

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**TIPIFICACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV) EN MUESTRAS DE ORINA.
UNA TÉCNICA DE SCREENING COMPLEMENTARIA AL PAPANICOLAOU.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

TAMARA ALEJANDRA VISCARRA ALVAREZ

PROFESOR GUÍA: DRA. MARIBEL PARADA IBAÑEZ

TEMUCO-CHILE

2012

“TIPIFICACIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV) EN MUESTRAS
DE ORINA. UNA TÉCNICA DE SCREENING COMPLEMENTARIA AL
PAPANICOLAOU”

PROFESOR GUÍA : _____

Dra. Maribel Parada Ibañez
Facultad de Cs. Agropecuarias y Forestales
Universidad de La Frontera

PROFESORES CONSEJEROS : _____

Dra. Priscilla Brebi Mieville
Laboratorio de Patología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS: _____

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que con su apoyo, cariño y dedicación permitieron llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

Agradezco el apoyo brindado por mis tutores, Dra. Maribel Parada Ibañez y Dra. Priscilla Brebi Mieville, quienes permitieron llevar a cabo éste proceso y colaboraron en mi formación como investigador. En forma particular a la Dra. Brebi, por su constante dedicación y orientación durante el transcurso de este trabajo, brindándome su apoyo incondicional durante mi estadía en el laboratorio y otorgarme la confianza necesaria para desarrollar mis capacidades como investigador.

De igual manera quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Patología Molecular, con quienes compartí diariamente y me brindaron un ambiente laboral grato y de plena confianza. De modo especial a Alejandra Andana, quien se mantuvo a mi lado día a día, me apoyó y transmitió sus conocimientos y experiencias para lograr cada meta propuesta en éste trabajo, a Doris Menzel, y Carmen Ili quienes me ofrecieron su ayuda cada vez que lo requerí.

Al Dr. Raúl Sanchez, quien vio en mi el potencial para el desarrollo de éste trabajo y depositó su plena confianza y apoyo para llevar a cabo éste trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Carlos Roa, quien facilitó las dependencias del Laboratorio de Patología Molecular para poder desarrollar el presente trabajo.

En especial quiero agradecer a mi familia, que durante mi vida ha sido el motor para mi crecimiento personal y ha brindado su apoyo incondicional durante éste difícil periodo, soportando todos mis estados de alegrías, tristezas y nervios. Por celebrar conmigo cada logro alcanzado y apoyarme luego de cada fracaso, impidiendo que decaiga o deserte de mis objetivos. A mi madre, Jessica, y a mi padre, Cristian, quienes han sido el pilar fundamental para mi formación personal y profesional, enseñándome con su cariño, dedicación y perseverancia que en la vida todo cuesta, pero que no existen cosas imposibles si pones en ello tu esfuerzo y confianza, gracias por confiar en mí en cada momento y darme la oportunidad de perseguir mis sueños.

A mi hermana, Paulina, que me brindó su constante apoyo, dedicación, consejos y momentos gratos en los cuales permitió aminorar las horas de tensión vividas durante este periodo, y por su inmensa alegría y positividad que me mantuvo siempre a flote.

A mis amigos, quienes estuvieron en todo momento a mi lado y soportaron mis días de intensa alegría o tristeza, que me brindaron su apoyo y fueron mis constantes oídos en los momentos en que necesité desahogarme.

Finalmente, agradezco a Dios por guiar mi camino en todo momento, no abandonarme y permanecer junto a mí durante toda mi vida, por colocar a las personas justas y necesarias en los momentos más difíciles y por brindarme la hermosa familia que tengo y los bellos amigos que poseo. Gracias Señor por enseñarme a vivir en la fe y no dejarme decaer.

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Cáncer Cervicouterino y Lesiones Preneoplásicas	3
2.2	Virus Papiloma Humano	7
2.2.1	Patogénesis del Virus Papiloma Humano	9
2.2.2	Epidemiología del Virus Papiloma Humano	11
2.2.3	Epidemiología del Virus Papiloma Humano en orina	13
2.3	Técnicas de detección del Virus Papiloma Humano	15
2.3.1	Captura Híbrida	15
2.3.2	Reverse Line Blot (RLB)	15
2.3.3	PCR real time	16
2.3.4	Inmunohistoquímica (IHQ)	17
2.4	Vacunas para Virus Papiloma Humano	17
3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	20
3.1	Hipótesis	20
3.2	Objetivo general	21
3.3	Objetivos específicos	21
4	MATERIALES Y MÉTODOS	22
5	RESULTADOS	31
6	DISCUSIÓN	40
7	CONCLUSIONES	44
8	LITERATURA CITADA	45
9	ANEXOS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Progresión de cáncer cervico uterino mediado por HPV	5
Figura 2.	Frotis cervical con citología normal del cérvix.	23
Figura 3.	Frotis cervical con signos de infección por HPV	24
Figura 4.	Frotis cervical con displasia leve o NIE I.	24
Figura 5.	Frotis cervical con displasia moderada o NIE II.	25
Figura 6.	Frotis cervical con displasia intensa/carcinoma in situ.	26
Figura 7.	Frotis cervical con carcinoma escamoso invasor (SSC)	26
Figura 8.	Electroforesis en gel de agarosa. Detección e integridad del DNA.	31
Figura 9.	Detección y tipificación de HPV mediante PCR e hibridación no radioactiva.	32
Figura 10.	Gráfico de distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras normales.	34
Figura 11.	Gráfico de distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con LBG.	36
Figura 12.	Gráfico de distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con LAG.	38
Figura 13.	Gráfico de distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con cáncer.	39

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Número de muestras por grupo según diagnóstico previo.	22
Tabla 2.	Distribución de tipos virales de HPV en el total de muestras (Normal, LBG, LAG, Cáncer).	33
Tabla 3.	Distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras normales.	33
Tabla 4.	Distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con LBG.	35
Tabla 5.	Distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con LAG.	37
Tabla 6.	Distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con cáncer.	39

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1. Solución de preservación de orina.
- Anexo 2. Extracción manual de DNA desde muestras de orina.
- Anexo 3. Kit E.Z.N.A para la extracción de DNA de sangre y fluidos corporales (modificado).
- Anexo 4. Solución 1% SDS/PK.
- Anexo 5. Solución PC-8 (fenol/cloroformo 1:1).
- Anexo 6. Limpieza DNA (protocolo de extracción de DNA desde muestras cervicales con Citobrush, modificado).
- Anexo 7. Estimación de la calidad del DNA mediante amplificación por PCR para la detección del fragmento 268 del gen de la β -globina.
- Anexo 8. Detección y genotipificación de HPV: amplificación.
- Anexo 9. Detección y genotipificación de HPV: Hibridación.

RESUMEN

Introducción: El cáncer cervicouterino (CCU) es un importante problema de salud pública, siendo la segunda neoplasia más prevalente en la población femenina a nivel mundial y la quinta causa de muerte por cáncer de dicha población. Virus Papiloma Humano (HPV) es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial y el factor etiológico de cáncer cervicouterino, detectándose en el 99,7% de todos los casos. En la actualidad la técnica mayormente utilizada para la detección precoz de CCU es el Papanicolaou (PAP), la cual ha contribuido de manera importante en la reducción de la incidencia y mortalidad por CCU. Sin embargo, esta técnica no permite detectar de manera directa la infección por HPV, además de requerir muestras consideradas invasivas para su realización, como es el caso del cepillado de cuello uterino (citobrush) y biopsias.

Hipótesis: Utilizando técnicas de amplificación e hibridación no radioactiva es posible detectar y genotipificar *virus papiloma humano* en muestras de orina.

Objetivo General: Estandarizar un método eficiente para la detección y genotipificación de *virus papiloma humano* en muestras de orina.

Metodología: Se analizaron 119 muestras de orina de pacientes femeninas con diagnóstico previo de lesiones de bajo grado (LBG), lesiones de alto grado (LAG), carcinoma cervical escamoso (CCU) y normales. La extracción de DNA se realizó con el método fenol/cloroformo (1:1) modificado. La detección y tipificación de los genotipos virales fue llevada a cabo mediante PCR convencional e hibridación no radioactiva.

Resultados: La frecuencia de HPV aumentó a medida que progresaba la carcinogénesis cervical uterina (Normal 20%, LBG 85,7%, LAG 88,3% y CCU 93,8%). El principal genotipo viral evidenciado fue HPV16, tanto en infecciones únicas como en infecciones múltiples.

Conclusión: Utilizando técnicas de amplificación e hibridación no radioactiva, es posible detectar y genotipificar HPV en muestras de orina, posicionando esta técnica como posible metodología complementaria al PAP.

SUMMARY

Background: Cervical cancer remains a major public health problem in developing countries and the second-third most common cause of cancer death. In the worldwide Human Papilloma Virus (HPV) is sexually transmitted infections more common and etiological factor for cervical cancer, detected in 99,7% of cases. Now the technique used for early detection of CCU is the Papanicolaou (PAP), which has significantly contributed in reducing the incidence and mortality. However, this technique can not directly detect HPV infection, besides requiring invasive samples considered for its realization, as is the case with cervical brush (citobrush) and biopsies.

Hypothesis: Using amplification techniques and nonradioactive hybridization can be detected and genotyping HPV in urine samples.

General Objective: Standardize an efficient method for the detection and genotyping of HPV in urine samples.

Methodology: We analyzed 119 urine samples from female patients with a previous diagnosis of low squamous intraepithelial lesion (LSIL), high squamous intraepithelial lesion (HSIL), normal and cancer (CC) by Papanicolaou (PAP), to which underwent DNA extraction using the extraction protocol phenol/chloroform (1:1) modified. Detection and typing of viral genotypes was carried out by conventional PCR and nonradioactive hybridization.

Result: HPV frequency was increased according to the gravity of cervical lesion (Normal 20%, LSIL 85,7%, HSIL 88,3% and CC 93,8%). The HPV16 was the principal genotype, in single infections and the multiple infections.

Conclusion: Using Techniques of amplification and hybridization is possible to detect and genotype HPV in urine samples, positioning this technique as a possible complementary method to PAP.

1. INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cervicouterino (CCU) es un importante problema de salud pública, siendo la segunda neoplasia más prevalente en mujeres a nivel mundial y la quinta causa de muerte por cáncer en esta población. Anualmente se detectan alrededor de 529.000 nuevos casos de los cuales aproximadamente la mitad morirá. En Chile, ocupa el sexto lugar como causa de muerte por tumores malignos en la mujer, y en el año 2008 se estimó una incidencia de 14,4 casos por cada 100.000 mujeres. Anualmente se diagnostican 1.478 casos, con 721 muertes, correspondiendo a una tasa de mortalidad de 6,6 por cada 100.000 mujeres. El virus papilloma humano (HPV por sus siglas en inglés) es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial y el factor etiológico de CCU, presentándose en el 99,7% de los casos. Actualmente la técnica más utilizada para la detección precoz del CCU es el Papanicolaou (PAP), el cual ha contribuido de manera importante a la reducción de la incidencia y mortalidad. A pesar de la gran utilidad que otorga, el PAP no permite identificar todos los casos, por lo que la búsqueda de metodologías complementarias altamente sensibles y con alto valor predictivo, se ha vuelto una importante necesidad clínica.

Varios estudios mencionan la utilidad de la tipificación de HPV como marcador predictivo en la carcinogénesis cervical uterina, debido a la alta presencia de DNA viral en muestras de pacientes con algún tipo de lesión o cáncer y su baja o nula frecuencia en pacientes normales. Estos estudios han sido realizados en material fresco obtenido del cepillado del cuello uterino (Citobrush), material obtenido durante el examen del PAP. A pesar de los buenos resultados alcanzados aun es necesario implementar un sistema de detección de HPV en un tipo de muestra de fácil acceso y de menor grado de invasividad como es la orina, debido a que un alto porcentaje de las mujeres sexualmente activas no acude a los controles ginecológicos por pudor. Esto permitiría seleccionar mujeres con mayor riesgo de desarrollar una lesión cervical uterina, las cuales posteriormente deberían realizarse el examen citológico (PAP).

Debido a lo expuesto anteriormente es que el objetivo de este estudio fue estandarizar un método eficiente para la detección y genotipificación de Virus Papiloma Humano en muestras de orina, como marcador predictivo en la carcinogénesis cervical uterina, lo que contribuiría a tomar decisiones adecuadas en pacientes normales y/o con lesiones preneoplásicas e invasoras (cáncer) del cuello uterino. La utilidad de esta técnica sería tanto a corto como a largo plazo. A corto plazo, al tomarlo como un método de seguimiento de pacientes y decisión terapéutica, y a largo plazo, reduciendo potencialmente las tasas de cáncer uterino presente en la población.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cáncer Cervicouterino y Lesiones Preneoplásicas.

