus infection and cervical cáncer: pathogenesis and epidemiology. *Formatex.* 2: 680-688. Disponible en:  
  
<http://www.formatex.org/microbio/pdf/pages680-688.pdf> (Consultado el 30 de Abril de 2010).
- **Mendoza, J., Muñoz, M., Vielma, S., Noguera, M., López, M., Toro, M.** (2000). Infección cervical por el virus del papiloma humano: diagnóstico por citología y por captura de híbridos del ADN viral. *Rev Obstet Ginecol Venez.* **60 (2):** 103-107.
- **Monsonego, J.** (2006). Emerging Issues on HPV infections. From Science to practice. Karger. Basel, Switzerland.

- **Monsonogo, J., Pollini, G., Evrard, M., Sednaqui, P., Monfort, L., Zerat, L., Syrjänen, K.** (2008). Detection of Human Papillomavirus genotypes among high-risk women: A comparison of Hybrid Capture and Linear Array test. *Sex Transm Dis.* **35**: 521-527.
- **Moreno, V., Bosch, F., Muñoz, N.** (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* **359**: 1085-1092.
- **Muñoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C.** (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* **359**: 1093-1101.
- **Muñoz, M., Mendoza, J., Téllez, L., Noguera, M., Moret, O., López M., Toro, M.** (2003). Detección de VPH 16 y 18 en muestras de cérvix de mujeres que acuden a centros asistenciales de la ciudad de Mérida, Venezuela. *Rev Biomed.* **14**: 61-68.
- **Ordi, J.** (2005). Virus de papiloma humano y carcinogénesis cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol.* **72**: 254-267.
- **Pita, S., Pértegas, S.** (2003). Pruebas diagnósticas. *Cad Aten Prim.* **10**: 120-124.
- **Quiao, Y.** (2008). A new test for cervical cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China. *Lan Oncol.* **9**: 929-936.

- **Quintero, M., Cruz, J., Bastidas, M., Márquez, L., Puig, J.** (2008). Detección y tipificación de Virus de Papiloma Humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez*, **68**: 25-31.
- **Rivera, R., Aguilera, J., Larraín, A.** (2002). Epidemiología del virus de papiloma humano. *Rev Chil Obstet Ginecol*. **67**: 501-506.
- **Rivera, R., Delgado, J., Painel, V., Barrero, R., Larraín, A.** (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por Virus Papiloma Humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol*. **71 (2)**: 135-140.
- **Rosenblatt, A., De Campos, H.** (2009). Human Papillomavirus. A practical guide for urologists. Springer. Berlin, Heidelberg.
- **Shah, K., Solomon, L., Daniel, R., Cohn, S., Vlahov, D.** (1997). Comparison of PCR and Hybrid Capture methods for detection of human papillomavirus in injection Drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol*. **35**: 517-519.
- **Shim, H., Noh, S., Park, A., Lee, Y., Kim, J., Chung, H., Kang, K y colaboradores.** (2010). Detection of sexually transmitted infection and human papillomavirus in negative cytology by Multiplex-PCR. *BMC*. **10**: 284-297.
- **Sterlinko, H.** (2009). Human papillomavirus infections, cancer and therapy. *Indian J Med Res*. **130**: 277-285.

- **Szarewski, A., Cuzick, J.** (1998). Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *J Epidemiol Biostatist.* **3**: 229-256.
- **Tirado, L., Mohar, A., López, M., García, A., Franco, F., Borges, G.** (2005). Factores de riesgo de cáncer cérvicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Sal Pub Mex.* **47**: 342-250.
- **Tsiodras, S., Georgoulakis, J., Chranioti, A., Voulgaris, Z., Psyrris, A., Tsvilika, A., Panayiotides, J. y colaboradores.** (2010). Hybrid capture vs. PCR screening of cervical Human Papilloma Virus infections. Cytological and histological associations in 1270 women. *BMC.* **10**: 3-22. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/53> (Consultado el 10 de marzo de 2010).
- **Watt, A., Garwood, D., Jackson, M., Younger, N., Ragin, C., Smikle, M., Fletcher, H.** (2009). High-risk and multiple human papillomavirus (HPV) infections in cancer-free Jamaican women. *Inf Age Cancer.* **4**:1-7.
- **Wentzensen, N., Vinokurova, S., Von Knebel, M.** (2004). Systematic review of genomic integration sites of Human Papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res.* **64**: 3878-3889.
- **WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre.** Human Papillomavirus and Related Cancers in

Venezuela. Summary Report 2010. Disponible en: [www.who.int/hpvcentre](http://www.who.int/hpvcentre)  
(Consultado el 12 de Octubre de 2010).