A nivel mundial el CCU es un importante problema de salud pública. Anualmente se detectan alrededor de 529.000 nuevos casos de los cuales aproximadamente la mitad morirá. Debido a esto CCU es considerada la segunda neoplasia con mayor prevalencia en la población femenina y la segunda causa de muerte por cáncer en dicha población (Ault, 2006; Jastreboff y Cymet, 2002; Janicek y Averette, 2001; Chan y Berek, 2007; Burd, 2003; Boot, *et al.*, 2007; Peralta-Zaragoza, *et al.*, 2012). La prevalencia de CCU y de cada una de sus etapas precursoras es altamente elevada, principalmente en países subdesarrollados (Ault, 2006; Burd, 2003; Chan y Berek, 2007; Janicek y Averette, 2001). En Chile, ocupa el sexto lugar como causa de muerte por tumores malignos en la mujer, con una incidencia de 14,4 casos por cada 100.000 mujeres y una tasa de mortalidad de 6,6 casos por cada 100.000 mujeres (Ferlay, *et al.*, 2010). En la región de La Araucanía constituye la tercera causa de muerte por cáncer, desplazando el cáncer de mama, descrito a nivel mundial como el más frecuente, a un cuarto lugar (Brebí, *et al.*, 2009). Aun se desconoce la incidencia de las lesiones preinvasoras (Signos de HPV, NIE y Carcinoma in situ [CIS]), pero según lo planteado por el Ministerio de Salud, anualmente se diagnostican alrededor de 11.000 nuevos casos (MINISTERIO DE SALUD, 2005).

El cuello uterino o cérvix se encuentra tapizado por dos tipos de epitelios, el exocervical (también conocido como escamoso o pavimentoso) y el endocervical (conocido como epitelio columnar), el cual es cilíndrico mucosecretor. El sitio de unión de ambos epitelios es muy variable, ya que está relacionado con la edad, y depende en gran parte de la acción de hormonas ovárica, de la menarca, del coito y del embarazo. Dicho sitio de unión entre ambos epitelios se llama zona de unión escamo-columnar (UEC) y consiste en un área dinámica, sujeta a fenómenos proliferativos y de remodelación que transforman el epitelio cilíndrico mucosecretor en epitelio pavimentoso (De Ruíz, *et al.*, 2005). Estos dos epitelios pueden verse afectados durante el transcurso de la vida desarrollando un CCU. Dentro de los tipos de CCU se encuentran: el tipo

escamoso o epidermoide (SCC), presente en el 90% de los casos, y el adenocarcinoma (ACC), el cual afecta al epitelio glandular del cérvix y que abarca aproximadamente el 10% de los CCU (Hemminki, *et al.*, 2002).

Según la definición otorgada por el Ministerio de Salud de Chile, el CCU corresponde a una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que se pueden suceder en etapas de displasia leve, moderada y severa, las que pueden evolucionar a cáncer in situ (circunscrito a la superficie epitelial) y/o a cáncer invasor, en el que se logra traspasar la membrana (MINISTERIO DE SALUD, 2005).

La patogénesis del cáncer cervico uterino se inicia como un proceso paulatino que involucra la interrupción de la diferenciación normal del epitelio escamoso, produciendo con ello cambios en la estructura y fisiología de este (Figura 1) (Saavedra, *et al.*, 2012). A consecuencia de la infección por HPV, se desarrollan displasias en las células cervicales, manifestándose esto a través de alteraciones en la forma, tamaño y organización del epitelio (Jastreboff y Cymet, 2002; Burd, 2003; Saavedra, *et al.*, 2012; Trottier y Franco, 2006; Jung, *et al.*, 2004; Allan, *et al.*, 2006). Por mucho tiempo se ha establecido la infección persistente de virus papiloma humano de alto riesgo como agente causal de CCU, debido a que se encuentra presente en aproximadamente el 99,7% de los casos. Sin embargo, últimos estudios han dilucidado que la sola infección persistente por HPV no es suficiente para inmortalizar y transformar células epiteliales, también se requieren alteraciones genéticas y epigenéticas para el desarrollo de la carcinogénesis, con lo cual estos tres factores, en conjunto, pueden alterar el control del ciclo celular, provocando que la célula huésped adquiera un fenotipo inmortal y avance a un fenotipo maligno e invasivo (Saavedra, *et al.*, 2012). Actualmente, las lesiones cervicales se clasifican como neoplasias intraepiteliales o NIE, considerando los tipos I, II y III. Las NIE y el carcinoma in situ (CIS) se limitan al epitelio, sin traspasar la lámina basal (Jastreboff y Cymet, 2002; Burd, 2003; Woodman, *et al.*, 2007; Allan, *et al.*, 2006; Jung, *et al.*, 2004; Trottier y Franco, 2006), sin embargo, cuando la lesión traspasa la lámina basal y se dirige hacia el estroma del tejido se

denomina carcinoma invasor (Woodman, *et al.*, 2007). A su vez, existe una segunda clasificación para las lesiones intraepiteliales, la cual toma como base el grado de progresión y regresión que presente el epitelio. Dentro de esta nueva clasificación es posible encontrar las lesiones de bajo grado (LBG) y alto grado (LAG) en las cuales se encuentran insertas las neoplasias intraepiteliales tipo I (NIE I) e infecciones con HPV (en el caso de LBG), y las neoplasias intraepiteliales tipo II, III y carcinoma in situ (en el caso de LAG). Aproximadamente el 11% de las NIE I progresan a CIS y el 1% a cáncer invasivo (Jastreboff y Cymet, 2002; Trottier y Franco, 2006), y alrededor del 57% tiene una regresión a citología normal. Las lesiones de alto grado presentan una mayor tasa de progresión a CCU, estimándose en un 43% a 70% (Chan y Berek, 2007; Jung, *et al.*, 2004; Trottier y Franco, 2006). Todos estos porcentajes de progresión o regresión de lesiones intraepiteliales varían de acuerdo a la región geográfica en la cual se presenten, el grado de educación de la población, y los programas orientados a la prevención y detección implementados en cada país (Janicek y Averette, 2001).

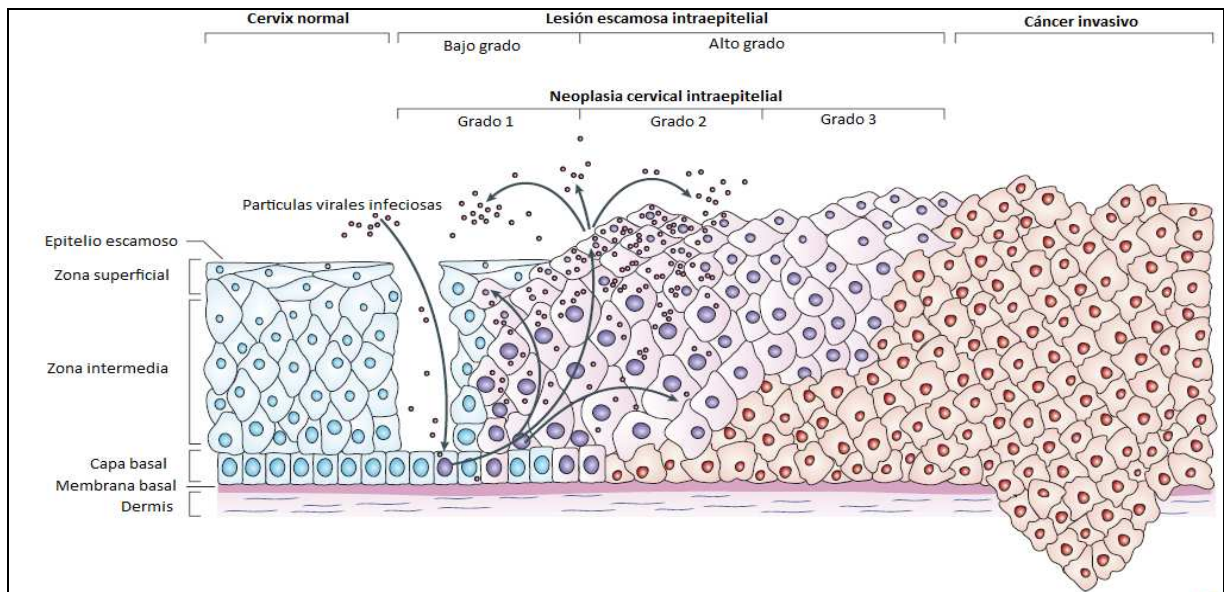


Figura 1. Progresión de cáncer cervicouterino mediado por HPV. Adaptado de Woodman *et al.* (2007). El HPV accede a las células basales por medio de microlesiones presentes en el tejido cervical. El virus se mantiene en forma de episoma con un bajo número de copias (células con núcleo púrpura). Las células de la capa basal se dividen y empiezan a migrar hacia la superficie. Las lesiones no tratadas progresan a cáncer microinvasor e invasor, en donde el genoma del HPV se asocia con el genoma de huésped (células con núcleos rojos). En la zona superficial el DNA viral es empaquetado en cápsides y la progenie es liberada para reiniciar la infección.

Actualmente el método de tamizaje utilizado para la detección de células anormales o neoplasias cervicales es la tinción de Papanicolaou (PAP), también conocida como citología vaginal (Burd, 2003; Janicek y Averette, 2001; Allan, *et al.*, 2006; Canadas, *et al.*, 2006). Este método ha sido el pilar para la prevención de cáncer cervical en los últimos 50 años y ha dado lugar a la reducción de la incidencia y mortalidad del CCU a nivel mundial, razón por la cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado este método para la detección de cáncer de cuello uterino en mujeres sexualmente activas (Lorincz y Richart, 2003; Patro y Nongkynrih, 2007). Sin embargo, este método presenta problemas en cuanto a su sensibilidad, estimándose en el rango del 50% a 60% en el contexto del seguimiento de rutina (Lorincz y Richart, 2003). Otro de los problemas asociados al PAP es el significativo porcentaje de falsos negativos, cuya tasa equivale al 20% a 30% de los frotis examinados dependiendo del laboratorio en el cual se realice. Además, al ser una técnica de detección indirecta del HPV, no permite la tipificación viral, importante información al momento de categorizar en subgrupos a los pacientes desde una perspectiva clínica (Melo, *et al.*, 2005).

Mediante citología también es posible observar células atípicas del epitelio escamoso y que tienen una significancia indeterminada (ASCUS, por sus siglas en inglés), lo que es atribuido a indicios de infección por HPV sin que se desarrolle displasia, dificultando la clasificación de estas anomalías y la determinación de su importancia en el epitelio cervical (Janicek y Averette, 2001; Jastreboff y Cymet, 2002). Aunque esta patología puede detectarse precozmente, continúa siendo la causa de muerte más frecuente en mujeres entre 35 y 54 años.

Si bien la principal asociación a la infección por HPV es el cáncer cervical, también existen otros cánceres asociados a dicha infección como es el caso del cáncer vaginal, el cual presenta variadas similitudes con el de cuello uterino, siendo una de ellas el genotipo de mayor frecuencia correspondiente a HPV-16, cuya prevalencia se encuentra presente entre un 64% a 91% a nivel mundial (Shukla, *et al.*, 2009). En relación al cáncer vulvar, la mayor incidencia se estipula en poblaciones europeas, siendo los principales tipos de HPV asociados a cáncer vulvar y sus lesiones precursoras (VIN) los de alto riesgo, principalmente HPV-16, 31 y 33 (Shukla, *et al.*,

2009). Según lo planteado por STATBITE, los principales tipos de HPV de alto riesgo asociados a cáncer anogenital, corresponderían a HPV-16, 18, 31 y 45. Aproximadamente el 90% de los cánceres anales, la mitad de los vulvares, vaginales y de pene, y alrededor del 12% de los cánceres orofaríngeos (cavidad oral y garganta) se encontrarían asociados a infecciones por HPV (StatBite, 2010).

2.2 Virus Papiloma Humano

El HPV es un virus perteneciente a la familia de los papilomavirus (Zea-Mazo, *et al.*, 2010), de pequeño tamaño (8000 pb aproximadamente y 55nm de diámetro), sin envoltura, de doble hebra y con un DNA dispuesto de manera circular, en el cual sólo una de sus hebras se transcribe activamente (Shetty, *et al.*, 2005). Las partículas de los viriones de HPV constan de 72 capsómeros, y cada capsómero corresponde a un pentámero de la proteína principal de la cápside (L1). Además, existen algunas copias de la proteína de la cápside menor (L2) (Giroglou, *et al.*, 2001). El genoma del HPV se encuentra dividido en tres porciones principales: una de aproximadamente 4-kb denominada región temprana (E) que codifica proteínas no estructurales, una región tardía (L) de aproximadamente 3-kb que codifica las dos proteínas de la cápside, y una región control (LCR) de aproximadamente 1-kb no-codificante que contiene una serie de elementos *cis* que regulan la replicación y expresión génica (Munger, *et al.*, 2004).

La región LCR contiene un centro promotor llamado p97 que permite potenciar o silenciar secuencias que regulan la replicación del DNA mediante el control de la transcripción de los marcos de lectura abiertos (ORFs). Además esta región separa ambos grupos de genes, región temprana y región tardía, y a pesar de no ser codificante, contiene elementos *cis* necesarios para la regulación de la expresión génica, replicación del genoma y empaquetamiento de las partículas virales (Munoz, *et al.*, 2006). Además esta región contiene la mayor variación genética entre un tipo viral y otro (Burd, 2003).

La región tardía codifica dos proteínas, L1 y L2, relacionadas con la creación de la cápside viral y la síntesis de nuevos viriones envasados (Lin, *et al.*, 2010). Las proteínas estructurales L1 y L2, son proteínas de 43-53 KDa y 57 KDa, respectivamente, y son las responsables de formar los capsómeros, siendo la proteína L1 la cual representa la mayor parte de la partícula viral (aproximadamente el 80%) (López y Lizano, 2006; Wang, 2007).

La región temprana del genoma de HPV codifica para las primeras 6 proteínas, E1, E2, E4, E5, E6 y E7, relacionadas con la regulación de la replicación del DNA y la proliferación celular (Paavonen, 2007; Thomison, *et al.*, 2008). El gen E1 es un gen de aproximadamente 2 Kb y 67,5 a 76,2 KDa, el cual codifica para una proteína nuclear de 593 a 681 aminoácidos. En tanto, E2 codifica para una proteína de 1100 pb y de aproximadamente 45 KDa (López y Lizano, 2006). E1 y E2 participan en el mantenimiento episomal, además, cada uno actúa en la regulación ascendente (up-regulation) de la replicación del genoma y reprimiendo la expresión de E6 y E7 respectivamente (Thomison, *et al.*, 2008). E2 se asocia a los genomas virales con los cromosomas celulares en mitosis, procurando con ello que los genomas virales no se pierdan durante la división celular (Negroni, 2009). La secuencia codificante de E4, de aproximadamente 260 pb, codifica para una proteína de alrededor de 10 a 44 KDa, mientras que el gen E5 (de aproximadamente 230 a 250 pb), codifica para una proteína de 90 aminoácidos cuyo peso molecular es de 14 KDa (López y Lizano, 2006). E2, E4 y E5 forman parte de la transcripción viral, E4 se vincula a la producción de la proteína L2 de la cápside e interrupción de los filamentos de citoqueratina desestabilizándolos facilitando la liberación de partículas virales (Negroni, 2009) en tanto, E5 estimula los receptores del factor de crecimiento del huésped y participa en el proceso de replicación viral (Thomison, *et al.*, 2008). El gen de la proteína E6 es de aproximadamente 450 a 500 pb y cuya proteína, de casi 150 aminoácidos, presenta un peso molecular de 16 a 18 KDa. En tanto, E7 corresponde a un gen de 300 a 320 pb, el cual codifica para una proteína de 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 KDa (McLaughlin-Drubin y Munger, 2009; López y Lizano, 2006). E6 y E7 actúan en la replicación y transformación viral, además de la regulación ascendente del ciclo celular. E6 se involucra en la regulación descendente (down-regulation) de p53, Bak y Bax, en tanto, E7 en la regulación descendente de pRb (proteína retinoblastoma) (Thomison, *et al.*, 2008).

En cuanto a la relación de estas proteínas con HPV de alto grado de malignidad, la inserción celular es llevada a cabo por el gen E2 (regulador maestro del genoma viral y represor transcripcional de los genes E6 y E7) (Lin, *et al.*, 2010), el cual sufre deleciones, generándose la pérdida del mismo (Negroni, 2009). La pérdida de E2 provoca la liberación de la expresión de los genes E6 y E7, ahora llamados oncogenes (McLaughlin-Drubin y Munger, 2009), los cuales son capaces de inactivar al supresor tumoral p53 y retinoblastoma, llevando con ello a la inestabilidad genómica y la represión de la apoptosis (Lin, *et al.*, 2010), generando con esto la acumulación del DNA mutado e inhibiendo el control del ciclo celular, con lo cual la célula se immortaliza entrando permanentemente al ciclo celular (Negroni, 2009).

Se han descrito más de 200 tipos virales, de los cuales aproximadamente 40 presentan tropismo positivo por el área anogenital y mucosas, los que pueden ser agrupados en HPV de alto riesgo y bajo riesgo oncogénico, dependiendo de su asociación con lesiones de alto grado o carcinomas invasores (Paavonen, 2007). Los HPV de bajo riesgo incluyen los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 entre los más frecuentes. De ellos los más importantes son los tipos 6 y 11 asociados principalmente al desarrollo de condilomas en hombres y en mujeres. Los HPV de alto riesgo que se consideran potencialmente oncogénicos por su presencia en lesiones de alto grado y carcinomas, son los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82. Los genotipos virales más frecuentes en los CCU son, HPV 16 que está asociado al 50% - 60% de todos los cánceres y HPV 18 que es observado en el 15% - 20% (Velázquez-Márquez, *et al.*, 2009; McDonald, *et al.*, 2012; López, *et al.*, 2010).

2.2.1 Patogénesis del Virus Papiloma Humano. Para que se inicie el proceso de infección del virus papiloma humano en la célula huésped debe existir un microtrauma en el epitelio genital, caso que se da durante el coito sexual, con lo cual el HPV invade la capa basal de la epidermis genital (Tchernev, 2009). Con la finalidad de infectar las células diana del huésped, el HPV se une a receptores específicos en la superficie celular, penetrando la membrana plasmática, por intermedio de un mecanismo aun desconocido, y orientando su genoma al núcleo de la célula huésped (Bousarghin, *et al.*, 2003). El mecanismo de entrada por el cual el virus atraviesa la

membrana plasmática y llega al citoplasma pareciera estar vinculado a la presencia de heparan sulfato, el cual se encuentra en la superficie celular permitiendo la unión del pseudovirion. Esta interacción sería un pre requisito para el éxito de la infección y posterior unión al receptor (Giroglou, *et al.*, 2001). La internalización del virus papiloma ocurre a través de dos vías principales, la primera es por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina (mecanismo utilizado por los genotipos virales HPV16 y 18), y el segundo a través de un complejo protéico encabezado por caveolina (observado en la infección por HPV31 (Day, *et al.*, 2003; Anderson, 1993). Una vez dentro de la célula, el virión de HPV genera cambios en los cuales, debido al ambiente reductor del citoplasma, pasará a la conformación 230S, y de manera posterior ocurrirá la proteólisis de la terminal carboxi de L1, liberando con ello el genoma de la cápside para iniciar la infección. Las señales biológicas para el montaje y desmontaje son programadas por la química de la formación de la cápside (Li, *et al.*, 1998).

La replicación del DNA viral comienza al momento de la interacción entre los factores de transcripción de la célula huésped y la región LCR del virus. Con lo cual, una vez que el genoma del HPV se integra al genoma de la célula huésped ocurre la interrupción de las regiones codificantes para los genes E1 y E2, resultando en la pérdida de la expresión del gen viral E2 (responsable de la represión de los genes virales E6 y E7), provocándose la transcripción y libre expresión de E6 (supresor de la actividad apoptótica de p53) y E7 (responsable de la represión de pRb, lo cual permite la sobreexpresión del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (p16^{INK4A}), desencadenándose la inestabilidad genómica), con lo cual se genera la acumulación del DNA mutado y se inhibe el control del ciclo celular, provocando la inmortalización celular, la cual entra permanentemente en el ciclo celular (Lin, *et al.*, 2010; Negroni, 2009; McLaughlin-Drubin y Munger, 2009; Saavedra, *et al.*, 2012). La relación entre tipos virales de alto riesgo (como HPV16 y 18) y el desarrollo de CCU se encuentra dada tanto por la alta afinidad que presentan las proteínas virales E6 y E7 con las proteínas p53 y pRb de la célula, como por la capacidad de integración que presenta el genoma viral en el genoma celular (Motoyama, *et al.*, 2004). Las proteínas L1 de la cápside del HPV parecen tener un rol importante en cuanto a la infección del virus a la célula huésped, principalmente porque su presencia se evidencia dos veces durante el ciclo de vida del virus: la primera ocurre inmediatamente después de que los viriones infectan las

células epiteliales proliferantes indiferenciadas, y la segunda, cuando las proteínas L1 y L2 recién sintetizadas montan el replicado del DNA genómico de HPV en viriones infecciosos dentro de los núcleos de las células epiteliales diferenciadas en su fase terminal (Nelson, *et al.*, 2002).

Cabe destacar, que los papilomavirus son el único grupo del cual se sabe que su proceso infeccioso se inicia en un sitio extracelular. El proceso infeccioso es notablemente lento y asincrónico, tomando alrededor de 12 a 24 hrs para la iniciación de la transcripción (Schiller, *et al.*, 2010).

2.2.2 Epidemiología del Virus Papiloma Humano. El HPV es una de las infecciones de transmisión sexual más comunes a nivel mundial, afectando tanto a hombres como mujeres. Entre las mujeres con citología cervical normal, la prevalencia de HPV, en muestras de biopsias y/o raspado de cuello uterino (citobrush), se encuentra cercana al 14,3% de la población en regiones menos desarrolladas y en un 10,3% en las más desarrolladas, siendo para ambas regiones la máxima prevalencia observada en mujeres menores de 25 años, y en mujeres entre los 35 a 50 años la máxima prevalencia del virus varía según continente. En cuanto a los hombres, la prevalencia del HPV en genitales es muy variable, siendo el rango estimado para dicha prevalencia entre el 6% al 72% según sea la población estudiada. La mayor parte de la población sexualmente activa se estima presentará durante su vida alguna infección por HPV (Bonnez y Lindeque, 2011).

HPV se presenta en un momento dado de la vida de la mujer, con una mayor prevalencia en mujeres africanas y latinoamericanas (22,1% y 20,4%, respectivamente) en comparación con asiáticas (8%). Sin embargo, estudios han demostrado que alrededor del 75% de la población femenina sexualmente activa presenta antecedentes de infección genital por HPV (Palmer, *et al.*, 2009). HPV es el principal responsable de lesiones en la piel como son las verrugas anogenitales, ampollas y actualmente, patologías como el cáncer cervical (Zea-Mazo, *et al.*, 2010). Es bien sabido que los adultos jóvenes sexualmente activos son más propensos de contraer la

infección por HPV y de forma especial, la población femenina, como se mencionó con anterioridad, siendo la principal afectada y cuyo rango de edad de mayor prevalencia es aquel concentrado entre las mujeres menores de 25 años y peri o post-menopáusicas (Trottier y Franco, 2006). En hombres, el 80 a 85% de los cánceres anales y cerca del 50% de los cánceres de pene se encuentran asociados a infecciones por HPV siendo el genotipo predominante HPV16, en tanto en mujeres, el DNA de HPV se encuentra frecuentemente asociado con cáncer vulvar, 36-40% y cerca del 90% de los cánceres vaginales. Los genotipos predominantes en enfermedades benignas son HPV6 y 11 (Giuliano, *et al.*, 2008). La prevalencia global de infecciones por HPV, en mujeres con citología normal se ha estimado en un 10,5%, sin embargo esto puede variar dependiendo de la región geográfica en la cual se estime el porcentaje, llegando a existir diferencias de hasta 20 veces en distintas poblaciones, como es el caso de España con un 1,4% de mujeres con citología normal e infección por HPV, y Nigeria con un 25,6% de infecciones por HPV bajo la misma condición (citología normal) (Velázquez-Márquez, *et al.*, 2009).

Existen factores que aumentan el riesgo de contraer una infección por HPV y/o desarrollar cáncer cervical, dentro de los cuales podemos encontrar: la edad temprana de la primera relación sexual, la paridad elevada, las múltiples parejas sexuales, frecuencia de las relaciones sexuales, presencia de verrugas genitales en parejas sexuales, inmunosupresión del individuo (co-infección con VIH), y uso de anticonceptivos orales (aumentan riesgo de progresión de la enfermedad en pacientes ya infectados) (Domingo, *et al.*, 2008; Koutsky, 1997). También existen otras formas no sexuales de transmisión del HPV como son: 1) transmisión vertical y perinatal del HPV de madre a hijo en tasas bajas, 2) transmisión transplacental a través del líquido amniótico, sangre del cordón umbilical, placenta, 3) posible transmisión horizontal (particularmente de los tipos de bajo riesgo) (Bosch, *et al.*, 2006).

En relación a la infección por HPV el epitelio genital intacto es resistente a infecciones por el virus, es por ello que para iniciar una infección las partículas de HPV deben moverse a la superficie de la célula epitelial a través de pequeños desgarros en la piel o mucosa genital (Wang, *et al.*, 2010). En cuanto a la eliminación natural del virus, el tiempo medio para eliminar

infecciones con subtipos no oncogénicos de HPV es alrededor de los 5 meses y, para aquellos subtipos oncogénicos entre 8 a 12 meses, siendo según literatura, alrededor de un 81% de mujeres infectadas con HPV las que se liberan del virus luego del primer año de infección y posterior al diagnóstico en un tiempo medio de 19 meses (Rosa, *et al.*, 2008).

En diversos estudios se ha encontrado en biopsias testiculares de hombres con azoospermia y aparentemente en células de espermatozoides infecciones por HPV, lo que podría estar relacionado con problemas de movilidad de espermatozoides y astenozoospermia, además de actuar como un posible reservorio del virus considerando un factor masculino en la transmisión sexual del HPV (Pellati, *et al.*, 2008; Martorell, *et al.*, 2005). Estudios realizados por Pérez-Andino, *et al.*, (2009) demostraron que los espermatozoides pueden servir como vehículos para la dispersión y penetración por HPV a la mucosa cervical, uniéndose a la superficie de la cabeza de espermatozoides, y a su vez plantearon que el bloqueo de las interacciones entre el HPV16 y células espermáticas pudiesen servir como estrategias para el desarrollo de terapias antivirales (Perez.Andino, *et al.*, 2009).