- **Zandi, K., Sajjad, S., Hamkar, R., Ahmadi, S., Ramedani, E., Deilami, I., Aziz, H., y colaboradores.** (2010). Prevalence of various human papillomavirus (HPV) genotypes among women who subjected to routine Pap smear test in Busher city (South west of Iran) 2008-2009. *Virology* **7**: 65-68.

**ANEXOS**  
**ANEXO 1: Consentimiento informado**

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA  
MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD  
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.  
CARACAS.

*Estudio comparativo entre dos técnicas (Captura de Híbridos y RCP) para la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH) en áreas genitales de jóvenes con diagnóstico clínico sugestivo de infección viral.*

Yo, \_\_\_\_\_, portador de la cédula de identidad N° \_\_\_\_\_, hago constar que he sido informado sobre el estudio del Virus de Papiloma Humano relacionado con este proyecto; por lo cual accedo voluntariamente a que se me realicen los estudios clínicos en el laboratorio especializado pertinente.

Los resultados serán guardados con estricta confidencialidad y se me suministrarán si los requiero. Hago explícito que en mi carácter de participante voluntario podre retirarme del estudio en el momento que lo crea conveniente sin ninguna consecuencia.

En caso de ser participante voluntario menor de edad el representante legal se hará responsable de lo anteriormente expuesto.

En Caracas, a los \_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

Firma del participante voluntario: \_\_\_\_\_

Teléfono de localización: \_\_\_\_\_

En caso de ser paciente menor de edad firma el representante legal:

Firma \_\_\_\_\_ C.I \_\_\_\_\_

Responsable:

Dra. María Correnti.

Laboratorio de Genética Molecular.

Instituto de Oncología y Hematología. Telef. 605.06.47



## ANEXO 2. – Encuesta



Referido desde:

Identificación  
C.I.:  -  Fecha de Nac.:  -  -

Lugar de Nacimiento País:  Centro Poblado:   
En Vuela: Estado:  Mun.:   
Parroquia:

Lugar de Residencia Centro Poblado:   
En Venezuela: Estado:  Mun.:   
Parroquia:   
Urbano  Rural  Coordenadas: LATITUD  LONGITUD  ALTITUD

Dirección Av./Calle:  Vereda:  Sector:   
Casa/Edif.:  Piso:  Apto. N°:   
Tel. Habitación:  Tel. Celular:   
Email:

**PERSONALES**  
1. Género Masc.  Fem.  2. Edad:

**3. RAZA**

1 Caucasica (blanco)	<input type="checkbox"/>
2 Negra	<input type="checkbox"/>
3 Mestizo (trigueño)	<input type="checkbox"/>
4 Asiática	<input type="checkbox"/>
5 Árabe	<input type="checkbox"/>
6 Indígena	<input type="checkbox"/>



**4. ¿Cuál es su estado civil?**

1.- Casado	<input type="checkbox"/>
2.- Viudo	<input type="checkbox"/>
3.- Divorciado	<input type="checkbox"/>
4.- Separado (casado pero no vive con su pareja legal)	<input type="checkbox"/>
5.- Soltero (nunca se ha casado)	<input type="checkbox"/>
6.- Unido	<input type="checkbox"/>
99. No responde	<input type="checkbox"/>

**ASPECTOS EDUCATIVOS Y LABORALES**

**14. ¿Último grado, año o semestre aprobado y de cuál nivel educativo?**

0.- Ninguno	<input type="checkbox"/>
1.- Básica (1-6) / Primaria (1-6)	<input type="checkbox"/>
2.- Educación Especial	<input type="checkbox"/>
3.- Media (1-3)	<input type="checkbox"/>
4.- Técnico Medio (1-3)	<input type="checkbox"/>
5.- Bachillerato (1-5)	<input type="checkbox"/>
6.- Técnico Superior (Pre B)	<input type="checkbox"/>
7.- Universitario (Pre B)	<input type="checkbox"/>
8.- Misión Robinson I	<input type="checkbox"/>
9.- Misión Robinson II	<input type="checkbox"/>
10.- Misión Ribas	<input type="checkbox"/>
11.- Misión Sucre	<input type="checkbox"/>
99. No responde	<input type="checkbox"/>