2.2.3 Epidemiología del Virus Papiloma Humano en orina. Según lo planteado en la literatura, la base para la utilización de orina, como muestra no invasiva para la detección de HPV, es que la pared epitelial del cuello uterino y/o la vagina de forma normal eliminan células exfoliadas a través de la orina (células implicadas en la detección de HPV), con lo que las células trituradas debieran contener genomas virales, viriones, incluyendo genomas de otros organismos infecciosos con lo cual, pudiese ser posible la detección de HPV en muestras de orina (Prusty, *et al.*, 2005). En relación a las tasa de detección de HPV en orina, suelen ser muy similares a las encontradas en muestras de cepillado de cuello uterino, estudios realizados en pacientes femeninas infectadas con VIH presentan una tasa de detección de HPV que varía entre un 80% a un 90%, ya sea en muestras cervicales o de orina, y cuyos principales genotipos detectados son HPV16 y 53, principalmente HPV16, seguidos por los genotipos virales 6, 62, 74 y 54 (Brinkman, *et al.*, 2002; Jong, *et al.*, 2008; Tanzi, *et al.*, 2013). En tanto, DNA de HPV puede ser detectado en muestras de orina de mujeres con pre-cáncer y cáncer cervical, observándose al

genotipo HPV16 como el predominante en pacientes con cáncer, en porcentajes que rodean el 70% (Gupta, *et al.*, 2006; Prusty, *et al.*, 2005). Existe una alta coincidencia de positividad en la detección de HPV entre muestras de orina y cepillados cervicales.

En la población masculina igualmente se han realizado estudios en los que se logró detectar HPV mediante muestras de orina. Golijow, *et al.*, (2005) observó (en hombres con lesiones en el pene o con parejas sexuales infectadas por HPV) que a través de muestras de DNA extraídas desde orina y analizadas mediante PCR anidada utilizando los cebadores tradicionales MY09/11 y GP05/06, en conjunto con SSCP (polimorfismo de conformación de cadena sencilla), fue posible detectar la presencia de HPV de alto riesgo en un 73% de la población masculina estudiada sugiriendo con ello que HPV puede ser transportado por la orina, probablemente en las células exfoliadas (tal como se mencionó anteriormente) infectadas por HPV, mecanismo que se asemeja al ocurrido en la eyaculación, donde es posible la transmisión del virus albergado en las células espermáticas del tracto genital masculino mediante la transmisión sexual (Golijow, *et al.*, 2005).

Existen algunas consideraciones al momento de trabajar con muestras de orina puesto que, la presencia de algún tipo de molécula inhibidora y el método de extracción de DNA influyen en la eficiencia de la amplificación por PCR, tales moléculas, como nitritos o urea que permanecen como remanentes en la orina, disminuyen la tasa de amplificación de PCR. Otro factor a considerar es la refrigeración de la muestra, puesto que en las que han permanecido durante toda una noche a 4°C, se mejora la detección de HPV (Golijow, *et al.*, 2005). Otros estudios demostraron que la detección de HPV por PCR llevada a cabo en forma simultánea en muestras de orina y raspado cervical no evidencia ninguna diferencia en cuanto a positividad o negatividad de las muestras para HPV, con lo que se demuestra que la detección de ADN de HPV mediante PCR en muestras de orina es un método conveniente, no invasivo para el diagnóstico a gran escala de HPV (Gupta, *et al.*, 2006).

2.3 Técnicas de detección del Virus Papiloma Humano

2.3.1 Captura Híbrida. Captura híbrida es uno de los métodos más utilizados para la detección de HPV y el cual se basa en la hibridación de sondas de RNA en solución con DNA de HPV presentes en muestras biológicas, utilizando para ello dos tipos de sondas, una para HPV de alto riesgo que incluye 13 tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y otra para el grupo de HPV de bajo riesgo que incluye 5 tipos (6, 11, 42, 43 y 44) (WHO Consultation on Cervical Cancer Screening, *et al.*, 2002; Tatti, 2011; Collado, *et al.*, 2008). Los híbridos inmovilizados reaccionan con un derivado de RNA-DNA del anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina y se detectan mediante la adición de un sustrato quimioluminiscente colocados en placas (Captura híbrida II) (Tatti, 2011). El uso más común de esta técnica sólo sirve para discriminar entre tipos virales de alto y bajo riesgo, pero no es capaz de diferenciar el genotipo específico al cual corresponde (Lorincz y Richart, 2003). Éste método se encuentra aprobado para su uso diagnóstico por la FDA (*Food and Drug Administration*) (Jenkins, 2007), sin embargo, se ha demostrado en diversos estudios la presencia de un número importante de falsos negativos, además de presentar una sensibilidad mucho menor que la mayoría de las técnicas de amplificación (Martinez, 2010).

2.3.2 Reverse Line Blot (RLB). La técnica de RLB es una técnica de detección de HPV altamente eficiente, eficaz y económica de llevar a cabo, la cual es capaz de identificar en un mismo ensayo 38 genotipos distintos del virus del HPV. Además, es más sensible y específica para la detección, que aquellas técnicas basadas en enzimas de restricción y dot blot (Brebí, *et al.*, 2009). Reverse line blot es un método que utiliza un sistema previo de amplificación sensible y de amplio espectro (PCR), seguido por una hibridación simple (propia del método) en línea reversa con la finalidad de discriminar de forma completa genotipos de HPV. Este método evita los falsos negativos y posee la capacidad de detectar fácilmente un amplio espectro de genotipos de HPV, además define con precisión la enfermedad producida por HPV tipo-específico debido a que los genotipos son individualmente discriminados (Gravitt, *et al.*, 1998). Van den Brule, *et al.*, (2002), en su ensayo propuesto para la tipificación de genotipos de HPV de manera simplificada,

estableció el uso de un sistema miniblatter para tipificar productos de PCR de GP5+/6+ derivados de hasta 42 muestras de pacientes distintos simultáneamente por membrana de hibridación. Además, comprobó que en éste método modificado es posible extraer y re-hibridar la misma membrana al menos 15 veces sin que ésta manifieste pérdida de señal, con lo que el costo de la técnica disminuyó considerablemente (Van den Brule, *et al.*, 2002).

2.3.3 PCR real time. Estudios realizados en los últimos años establecieron un PCR consenso que permite amplificar una región altamente conservada del principal gen viral de la cápside (L1), ya que es potencialmente capaz de detectar todos los HPV en mucosa con una alta sensibilidad y especificidad (WHO Consultation on Cervical Cancer Screening, *et al.*, 2002).

La PCR es un método *in vitro* que permite amplificar secuencias de DNA específicas más de un millón de veces en unas pocas horas por medio de una reacción enzimática dirigida por un cebador. PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional que utiliza, además de la mezcla establecida para PCR (DNA molde, cebadores, dNTPs, tampón, DNA polimerasa), una sustancia marcada con un fluoróforo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos mediante la detección en tiempo real de la fluorescencia. La cantidad de material fluorescente liberado es proporcional a la cantidad del producto generado (Tatti, 2011). Los Primers mayormente utilizados actualmente para PCR real time son: PGMY09/11, GP5+/GP6+ y SPF10, y su principal ventaja reside en que permite identificar el tipo específico de HPV (Collado, *et al.*, 2008). El ensayo de PCR real time es una herramienta fiable, sensible y específica para la detección de HPV y sus diversos genotipos, tanto en muestras de tejido específicos como en muestras celulares, a su vez, presenta ventajas como son: detección de carga viral, detección de diferentes ácidos nucleicos en un mismo ensayo, y la alta sensibilidad que presenta, lo que hace posible detectar concentraciones muy pequeñas de ácidos nucleicos (Abreu, *et al.*, 2012).

2.3.4 Inmunohistoquímica (IHQ). La inmunohistoquímica se define como un conjunto de técnicas cuya base es el uso de anticuerpos marcados que permiten asociar la visualización microscópica de detalles tisulares y celulares, con la detección de moléculas concretas en la muestra. Esta detección es llevada a cabo por medio de una reacción antígeno-anticuerpo, que se realiza directamente sobre el tejido en el portaobjeto correspondiente y es visualizada a través del revelado con una sustancia cromógena (por ejemplo: diaminobencidina), lo cual hace posible su observación directa al microscopio . Esta técnica se ha empleado para detectar una serie de factores asociados a carcinogénesis cervical como p16, EGFR y COX-2 con lo cual ha permitido un enfoque integral para la progresión de la lesión intraepitelial escamosa, asociada o no con la infección por VPH (Balan, *et al.*, 2011; Liu, *et al.*, 2007). También se ha empleado ésta técnica para la detección de genotipos virales de HPV por medio de anticuerpos monoclonales que reaccionan con un polipéptido principal de la proteína de la cápside VPI ampliamente expresado entre los diferentes tipos de HPV, sin embargo, los resultados obtenidos no han logrado ser significativamente relevantes para la detección de HPV (Sen, *et al.*, 2007). En tanto, otros estudios, abocados a la detección de HPV en el campo de la oftalmología, se han realizado a través de éste método en conjunto con técnicas como la hibridación *in situ* y PCR (Nakamura, *et al.*, 1997).

2.4 Vacunas para Virus Papiloma Humano.

Actualmente existe el desarrollo de dos tipos de vacunas contra HPV: vacunas profilácticas para la prevención de la infección por HPV y enfermedades asociadas, y las vacunas terapéuticas destinadas a inducir la regresión de las lesiones precancerosas o remisión del cáncer cervical avanzado, siendo este último tipo de vacuna considerada no como una estrategia de prevención si no como un método terapéutico, por lo que los avances sólo se revocan a las vacunas profilácticas (Franco y Harper, 2005). La vacunación profiláctica se debe administrar antes de ocurrir la infección por HPV con el fin de proporcionar al sistema inmune una pauta de reconocimiento y prevención a la entrada del virus antes de dicha infección o establecimiento de la enfermedad en el huésped, todo esto a través del desarrollo de anticuerpos neutralizantes del virus dirigidos

contra las proteínas de la cápside L1 y L2, que desempeñan un papel en la entrada viral (Wang, 2007). El enfoque más exitoso para la generación de una vacuna profiláctica contra HPV ha sido el uso de partículas no infecciosas similares a virus (VLPs), compuestas de la proteína L1 de la cápside mayor del virus y que se ha demostrado, mediante modelos animales, son potentes inmunógenos que pueden inducir protección contra la exposición del virus y lesiones asociadas (Schwarz y Leo, 2008). GlaxoSmithKline y Merck han desarrollado actualmente las principales vacunas disponibles en el mercado (Cervarix y Gardasil) enfocadas en la prevención de infecciones persistentes por HPV, cuyo enfoque se centra en vacunas profilácticas como método preventivo de dicha infección y cuya base se encuentra en la proteína de cubierta L1 del virus. Ambas vacunas contienen los tipos HPV16 y 18, que representan el 70% del cáncer cervical a nivel mundial, en tanto la vacuna desarrollada por Merck también incluye los tipos 6 y 11 involucrados en el 90% de las verrugas genitales (Shaw, 2005). La respuesta de anticuerpos generada por Cervarix y Gardasil se encuentra restringido a los genotipos de HPV contenidos en dichas vacunas, sin embargo existe una protección cruzada de bajo nivel contra otros genotipos estrechamente relacionados como son HPV45 y 31 (Lin, *et al.*, 2010). Existen estudios en los cuales, se ha demostrado que vacunas recombinantes tetravalentes para HPV ofrecen un 98% a 100% de protección contra incidentes de neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN) y verrugas anogenitales positivas para los cuatro tipos de HPV específicos presentes en dicha vacuna (genotipos 6, 11, 16 y 18), con una eficacia sostenida de alrededor de 5 años de seguimiento a pacientes (Insinga, *et al.*, 2008). Según ensayos realizados por Ralph, *et al.*, (2008) demostraron que la vacunación tetravalente contra HPV redujo significativamente los eventos generales de la enfermedad, asistencia sanitaria, utilización de recursos y costos, en un periodo de tiempo de 2,5 años (Insinga, *et al.*, 2008).

HPV es altamente prevalente en hombres que tienen sexo con hombres (HSH), y más aun aquellos HSH infectados con VIH, además, la carga masculina oncogénica de HPV incluye cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pene y cáncer anal, por lo cual la vacunación de hombres antes de iniciar su actividad sexual es probablemente importante para reducir la incidencia de cáncer asociado a HPV en hombres. En México y Australia se ha licenciado la vacunación basada en VLP para ambos sexos (Huh y Roden, 2008).

Para el desarrollo de futuras generaciones de vacunas preventivas se deben abordar dos cuestiones principales: 1) reducción del costo de producción en Chile con la finalidad de aumentar la disponibilidad de estas en países en desarrollo, lo cual podría suplirse con el uso de la bacteria *Escherichia coli* para dicha producción, las vacunas actuales L1 (Cervarix y Gardasil) se producen en células de insectos y levaduras (de mayor costo), y 2) aumentar el número de genotipos de HPV cubiertos (Lin, *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El Cáncer Cervicouterino (CCU) es un importante problema de salud pública, siendo la segunda neoplasia más prevalente en mujeres a nivel mundial y la quinta causa de muerte por cáncer en esta población. HPV es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial y el factor etiológico de cáncer cervical uterino. Actualmente la técnica más utilizada para la detección precoz del CCU es el Papanicolaou (PAP), el cual ha contribuido de manera importante a la reducción de la incidencia y mortalidad por CCU. A pesar de la gran utilidad que otorga el PAP, sólo permite la detección indirecta del HPV, y no su tipificación viral, lo cual es un factor importante al momento de categorizar en subgrupos a los pacientes desde una perspectiva clínica. Además, la baja sensibilidad del PAP, el alto grado de invasividad requerido para la toma de muestras y la poca viabilidad de implementar en Chile y países similares métodos de diagnóstico de HPV existentes en el mercado, por su alto costo (ejemplo: Captura Híbrida II), hacen necesario la implementación de un método diagnóstico que permita detectar y tipificar, de manera simultánea, el virus papiloma humano a través de muestras menos invasivas y de fácil acceso como es la orina.

Debido a lo expuesto anteriormente es que el objetivo principal del presente trabajo de investigación fue estandarizar un método eficiente para la detección y genotipificación de Virus Papiloma Humano en muestras de orina, como marcador predictivo en la carcinogénesis cervical uterina.

3.1 Hipótesis

“Utilizando técnicas de amplificación e hibridación no radioactiva es posible detectar y genotipificar *virus papilloma humano* en muestras de orina”

3.2 Objetivo general

Estandarizar un método eficiente para la detección y genotipificación de *virus papilloma humano* en muestras de orina.

3.3 Objetivos específicos

1. Estandarizar un método eficiente para la extracción de DNA a partir de muestras de orina.
2. Ajustar un método de detección y genotipificación de HPV mediante hibridación no radioactiva en muestras de orina.
3. Detectar y genotipificar HPV en muestras de orina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestras clínicas

4.1.1. Tamaño muestral y obtención de muestras. Las muestras utilizadas correspondieron a orinas provenientes del Policlínico de Patología Cervical y de la Unidad de Anatomía Patológica-Citología del Hospital Hernán Henríquez Aravena y del Consultorio Miraflores, Temuco, Chile. El número total de muestras fue dividido en 2 grupos principales: grupo 1. Control (muestras normales luego de examen citológico), grupo 2. Estudio (muestras con diagnóstico de lesiones LBG, LAG y cáncer luego del diagnóstico histopatológico). El grupo 2 fue dividido en 3 subgrupos: grupo A. LBG (NIE I y signos de HPV), grupo B. LAG (NIE II y NIE III), y grupo C. Cáncer Escamoso. El diagnóstico histopatológico de cada una de las muestras fue realizado por médicos Patólogos del Hospital Hernán Henríquez Aravena. Cabe destacar que todas las muestras contaron con consentimiento informado. En la tabla 1 se detalla el número de muestras general y su división por grupo.

Tabla 1. Número de muestras por grupo según diagnóstico previo

Lesión	Tipo de lesión	Cantidad (por lesión)	Total
Normal	-	25	25
LBG	Signos de HPV	10	28
	NIE I	18	
LAG	NIE II	16	50
	NIE III	34	
Cáncer	-	16	16
Total			119

La variación entre cada grupo fue en respuesta a la disponibilidad de muestras de orina existentes para cada uno de los grupos.

4.1.2 Descripciones de las muestras (Diagnóstico previo). El diagnóstico histopatológico de cada una de las muestras a utilizar en el presente trabajo de investigación fue realizado por médicos Anatomopatólogos del Hospital Hernán Henríquez Aravena, basándose en los parámetros descritos a continuación:

Normales

Se presentan como células grandes, poligonales, con bordes citoplasmáticos bien definidos e irregulares. El citoplasma de las células normales del cuello uterino se evidencia traslúcido y homogéneo (Figura 2).

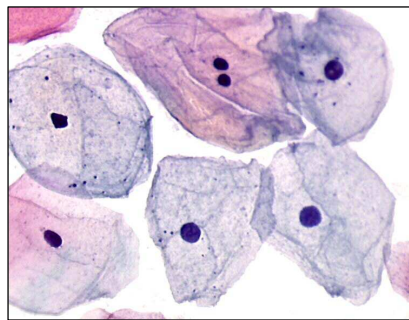


Figura 2. Imagen representativa de un frotis cervical mostrando citología normal del cérvix¹.

Alteraciones microscópicas

- **LBG (Signos de infección por HPV y NIE I)**

➤ **Signos de infección por HPV:**

El principal hallazgo es el coliocito (célula epitelial superficial), caracterizada por la vacuolización citoplasmática perinuclear y condensación citoplasmática periférica irregular. A nivel nuclear se observa hiperchromesia, agrandamiento e irregularidad de la membrana. Otras alteraciones: bi o mutilación y gránulos de queratohialina (Figura 3).

(1) Imagen facilitada por Dr. Pablo Guzman, Médico Anatomopatólogo Hospital Hernán Henríquez Aravena, 2012.



Figura 3. En la imagen se muestra un frotis cervical evidenciando signos de infección por HPV, en la cual se presentan células grandes con núcleo de tamaño aumentado y binucleación. El citoplasma es acidofílico, se presenta un halo nuclear con retracción citoplasmática¹.

➤ **NIE I:**

Es una lesión intraepitelial en la que junto a los cambios coliciticos superficiales, aparece pérdida del gradiente de maduración en el tercio epitelial basal, consistentes en: hiperplasia basal, papilomatosis, acantosis, pérdida de la polaridad nuclear, núcleos irregulares, hiper cromáticos y aumento en el número de mitosis (Figura 4).

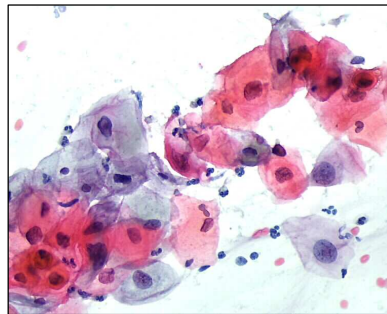


Figura 4. La imagen representa un frotis cervical mostrando displasia leve o NIE I, en la cual se presentan células de gran tamaño con un núcleo aumentado de tamaño e hiper cromático. El citoplasma se evidencia de color rosado o azul-verdoso¹.

(1) Imagen facilitada por Dr. Pablo Guzman, Médico Anatomopatólogo Hospital Hernán Henríquez Aravena, 2012.

LAG (NIE II y NIE III)

➤ NIE II:

Son cambios morfológicos similares a los descritos en la displasia leve pero que afectan a la mitad del grosor epitelial o hasta los dos tercios basales (Figura 5).

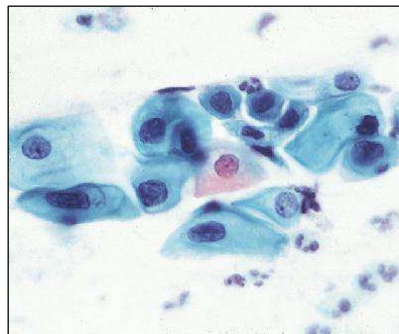


Figura 5. Presentación de un frotis cervical mostrando displasia moderada o NIE II, en la cual se presentan células de tamaño moderado con núcleo aumentado de tamaño e hiper cromático. El citoplasma se aprecia de un color azul-verdoso. El núcleo presenta pliegues y cromatina de distribución irregular¹.

➤ NIE III:

Desaparece casi por completo la maduración epitelial y aumentan considerablemente los cambios nucleares (agrandamiento, cromatina grumosa, pleomorfismo, hiper cromasia) y número de mitosis. Coilocitos menos numerosos (ya que sólo se forman en células maduras) (Figura 6).

(1) Imagen facilitada por Dr. Pablo Guzman, Médico Anatomopatólogo Hospital Hernán Henríquez Aravena, 2012

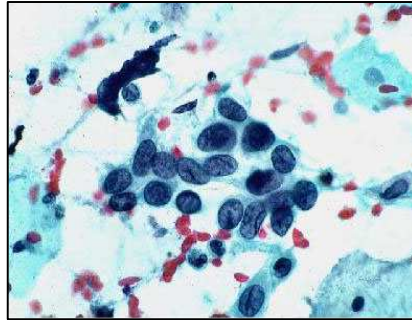


Figura 6. Imagen mostrando un frotis de cuello uterino con displasia intensa/carcinoma in situ, en la cual se aprecian células de tamaño pequeño con núcleo aumentado de tamaño e hiper cromático. El citoplasma se aprecia de un color azul-verdoso. Los núcleos se encuentran redondeados o angulosos, cromatina grumosa¹.

- **Cáncer (carcinoma escamoso invasor SSC)**

- **Carcinoma escamoso invasor SSC:**

Neoplasia escamosa que atraviesa la membrana basal e infiltra hacia planos profundos en brotes irregulares, cordones o células sueltas. Las células neoplásicas poseen anisocariosis, pleomorfismos e hiper cromasia. Las neoplasias mejor diferenciadas pueden presentar perlas corneas (Figura 7).

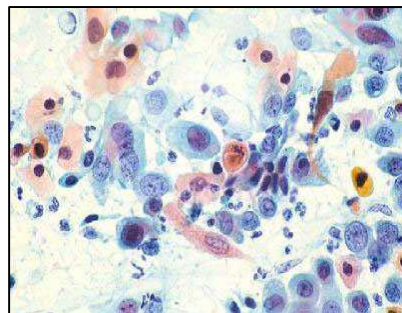


Figura 7. Se presenta un frotis cervical evidenciando formas y tamaños celulares variables con núcleos esféricos o angulosos, cromatina granular. Fondo del frotis sucio¹.

4.1.3 Recolección de muestras. Las orinas fueron obtenidas por automuestreo considerando para ello las siguientes indicaciones y precauciones:

(1) Imagen facilitada por Dr. Pablo Guzman, Médico Anatomopatólogo Hospital Hernán Henríquez Aravena, 2012.

Indicaciones:

- Realizarse aseo genital previo a la recolección de la muestra (sólo con agua)
- Desechar el primer chorro y el segundo incorporarlo al contenedor estéril de 50 ó 100mL (sellado antes de usar)

Precauciones:

- Explicar al paciente en términos que pueda comprender cómo debe efectuar la recogida de la muestra.

Una vez recolectadas las muestras, se procedió al almacenamiento de cada una de ellas, adicionándole buffer estabilizador (cristal violeta y buffer TE) (esta solución se especifica en el Anexo 1) para el mantenimiento y almacenamiento de la misma en buenas condiciones hasta su uso. Se almacenaron a -80°C en ultra-freezer. Todas las muestras correspondieron a distintos pacientes de sexo femenino, cuyas edades se encuentran comprendidas en un rango de 20 -50 años, existiendo algunos extremos correspondientes a las edades de 18-19 y 60-70 en una proporción mucho menor.

4.1.4 Extracción manual de DNA en muestras de orina. Se aisló DNA genómico desde muestras de orina por medio del método fenol-cloroformo modificado (método utilizado para ambos grupos: control y estudio). Para este método se utilizaron 14mL de muestras de orina y se depositaron en un tubo falcon de 15mL, posteriormente se procedió con el método de extracción por fenol-cloroformo. Los DNA se precipitaron con etanol al 75%, para luego ser resuspendidos en 20 μl de agua ultra pura (HyClone) o buffer TE. Los DNA resultantes fueron dejados toda la noche a 4°C y luego almacenados a -20°C . (ver Anexo 2). El DNA genómico de las muestras de cáncer fue extraído mediante el kit E.Z.N.A. para extracción de DNA de sangre y fluidos corporales, debido a que los cánceres presentan mayor dificultad para la extracción de su DNA (ver Anexo 3).

4.2 Determinación de la cantidad y calidad del DNA extraído.

4.2.1 Cuantificación DNA. Con la finalidad de evaluar la cantidad y calidad del DNA extraído se cuantificaron las muestras en un Espectrofotómetro Nanodrop 1000. Los estándares de buena calidad considerados para muestras de DNA extraído en un volumen de 2µl fueron:

1. Muestras con 100ng/µl de DNA o más.
2. Coeficiente de pureza A260/280 y 260/230 iguales a 1,6 - 1,7.

Aquellas muestras que presentaban Coeficiente de pureza A260/280 y 260/230 menores a 1,6 - 1,7, se les realizó una limpieza con acetato de amonio (ver protocolo en Anexo 6). Luego de esto se cuantificaron nuevamente y se realizó PCR β-globina a aquellas muestras llevadas a limpieza, verificando con ello que cumplan con los estándares establecidos para buena calidad. Aquellas muestras que aun después de la limpieza no alcanzaron estos estándares, fueron desechadas para el ensayo posterior.

4.2.2 Calidad del DNA. Una vez cuantificadas las muestras de DNA obtenidas y seleccionadas aquellas que cumplen con los factores anteriormente descritos se procedió a realizar una PCR para un fragmento del gen β-globina (268 pb) que permitió establecer la calidad del DNA extraído. Se emplearon los partidores GH20 y PCO4 en concentraciones de 10µM para la detección del fragmento 268 del gen de la β-globina (ver Anexo 7). Luego de obtener los productos de PCR se procedió a analizar estos productos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8%, para lo cual se utilizaron 15µl de producto de PCR a los cuales se les adicionó 3µl de buffer de carga 6X (mezclado con gel red).

4.3 Detección y genotipificación de HPV

La detección y genotipificación de HPV se realizó utilizando técnicas de PCR e Hibridación no radioactiva. Los genotipos incluidos fueron: HPV de alto riesgo (AR): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66; HPV de bajo riesgo (BR): 6, 11, 42, 53 y 70.