**15. ¿Actividad?**

1. Estudia	<input type="checkbox"/>
2. Trabaja	<input type="checkbox"/>
3. Estudia y trabaja	<input type="checkbox"/>
4. Desempleado	<input type="checkbox"/>
5. Jubilador/Pensionado	<input type="checkbox"/>
6. Oficina del Hogar	<input type="checkbox"/>
7. Discapacitado permanente	<input type="checkbox"/>
99. No responde	<input type="checkbox"/>



**5. Cuántas personas componen su hogar**

**6. Cuántos menores hay.**

**7. Niños**

**8. Niños Menores de 12 y más**

**9. ¿Quién es el jefe del hogar?**

1. Yo  2. Cónyuge  3. Padre  4. Madre  5. Padre y Madre

6. Hijo(a)  7. Hermano  7. Otro

**10. ¿Cuál es la profesión u oficio del jefe del hogar?**

Universitario, empresario, ejecutivo, Técnico, comerciante, productor, perito, artista  
Empleado, pequeño comerciante o productor  
Obrero especializado, chofer, pintor, agricultor.  
Obrero no especializado, jornalero, serv. doméstico  
Otras:

**11. ¿Nivel de instrucción del jefe de hogar?**

Egresado universitario, pedagógico, instituto  
Secundaria completa  
Secundaria incompleta (2do. Año de Educ Media)  
Alfabeto (algún grado de educación primaria)  
Analfabeto (no sabe leer ni escribir)

**12. ¿Cuál es la fuente de ingresos del jefe de hogar?**

Rentas (fortuna heredada o adquirida)  
Ganancias (honorarios, utilidades)  
Sueldo (remuneración mensual a empleados)  
Salario (remuneración semanal por tareas o destajo)  
Donaciones (ayudas por organismos)

**13. ¿Condiciones de alojamiento de su hogar?**

Óptimas condiciones con ambientes de lujo, espaciosos en urbanización elegante.  
Óptimas condiciones sin lujo, ambientes espaciosos, en urbanización residencial.  
Buenas condiciones sanitarias, zona residencial, comercial, industrial, espacios reducidos.  
Deficiencia de algunas condiciones sanitarias, urbanización de intermedias, barrios obreros.  
Condiciones sanitarias inadecuadas, barrios marginales, viviendas rurales en malas condiciones.

16. ¿Trabaja usted actualmente?  
 Si  No

17. Su Profesión u Oficio

- 1 Universitario, empresario, ejecutivo
- 2 Técnico, comerciante, productor, peón, artista
- 3 Empleado, pequeño comerciante o productor
- 4 Obrero especializado, chofer, pintor, agricultor.
- 5 Obrero no especializado, jornalero, serv. doméstico
- 6 Trabajador(a) sexual
- 7 Otra \_\_\_\_\_

18. ¿Participa en alguna Misión gubernamental?  
 Si  No  Señalar a la 23

- 19.- Misiones educativas
- 1 Robinson 1
  - 2 Robinson 2
  - 3 Ribas
  - 4 Sucre
  - 5 Vuelvan Caras
  - 6 Che Guevara

20. Forma de participación:
- 1. Estudiante
  - 2. Facilitador

21. Misiones en Salud	1	Barrío Adentro	<input type="checkbox"/>
	2	Márgen	<input type="checkbox"/>
	3	José G. Hernández	<input type="checkbox"/>
22. Otras Misiones	1	Madres del Barrio	<input type="checkbox"/>
	2	Habitat	<input type="checkbox"/>
	3	Mercal	<input type="checkbox"/>
	4	Zamora	<input type="checkbox"/>
5		<input type="checkbox"/>	
6		<input type="checkbox"/>	

TRAYECTORIA Y ANTECEDENTES FAMILIARES

23. ¿Sabe si su mamá tuvo abortos? Si  NO  24. ¿Cuántos?

25. ¿Cuántos hijos tuvo su mamá?

26. ¿Cuántos hermanos son menores que Ud.?

27. ¿Edad de su mamá cuando Ud. Nació?  años

28. ¿A quienes considera responsables de su crianza? Padre  Madre  Ambos   
 Abuelo(a)  Tío(a)  Hermano(a)  Otro

29. ¿Cuántas personas viven en el hogar en el cual Ud. Se crió?