Las etapas consideradas fueron: A) Amplificación y B) Hibridación.

A) Amplificación

La amplificación de las muestras de DNA se llevaron a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la cual se utilizaron 5µl de DNA total. En la amplificación se utilizaron los partidores GH20 y PCO4 para la detección del fragmento 268 de β-globina, y los partidores GP5 y GP6 dirigidos a la región L1 del HPV, amplificando un fragmento de 150pb. Los detalles de la amplificación se muestran en el Anexo 8.

B) Hibridación

La hibridación de los productos de PCR se llevó a cabo mediante hibridación no radiactiva en una tira diagnóstica. El proceso de hibridación se llevó a cabo siguiendo el protocolo detallado en los anexos (ver Anexo 9). Cabe destacar que las etapas de amplificación e hibridación son las descritas en el Kit *HPV easy Typing* (Patente en Proceso).

4.4 Análisis estadístico

Los genotipos de HPV obtenidos en cada muestra corresponden a un tipo de variable cualitativa, razón por la cual fue necesario realizar una transformación de datos, de cualitativo a

cuantitativo, a través de la asignación de claves a cada genotipo diagnosticado como se muestra a continuación:

HPV16 = 1	HPV45 = 7	HPV60 = 13
HPV18 = 2	HPV51 = 8	HPV6 = 14
HPV31 = 3	HPV52 = 9	HPV11 = 15
HPV33 = 4	HPV56 = 10	HPV42 = 16
HPV35 = 5	HPV58 = 11	HPV53 = 17
HPV39 = 6	HPV59 = 12	HPV70 = 18

Luego de la transformación de los datos a variables cuantitativas se utilizó el software estadístico SPSS versión 11.0 en español, el cual fue utilizado para realizar análisis de frecuencias y frecuencias acumuladas de los tipos variables registrados para cada muestra, con un nivel de confianza del 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Característica de las muestras

Todas las muestras correspondieron a distintos pacientes de sexo femenino, cuyas edades se encuentran comprendidas en un rango de 20-50 años, existiendo algunos extremos correspondientes a las edades de 18-19 y 60-70 en una proporción mucho menor. Se trabajó con un total de 119 muestras (correspondientes al grupo control y grupo de estudio), de las cuales 25 correspondieron a muestras normales, 28 LBG, 50 LAG y 16 Cánceres escamosos.

La calidad de la extracción de DNA se evaluó mediante lectura en Nanodrop y una PCR β -globina (Figura 8)

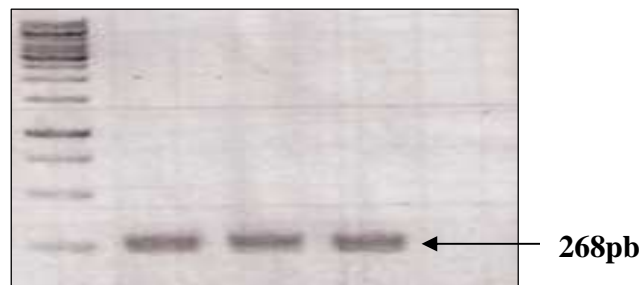


Figura 8. Figura representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 1,8% de los productos de amplificación del gen β -globina humana (fragmento 268 pb).

5.2 Detección y genotipificación de HPV

La detección y genotipificación de HPV se realizó mediante técnica de PCR e Hibridación no radiactiva. El mismo método fue utilizado tanto para el grupo control como para el grupo de estudio. En la Figura 9 se observa una imagen representativa de los resultados obtenidos mediante éste método de diagnóstico.

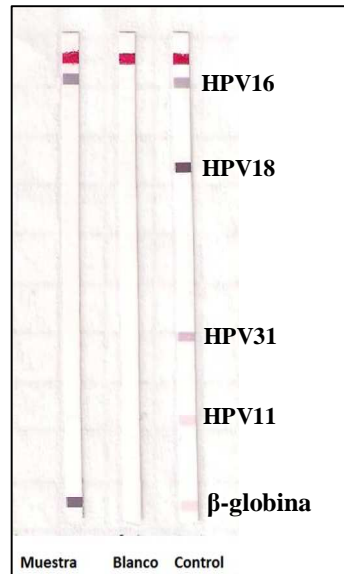


Figura 9. Detección y tipificación de HPV, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación no radiactiva. En la figura se observa en forma vertical las tiras de membrana marcadas con las sondas de cada tipo viral. Cada franja evidenciada en la tira corresponde a un tipo viral de la muestra que se adhiere a la sonda de la membrana, el cual se hace visible mediante una solución sustrato que reacciona con el anticuerpo marcado. La primera tira de la derecha (correspondiente al control positivo) evidencia 4 tipos virales de referencia (HPV 16, 18, 31 y 11), en tanto, la primera tira de la izquierda (correspondiente a la muestra de orina 572) muestra el genotipo viral HPV 16 y el control de β -globina. El blanco no evidencia la presencia de ningún tipo viral ni control positivo de β -globina.

A continuación se presenta una tabla resumen con los resultados obtenidos para los casos normales, LBG, LAG, y cáncer, la cual permite ver de forma general las frecuencias presentes para cada tipo viral en el total de muestras analizadas. Dentro de los genotipos virales de mayor prevalencia en ésta población podemos encontrar a HPV 16 y 18 (tabla 2).

Tabla 2. Distribución general de tipos virales de HPV en el total de las muestras (Normal, LBG, LAG y Cáncer).

Tipo Viral	Normal		LBG		LAG		Cáncer	
	n	% del total	n	% del total	n	% del total	n	% del total
HPV16	0	0	1	7,1	5	10	1	6,3
HPV18	0	0	1	7,1	2	4,0	2	12,5
HPV31	0	0	0	0	3	6,0	0	0
HPV52	2	8,0	0	0	0	0	0	0
HPV58	0	0	0	0	2	4,0	1	6,3
HPV59	0	0	0	0	1	2,0	0	0
HPV11	0	0	1	7,1	0	0	0	0
HPV42	2	8,0	0	0	3	6,0	0	0
HPV53	1	4,0	1	7,1	0	0	1	6,3
Infección Múltiple	n	% del total	n	% del total	n	% del total	n	% del total
Más de un Genotipo	0	0	20	71,4	28	56	10	62,5
Positivos	5	20	24	85,7	44	88	15	93,8
Negativos	20	80	4	14,3	6	12	1	6,3
Total de muestras	25	100	28	100	50	100	16	100

5.2.1 Muestras Normales. Del total de muestras normales analizadas, el 80% resultaron ser negativas para infección por HPV (Tabla 3). Del total de casos positivos el 16 % correspondió a genotipos virales de alto riesgo oncogénico (equivalente a la sumatoria de los porcentajes de HPV52 + HPV42), y el 4% restante a un genotipo de bajo riesgo (correspondiente a HPV53) (Tabla 3). Los datos sobre la distribución detallada de los genotipos virales en muestras normales se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras normales.

Normales		
Tipo Viral	n	% del total
HPV 52	2	8
HPV 42	2	8
HPV 53	1	4
Neg	20	80
Total de muestras	25	100

A continuación se presenta la gráfica de los datos presentados en la Tabla 3 con la distribución de los genotipos virales en muestras normales (Figura 10):

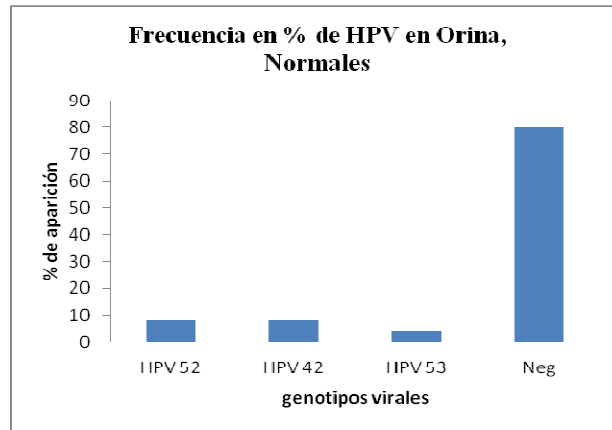


Figura 10. Gráfico de distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras normales analizadas mediante amplificación y genotipificación de DNA con método de PCR e Hibridación no radiactiva.

5.2.2 Lesiones de bajo grado (LBG). En la Tabla 4 se observa la distribución detallada de los genotipos virales en muestras diagnosticadas como lesiones de bajo grado (signos de HPV y NIE I), en la cual el 85,7% del total de las muestras con LBG resultaron ser positivas para la detección de HPV (% equivalente a la sumatoria de todos los genotipos virales presentes en la Tabla 4) y el 14,3% correspondieron a muestras negativas para HPV (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con LBG. Otros: 52, 66, 45, 42, 58, 59, 56, 6, 35, 51, 31.

LBG		
Tipo Viral	n	% del total
HPV 16	1	3,6
HPV 18	1	3,6
HPV 53	1	3,6
HPV 11	1	3,6
HPV 16 otro	3	10,7
HPV 16/18	1	3,6
HPV 16/18 otro	5	17,9
HPV 18 otro	2	7,1
HPV otros	9	32,1
Neg	4	14,3
Total de muestras	28	100

Del total de casos positivos (85,7%), el 14,3% correspondieron a infección única (% sacado de la sumatoria de los genotipos virales HPV16 + HPV18 + HPV53 + HPV11), y el 71,4% restantes a infección múltiple (sumatoria de las infecciones con más de un genotipo viral) (Tabla 4). No se evidenció prevalencia de algún tipo viral en infecciones únicas, presentando todos los mismos porcentajes de aparición. Sin embargo, en los casos de infecciones múltiples, en la mayoría de los casos se presentaron los genotipos virales HPV16 y 18 en mayor proporción que los demás genotipos (Figura 11). En el 32,1% de las muestras con infección múltiple está presente el HPV16, mientras que el 28,5% de las infecciones múltiples presentaron el genotipo HPV18 (Tabla 4).

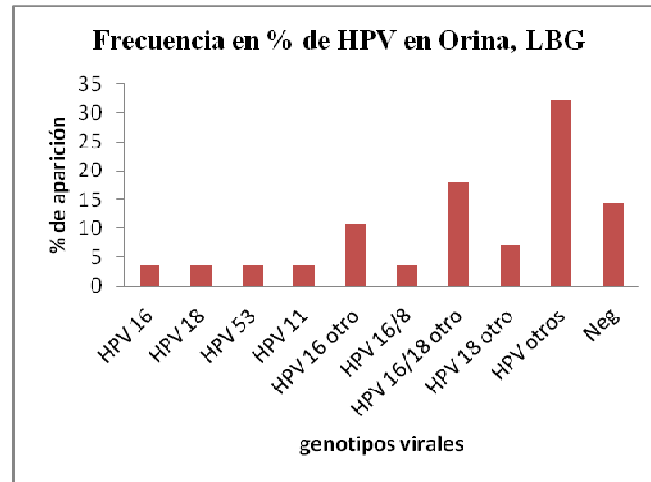


Figura 11. Gráfico de distribución de genotipos virales de *HPV* de alto y bajo riesgo en muestras de LBG analizadas mediante amplificación y tipificación de DNA con método de PCR e Hibridación no radiactiva.

5.2.3 Lesiones de alto grado (LAG). Del total de muestras analizadas para lesiones de alto grado (LAG) el 12% correspondieron a muestras negativas para HPV y el 88% a muestras positivas para HPV. La Tabla 5 muestra una distribución detallada de los genotipos virales en muestras diagnosticadas con lesiones de alto grado (NIE II y NIE III), en la cual se observa que del total de casos positivos el 32% correspondieron a infecciones únicas (sólo un tipo viral), y el 56% restante a infección múltiple (más de un tipo viral).

Tabla 5. Distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con LAG. Otros: 35, 11, 56, 39, 53, 52, 45, 66, 33.

LAG		
Tipo Viral	n	% del total
HPV 16	5	10,0
HPV 18	2	4,0
HPV 58	2	4,0
HPV 31	3	6,0
HPV 42	3	6,0
HPV 59	1	2,0
HPV 16/18	4	8,0
HPV 16 otro	4	8,0
HPV 18 otros	3	6,0
HPV 16/18 otros	13	26,0
HPV otros	4	8,0
Neg	6	12,0
Total de muestras	50	100

Los resultados de la tipificación viral en infecciones únicas dieron un mayor porcentaje de aparición al genotipo HPV16 correspondiente al 10% de las lesiones de alto grado. En una menor frecuencia estuvieron presentes HPV31 y HPV42 con un 6%, seguido por HPV18 y HPV58 con un 4% y HPV59 con un 2%. En el 42% de las muestras con infección múltiple se observó la presencia de HPV16. En tanto, el 40% de las muestras con infecciones múltiples presentaron el genotipo viral HPV18. La Figura 12 muestra la distribución de los genotipos virales presentados en la Tabla 5.

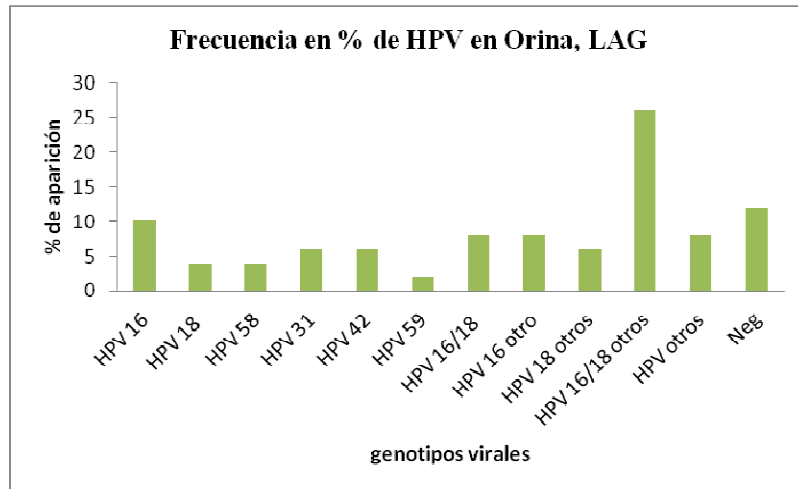


Figura 12. Gráfico de distribución de genotipos virales de *HPV* de alto y bajo riesgo en muestras de LAG analizadas mediante amplificación y tipificación de DNA con método de PCR e Hibridación no radiactiva.

5.2.4 Cáncer. Del total de muestras diagnosticadas con cáncer, sólo el 6,3% correspondieron a muestras negativas para HPV. En cuanto a los casos positivos (93,8%), el 31,3% correspondieron a infección única (sólo un tipo viral), y el 62,5% restante a infección múltiple (más de un tipo viral). Los resultados obtenidos de la tipificación viral en infecciones únicas otorgaron una mayor prevalencia de aparición al genotipo viral HPV18 correspondiente al 12,5%. En una menor proporción y por igual se presentaron los genotipos HPV16, 58, 53 con un 6,3%. En el 50,2% de las infecciones múltiples se observó la presencia de HPV16. En el 37,6% de las infecciones múltiples, fue posible evidenciar al genotipo viral HPV18, tal como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras con cáncer. Otros: 42, 11, 33, 31.

Cáncer		
Tipo Viral	n	% del total
HPV 16	1	6,3
HPV 18	2	12,5
HPV 58	1	6,3
HPV 53	1	6,3
HPV 16/18	3	18,8
HPV 16/53	1	6,3
HPV 16/18/35	1	6,3
HPV 16 otros	3	18,8
HPV 18 otros	2	12,5
Neg	1	6,3
Total de muestras	16	100

A continuación se expone la gráfica de estos resultados para la distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo grado en muestras con cáncer (Figura 13)

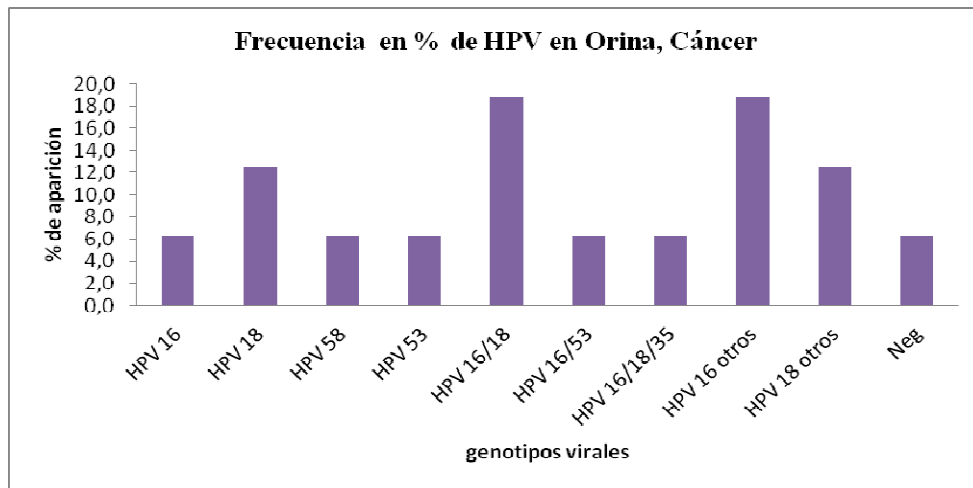


Figura 13. Gráfico de distribución de genotipos virales de HPV de alto y bajo riesgo en muestras de cáncer analizadas mediante amplificación y tipificación de DNA con método de PCR e Hibridación no radiactiva.

6. DISCUSIÓN

El virus papiloma humano (HPV) es una de las infecciones de transmisión sexual más prevalentes a nivel mundial, cuya incidencia se estima en aproximadamente 630 millones de personas que ya presentan la infección y cerca de 6 millones de nuevos contagios por año (Pandhi y Sonthalia, 2011). La mayor prevalencia de ésta enfermedad se da en mujeres africanas y latinoamericanas, cuya tasa de infección es de 22,1% y 20,4% respectivamente por año. Las tasas de menor incidencia de este tipo de infección se observa en mujeres asiáticas con alrededor del 8% de infecciones por año (Palmer, *et al.*, 2009).

En Chile, la tasa de incidencia de infecciones por HPV en mujeres alcanza el 14%, lo cual resulta muy similar a la prevalencia de dicha infección en otros países de América Latina, como es el caso de México (14,5%), Costa Rica (16%), y Colombia (14,8%). Asimismo, los principales genotipos virales de alto riesgo presentes en la población chilena que pueden desarrollar un cáncer cervical uterino (CCU) corresponden a HPV 16, 56, 31, 58, 59, 18, 45, y 52 (Lopez, *et al.*, 2010; Ferreccio, *et al.*, 2004). En Chile el CCU es considerado la sexta causa de muerte por tumores malignos en mujeres, siendo el 99,7% de los casos de cáncer de cuello uterino atribuidos a infección por HPV (Ili, *et al.*, 2011). Existen diversas metodologías utilizadas para la detección y tipificación del HPV, tales como Southern blot, hibridación Dot Blot, secuenciación y enzimoimmunoensayo, Captura Híbrida, Reverse Line Blot (RLB), PCR real time, entre otras (Lopez, *et al.*, 2010; Brebi, *et al.*, 2009; Lorincz y Richart, 2003). Actualmente la técnica mayormente utilizada para la detección precoz de CCU es el Papanicolaou (PAP), el cual ha contribuido de manera importante a la reducción de la incidencia y mortalidad. A pesar de su gran utilidad, el PAP no permite identificar todos los casos de CCU, por lo que la búsqueda de metodologías complementarias altamente sensibles y predictivas, se ha vuelto una importante necesidad clínica, además de otorgar una nueva fuente de muestras para la detección de HPV, ya que actualmente la mayoría de las técnicas ocupan el DNA extraído desde muestras de cepillado del cuello uterino (citobrush) obtenidas al momento de la realización del examen del PAP, lo cual hace que la toma de muestra y por consiguiente el método utilizado para la tipificación de HPV

sea considerado invasivo, creando en el paciente malestar y además, provocando que muchas de estas pacientes no acudan a realizarse el examen rutinario del PAP, con lo que la prevalencia de presentar infecciones por HPV y un posible desarrollo a cáncer cérvico uterino aumenta cada día.

En nuestro estudio se realizó detección y tipificación de HPV mediante la técnica de PCR e Hibridación no radiactiva en muestras de orina. Los resultados arrojaron un alto porcentaje de HPV en LBG, LAG y CCU. Un 80 % de las muestras normales fueron negativas para HPV, resultados similares a lo descrito por otros autores (Gupta, *et al.*, 2006; Prusty, *et al.*, 2005).

En las muestras con lesión se observó una alta frecuencia de HPV, 85,7% para LBG, 88% para LAG, y 93,8% para cáncer. Estos porcentajes son muy similares a los registrados en otros estudios donde se han utilizado muestras de citobrush o Biopsias (Brebi, *et al.*, 2009; Ili, *et al.*, 2011; Lopez, *et al.*, 2010; Melo, *et al.*, 2005). La mayor tasa de detección de HPV observada entre estos tres sub-grupos de estudio fue en las muestras de orinas provenientes de pacientes con cáncer, seguida por las LAG y, finalmente, LBG. Estos resultados son esperables debido a que se ha registrado que la integración del genoma viral de HPV-HR se considera un evento necesario en la progresión de cánceres anogenitales, cervicales y otros, con un aumento de la presencia de DNA viral integrado en correlación con la progresión de la enfermedad (Williams, *et al.*, 2011).

Los principales genotipos de HPV detectados fueron los de alto riesgo oncogénico, principalmente HPV16 y 18, seguido por los genotipos de HPV31 y 58, lo que se condice con los encontrados en la población chilena en general y en la región de La Araucanía (Lopez, *et al.*, 2010; Ferreccio, *et al.*, 2004). Sin embargo, existe una discrepancia en relación al genotipo viral de mayor prevalencia obtenido en el grupo de cáncer, puesto que se presentó en una mayor proporción (en infecciones únicas) el genotipo viral HPV18, mientras que en la población chilena y, principalmente, en La Araucanía, el genotipo viral de mayor frecuencia de aparición en infecciones únicas es el HPV16 (Brebi, *et al.*, 2009; Ili, *et al.*, 2011; Lopez, *et al.*, 2010; Melo, *et al.*, 2005).

En éste estudio se evidenció un alto porcentaje de infecciones múltiples en cada grupo, considerando además una gran cantidad de genotipos virales presentes en dichas infecciones, caso que es posible explicar a través de otros estudios en los cuales, ha sido posible observar un comportamiento parecido de las muestras de orina en comparación con detección de HPV en muestras diagnosticadas en citobrush y/o biopsias (Jong, *et al.*, 2008). En el caso de diagnóstico en orina se presentan de 2 a 5 genotipos virales aproximadamente, en infecciones múltiples, mientras que a través del diagnóstico por citobrush y/biopsias, se presentan sólo de 2 a 3 genotipos virales (Jong, *et al.*, 2008). Esto responde a la zona en la cual se obtiene la muestra puesto que en el caso de citobrush y biopsias se concentran en la región del cuello uterino, pudiendo detectar sólo los tipos virales de HPV que se encuentren presentes en esa región en cambio, si analizamos las muestras de orina esta responde a un barrido generado por el recorrido de la orina (durante su eliminación) por diversos órganos genitales, entre los que se cuenta la uretra, meato uretral, orificio vaginal, vulva, región anogenital, entre otras, generando con ello que se acumule un grupo variado de genotipos virales de HPV, razón por la cual exista esta diferencia entre infecciones múltiples detectadas a través de citobrush y/o biopsias, e infecciones múltiples detectadas a través de la orina.

En relación a los porcentajes de negatividad evidenciados en el grupo de estudio se cree que la responsabilidad de éstos resultados se acotan a factores como: metodología de extracción de DNA de muestras de orina, presencia de moléculas inhibidoras de la PCR (nitritos o urea) (Golijow, *et al.*, 2005), refrigeración previa de la muestra de DNA (recomendada para detección de HPV, según literatura) (Golijow, *et al.*, 2005), 3) sensibilidad de la membrana utilizada en hibridación (posible saturación por exceso de DNA o suciedad de la misma) y, tipo de toma de muestra: automuestreo (aumenta el rango de error). Todos estos posibles factores pudiesen explicar los resultados negativos obtenidos en el presente trabajo de investigación.

La detección y tipificación de HPV mediante éste método permite diferenciar entre genotipos virales de alto y bajo riesgo oncogénico y además, establecer el genotipo viral específico al cual se refiere, caso contrario al método de captura híbrida II, empleado en el campo clínico, que sólo

permite diferenciar entre genotipos virales de bajo y alto riesgo, pero no el genotipo específico al cual se refiere (Lorincz y Richart, 2003). Además, se evidenció que la utilización de DNA extraído desde muestras de orina permitió detectar y tipificar HPV de igual forma que lo haría con muestras de DNA extraídas desde citobrush, con lo que se genera una gran ventaja referente a otras técnicas como RLB y Real time cuya especificidad es bastante alta pero que sólo se han empleado para muestras de DNA extraído desde citobrush (método de muestreo más invasivo que las muestras de orina). Además de presentar un mayor costo para la realización de dichas técnicas.

A pesar de que las muestras de orina han presentado resultados eficientes en relación a la detección y tipificación de HPV, no se explica científicamente el porqué aun no se han implementado métodos diagnósticos que permitan reemplazar con ello la utilización de muestras mayormente invasivas, como es el caso de las biopsias y cepillado de cuello uterino (Citobrush).

7. CONCLUSIONES

1. El método empleado para la extracción de DNA de muestras de orina demostró ser eficiente, permitiendo la amplificación del DNA extraído y posterior detección de HPV.
2. Las técnicas de amplificación por PCR e Hibridación no radioactiva, fueron útiles para detectar y genotipificar HPV en DNA extraído a partir de muestras de orina.
3. HPV16 fue el genotipo viral más frecuente, tanto en infecciones únicas como múltiples.
4. La mayor frecuencia de HPV se registró en muestras de pacientes diagnosticados con cáncer.
5. La mayoría de las muestras normales fueron negativas para HPV.
6. El método de amplificación por PCR acoplado a hibridación no radioactiva fue eficiente para la detección y genotipificación de HPV en muestras de orina, pudiendo ser utilizado como una técnica de detección complementaria al Papanicolaou.