30. ¿Cuántos cuartos tenían para dormir?



31. ¿Conoce de antecedentes familiares de Cáncer en su familia?  
 Si  NO

32. Si la respuesta es afirmativa, indique en que lugares (selección múltiple)

1 Cuello del Utero	<input type="checkbox"/>	8 Ovario	<input type="checkbox"/>
2 mama	<input type="checkbox"/>	9 Oseo	<input type="checkbox"/>
3 Tórax	<input type="checkbox"/>	10 Cerebral	<input type="checkbox"/>
4 Abdomen	<input type="checkbox"/>	11 Próstata	<input type="checkbox"/>
5 Hígado/Bazo	<input type="checkbox"/>	12 Pene	<input type="checkbox"/>
6 Cabeza-Cuello	<input type="checkbox"/>	13 Anal	<input type="checkbox"/>
7 Hemáticos	<input type="checkbox"/>	14 No sabe	<input type="checkbox"/>

TRAYECTORIA Y ANTECEDENTES PERSONALES

33. ¿Ha tenido Ud. mas de una pareja sexual a la vez en algún momento de su vida? Si  NO

34. N° de parejas sexuales que ha tenido en el pasado

35. N° de parejas sexuales actualmente

36. ¿A padecido algún tipo de cáncer? (selección múltiple)

SI <input type="checkbox"/>	1 Cuello del Utero	<input type="checkbox"/>	8 Ovario	<input type="checkbox"/>
	2 mama	<input type="checkbox"/>	9 Oseo	<input type="checkbox"/>
	3 Tórax	<input type="checkbox"/>	10 Cerebral	<input type="checkbox"/>
	4 Abdomen	<input type="checkbox"/>	11 Próstata	<input type="checkbox"/>
	5 Hígado/Bazo	<input type="checkbox"/>	12 Pene	<input type="checkbox"/>
	6 Cabeza-Cuello	<input type="checkbox"/>	13 Anal	<input type="checkbox"/>
	7 Hemáticos	<input type="checkbox"/>	14 No sabe	<input type="checkbox"/>

NO

37. Enfermedades que ha padecido a lo largo de su vida: (selección múltiple)

1 Hipertensión/ Cardiovasculares	<input type="checkbox"/>
2 Diabetes	<input type="checkbox"/>
3 Enf. Pulmonar crónica	<input type="checkbox"/>
4 Artritis	<input type="checkbox"/>
5 Lupus	<input type="checkbox"/>
6 Esclerosis	<input type="checkbox"/>
7 Alergias	<input type="checkbox"/>
8 Otras	<input type="checkbox"/>
9 Ninguna	<input type="checkbox"/>

38. ¿Conoce Ud. las infecciones de transmisión sexual?

SI  NO  Señalar a la 45



39. ¿Cuáles infecciones de transmisión sexual conoce Ud.?

1	
2	
3	
4	
5	
6	

40. ¿Padece o ha padecido alguna de las siguientes ITS?

(selección múltiple)	
1. Sífilis	<input type="checkbox"/>
2. Gonorrea	<input type="checkbox"/>
3. VPH	<input type="checkbox"/>
4. HIV/SIDA	<input type="checkbox"/>
5. Chancro	<input type="checkbox"/>
6. Herpes simple	<input type="checkbox"/>
7. Chlamydia	<input type="checkbox"/>
8. Vaginitis	<input type="checkbox"/>
9. Ninguna	<input type="checkbox"/>

41. ¿Sabe como evitar las infecciones de transmisión sexual?

SI  ¿Cómo? \_\_\_\_\_ NO  Señalar a la 45

42. ¿Sabe adónde acudir si sospecha que tiene una infección de transmisión sexual?

SI  NO  Señalar a la 45

43. ¿A quién acudiría?

- 1. Padres
- 2. Amigos
- 3. Médicos
- 4. Familiares
- 4. Otro ¿Quién? \_\_\_\_\_

44. ¿Por qué vía ha recibido información sobre ITS? (selección múltiple)

- 1. TV
- 2. Prensa
- 3. Radio
- 4. Amigos
- 5. Padres
- 6. Familiares
- 7. Revistas
- 8. En clase
- 9. Profesores
- 10. Internet

11. Otra ¿Cuál? \_\_\_\_\_

45. ¿Ha recibido información sobre salud sexual y reproductiva?