8. LITERATURA CITADA

- Abreu, A., Souza, R., Gimenes, F. y Consolaro, M.** 2012. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol J*, 9, 262.
- Allan, B., Marais, D., Denny, L., Hoffman, M., Shapiro, S. y Williamson, A.** 2006. The agreement between cervical abnormalities identified by cytology and detection of high-risk types of human papillomavirus. *S Afr Med J*, 96, 1186-90.
- Anderson, R.** 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10909-13.
- Ault, K.** 2006. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2006 Suppl, 40470.
- Balan, R., Simion, N., Giusca, S., Grigoras, A., Gheuca-Solovastru, L., Gheorghita, V., Amalinei, C. y Caruntu, I.** 2011. Immunohistochemical assessment of p16, COX-2 and EGFR in HPV-positive cervical squamous intraepithelial lesions. *Rom J Morphol Embryol*, 52, 1187-94.
- Bonnez, W. y Lindeque, G.** 2011. CHAPTER 80 - Human Papillomavirus Infections. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice (Third Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders.
- Boot, H., Wallenburg, I., De Melker, H., Mangen, M., Gerritsen, A., Van Der Maas, N., Berkhof, J., Meijer, C. y Kimman, T.** 2007. Assessing the introduction of universal human papillomavirus vaccination for preadolescent girls in The Netherlands. *Vaccine*, 25, 6245-56.
- Bosch, F., Qiao, Y. y Castellsagué, X.** 2006. CHAPTER 2 The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 94, Supplement 1, S8-S21.
- Bousarghin, L., Touze, A., Sizaret, P. y Coursaget, P.** 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *Journal of Virology*, 77, 3846-50.
- Brebi, P., Ili, C., Lopez, J., Garcia, P., Melo, A., Montenegro, H., Leal, P., Guzman, P. y Roa, J.** 2009. [Detection and genotyping of human papillomavirus in biopsies of uterine cervical adenocarcinoma]. *Rev Med Chil*, 137, 377-82.
- Brinkman, J., Jones, W., Gaffga, A., Sanders, J., Chaturvedi, A., Slavinsky, I., Clayton, J., Dumestre, J. y Hagensee, M.** 2002. Detection of human papillomavirus DNA in urine specimens from human immunodeficiency virus-positive women. *J Clin Microbiol*, 40, 3155-61.
- Burd, E.** 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*, 16, 1-17.

- Canadas, M., Lloveras, b., Lorincz, A., Ejarque, M., Font, R., Bosch, F. y De Sanjose, S.** 2006. [Assessment of HPV detection assays for use in cervical cancer screening programs]. *Salud Publica Mex*, 48, 373-8.
- Collado, R., Montosa, J. y Vizcaíno, M.** 2008. *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero*, Editorial Médica Panamericana.
- Chan, J. y Berek, J.** 2007. Impact of the human papilloma vaccine on cervical cancer. *J Clin Oncol*, 25, 2975-82.
- Day, P., Lowy, D. y Schiller, J.** 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*, 307, 1-11.
- De Ruiz, P., Ponce, E. y Ávila, M.** 2005. *Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y control*, Editorial Médica Panamericana.
- Domingo, E., Noviani, R., Noor, M., Ngelangel, C., Limpaphayom, K., Thuan, T., Louie, K. y Quinn, M.** 2008. Epidemiology and prevention of cervical cancer in Indonesia, Malaysia, the Philippines, Thailand and Vietnam. *Vaccine*, 26 Suppl 12, M71-9.
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. y Parkin, D.** 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127, 2893-917.
- Ferreccio, C., Prado, R., Luzoro, A., Ampuero, S., Snijders, P., Meijer, C., Vaccarella, S., Jara, A., Puschel, K., Robles, S., Herrero, R., Franceschi, S. y Ojeda, J.** 2004. Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 2271-6.
- Franco, E. L. y Harper, D. M.** 2005. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine*, 23, 2388-94.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. y Sapp, M.** 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*, 75, 1565-70.
- Giuliano, A., Tortolero-Luna, G., Ferrer, E., Burchell, A., De Sanjose, S., Kjaer, S., Munoz, N., Schiffman, M. y Bosch, F.** 2008. Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers other than Cervical and Benign Conditions. *Vaccine*, 26, K17-K28.
- Golijow, C., Perez, L., Smith, J. y Abba, M.** 2005. Human papillomavirus DNA detection and typing in male urine samples from a high-risk population from Argentina. *Journal of Virological Methods*, 124, 217-220.

- Gravitt, P., Peyton, C., Apple, R. y Wheeler, C.** 1998. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*, 36, 3020-7.
- Gupta, A., Arora, R., Gupta, S., Prusty, B., Kailash, U., Batra, S. y Das, B.** 2006. Human papillomavirus DNA in urine samples of women with or without cervical cancer and their male partners compared with simultaneously collected cervical/penile smear or biopsy specimens. *Journal of Clinical Virology*, 37, 190-194.
- Hemminki, K., Li, X. y Vaittinen, P.** 2002. Time trends in the incidence of cervical and other genital squamous cell carcinomas and adenocarcinomas in Sweden, 1958-1996. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 101, 64-9.
- Huh, W. y Roden, R.** 2008. The future of vaccines for cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 109, S48-56.
- Ili, C., Brebi, P., Lopez, J., Garcia, P., Leal, P., Suarez, E. y Roa, J.** 2011. Genotyping of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia in a high-risk population. *J Med Virol*, 83, 833-7.
- Insinga, R., Dasbach, E., Allen, S., Carides, G. y Myers, E.** 2008. Reductions in Human Papillomavirus-Disease Resource Use and Costs with Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, and 18) Recombinant Vaccination: The FUTURE Study Economic Evaluation. *Value in Health*, 11, 1022-1032.
- Janicek, M. y Averette, H.** 2001. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin*, 51, 92-114; quiz 115-8.
- Jastreboff, A. y Cymet, T.** 2002. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J*, 78, 225-8.
- Jenkins, D.** 2007. Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Dis Markers*, 23, 199-212.
- Jong, E., Mulder, J., Van Gorp, C., Wagenaar, K., Derksen, J., Westerga, J., Tol, A. y Smits, H.** 2008. The prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in paired urine and cervical smear samples of HIV-infected women. *Journal of Clinical Virology*, 41, 111-115.
- Jung, W., Chun, T., Sul, D., Hwang, K., Kang, H., Lee, D. y Han, I.** 2004. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol*, 42, 255-66.
- Koutsky, L.** 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*, 102, 3-8.
- Li, M., Beard, P., Estes, P., Lyon, M. y Garcea, R.** 1998. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *Journal of Virology*, 72, 2160-7.

- Lin, K., Doolan, K., Hung, C. y Wu, T.** 2010. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association*, 109, 4-24.
- Liu, H., Shi, J., Wilkerson, M., Huang, Y., Meschter, S., Dupree, W. y Lin, F.** 2007. Immunohistochemical detection of p16INK4a in liquid-based cytology specimens on cell block sections. *Cancer*, 111, 74-82.
- López, A. y Lizano, M.** 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología, Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, 1, 31-55.
- Lopez, J., Ili, C., Brebi, P., Garcia, P., Capurro, I., Guzman, P., Suarez, E., Ojeda, J. y Roa, J.** 2010. [Human papillomavirus genotyping of cervical uterine preneoplastic lesions in a high risk area]. *Rev Med Chil*, 138, 1343-50.
- Lorincz, T. y Richart, M.** 2003. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med*, 127, 959-68.
- Martinez, M.** 2010. [Microbiologic diagnosis of sexually transmitted diseases: Part II. STD of viral origin]. *Rev Chilena Infectol*, 27, 60-4.
- Martorell, M., Gil-Salom, M., Perez-Valles, A., Garcia, A., Rausell, N. y Senpere, A.** 2005. Presence of human papillomavirus DNA in testicular biopsies from nonobstructive azoospermic men. *Arch Pathol Lab Med*, 129, 1132-6.
- Mcdonald, C., Denny, L., Wang, C., Tsai, Y., Wright, C., JR. y Kuhn, L.** 2012. Distribution of high-risk human papillomavirus genotypes among HIV-negative women with and without cervical intraepithelial neoplasia in South Africa. *PLoS One*, 7, e44332.
- Mclaughlin-Drubin, E. y Munger, K.** 2009. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384, 335-44.
- Melo, A., Roa, I., Montenegro, S., Capurro, I. y Roa, J.** 2005a. Detection of human papilloma virus in cytologic samples or biopsies of the cervix. *Revista Medica De Chile*, 133, 639-644.
- Melo, A., Roa, I., Montenegro, S., Capurro, I. y Roa, J.** 2005b. [Detection of human papilloma virus in cytologic samples or biopsies of the cervix]. *Rev Med Chil*, 133, 639-44.
- MINISTERIO DE SALUD.** 2005. *Guía Clínica Cáncer Cérvicouterino 2*, Santiago, Minsal, 2005.
- Motoyama, S., Ladines-Llave, A., Luis Villanueva, S. y Maruo, T.** 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*, 50, 9-19.

- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, M., Hayakawa, H., Nguyen, L., Owens, M., Grace, M. y Huh, K.** 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 78, 11451-60.
- Munoz, N., Castellsague, X., De Gonzalez, B. y Gissmann, L.** 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/1-10.
- Nakamura, Y., Mashima, Y., Kameyama, K., Mukai, M. y Oguchi, Y.** 1997. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridisation, and polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol*, 81, 308-13.
- Negroni, M.** 2009. *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2a edición*, Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Nelson, M., Rose, C. y Moroianu, J.** 2002. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem*, 277, 23958-64.
- Paavonen, J.** 2007. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. *Int J Infect Dis*, 11 Suppl 2, S3-9.
- Palmer, E., Jenson, B., Kouokam, C., Lasnik, B. y Ghim, J.** 2009. Recombinant vaccines for the prevention of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Exp Mol Pathol*, 86, 224-33.
- Pandhi, D. y Sonthalia, S.** 2011. Human papilloma virus vaccines: Current scenario. *Indian J Sex Transm Dis*, 32, 75-85.
- Patro, K. y Nongkynrih, B.** 2007. Review of screening and preventive strategies for cervical cancer in India. *Indian J Public Health*, 51, 216-21.
- Pellati, D., Mylonakis, I., Bertoloni, G., Fiore, C., Andrisani, A., Ambrosini, G. y Armanini, D.** 2008. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 140, 3-11.
- Peralta-Zaragoza, O., Bermudez-Morales, H., Perez-Plasencia, C., Salazar-Leon, J., Gomez-Ceron, C. y Madrid-Marina, V.** 2012. Targeted treatments for cervical cancer: a review. *Onco Targets Ther*, 5, 315-28.
- Perez-Andino, J., Buck, B. y Ribbeck, K.** 2009. Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS One*, 4, e5847.
- Prusty, K., Kumar, A., Arora, R., Batra, S. y Das, B. C.** 2005. Human papillomavirus (HPV) DNA detection in self-collected urine. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 90, 223-227.

- Rosa, I., Fachel, M., Rosa, D., Medeiros, R., Igansi, N. y Bozzetti, C.** 2008. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199, 617 e1-7.
- Saavedra, K., Brebi, P. y Roa, J.** 2012. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics*, 4, 13.
- Schiller, J., Day, P. y Kines, R.** 2010. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic Oncology*, 118, S12-7.
- Schwarz, T. y Leo, O.** 2008. Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: improving upon nature. *Gynecologic Oncology*, 110, S1-10.
- Sen, S., Sharma, A. y Panda, A.** 2007. Immunohistochemical localization of human papilloma virus in conjunctival neoplasias: a retrospective study. *Indian J Ophthalmol*, 55, 361-3.
- Shaw, A.** 2005. Human papillomavirus vaccines in development: if they're successful in clinical trials, how will they be implemented? *Gynecologic Oncology*, 99, S246-8.
- Shetty, K., Chattopadhyay, A. y Leigh, J.** 2005. Detection and typing of human papilloma virus in the oral mucosa of patients infected with human immunodeficiency virus. *Oral Oncology Extra*, 41, 311-315.
- Shukla, S., Bharti, A., Mahata, S., Hussain, S., Kumar, R., Hedau, S. y Das, B.** 2009. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian Journal of Medical Research*, 130, 222-33.
- Tanzi, E., Bianchi, S., Fasolo, M., Frati, E., Mazza, F., Martinelli, M., Colzani, D., Beretta, R., Zappa, A. y Orlando, G.** 2013. High performance of a new PCR-based urine assay for HPV-DNA detection and genotyping. *J Med Virol*, 85, 91-8.
- Tatti, S.** 2011. *Colposcopia y patologas del tracto genital inferior / Colposcopy and lower genital tract pathologies: En la era de la vacunacin / In the Era of Vaccination*, Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Tchernev, G.** 2009. Sexually transmitted papillomavirus infections: epidemiology pathogenesis, clinic, morphology, important differential diagnostic aspects, current diagnostic and treatment options. *An Bras Dermatol*, 84, 377-89.
- Thomison, J., 3RD, Thomas, L. y Shroyer, K.** 2008. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol*, 39, 154-66.

- Trottier, H. y Franco, E.** 2006. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 24 Suppl 1, S1-15.
- Trottier, H. y Franco, E.** 2006. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*, 12, S462-72.
- Van Den