SI  NO

Solo para Mujeres

48. ¿A que edad tuvo su 1ra. menstruación?  años

47. ¿Ha estado embarazada? SI  NO  Señalar a la 63

48. ¿Cuántos embarazos ha tenido?

49. ¿Cuántos partos ha tenido?

50. ¿Cuántos hijos ha tenido?

51. ¿A que edad quedó embarazada por primera vez?  años

52. ¿A que edad tuvo su primer hijo?  años

53. ¿Cuántos abortos ha tenido?

54. Tipo
- 1. Espontáneo
  - 2. Provocado
  - 3. Por medicamentos
  - 4. Por accidente
  - 5. Otro motivo

Solo para Hombres

55. ¿Ha provocado Ud. Embarazos? SI  NO  NO sabe

56. ¿Cuántos?  Señalar a la 63

57. ¿Alguno de esos embarazos ha terminado en aborto? SI  NO  NO sabe

58. ¿Cuántos?  Señalar a la 60

59. ¿Estuvo de acuerdo con que se practicaran esos abortos? SI  NO  En algunos casos  No le consultaron

60. ¿Tiene hijos? SI  NO  NO sabe

61. ¿Cuántos?  Señalar a la 63

62. ¿Qué edad tenía Ud. Cuando nació su primer hijo?  años

63. ¿Está de acuerdo con las relaciones sexuales pre-matrimoniales?

SI  NO

64. ¿Está de acuerdo con las relaciones sexuales extra-matrimoniales?

SI  NO

65. ¿Cómo se define Ud. Sexualmente en este momento?

- 1. Heterosexual
- 2. Homosexual
- 3. Bisexual
- 4. Transexual
- 5. Otro indique: \_\_\_\_\_



66. ¿Conoce Ud. Métodos anticonceptivos?

SI  NO  Señalar a la 67

67. ¿Cuáles métodos anticonceptivos conoce?


68. ¿Utiliza Ud. Métodos anticonceptivos, cuáles?

Método	Actual	Utilizó
1. Dispositivo intrauterino		
2. Diafragma		
3. Espermicidas		
4. Método del ritmo		
5. Coito interrumpido		
6. Inyección hormonal		
7. Píldora anticonceptiva		
8. Abstinencia		
9. Otro		
10. Ninguno		

69. ¿Conoce Ud. Métodos de prevención de ITS?

SI  NO  Señalar a la 72

70. ¿Cuáles métodos de prevención de ITS conoce?


71. ¿Utiliza Ud. Métodos de prevención de ITS, cuáles?

Método	Actual	Utilizó
1. Condón masculino		
2. Condón femenino		
3. Diafragma		
4. Gels Microbicidas		
5. Barrera oral		
6. Abstinencia		
8. Otro		
9. Ninguno		

## HABITOS

72. ¿Ud. Fuma o ha fumado cigarrillos?	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
73. N° de cigarrillos diarios que fuma o fumaba	<input type="text"/>	
74. ¿Por cuántos años ha fumado?	<input type="text"/>	
75. ¿Consume o ha consumido alcohol?	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
76. ¿Cuántos días a la semana consume o consumió?	<input type="text"/>	
77. ¿Por cuántos años ha consumido?	<input type="text"/>	
78. ¿Ud. Consume o ha consumido café?	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
79. ¿Cuántas tazas consume al día?	<input type="text"/>	
80. ¿Por cuántos años ha consumido?	<input type="text"/>	

81. ¿Ud. Consume o ha consumido drogas?

SI  NO 

82. Si la respuesta es afirmativa

Forma de consumo

1	Fumada	<input type="text"/>
2	Inhalada	<input type="text"/>
3	Inyectada	<input type="text"/>
4	Tomada	<input type="text"/>
5	Otra forma	<input type="text"/>

83. ¿Por Cuántos años?



84. ¿Cuáles son las razones o causas por las cuales Ud. asiste a este centro de salud?

1	Prevención	<input type="text"/>
2	Control médico	<input type="text"/>
3	Sospecha de algún trastorno	<input type="text"/>
4	Recomendación médica	<input type="text"/>
5	Tratamiento	<input type="text"/>
6	Sugerencia de familiar o amigo	<input type="text"/>
7	Otra razón ¿Cuál?	<input type="text"/>



Observaciones:


Encuestador: \_\_\_\_\_

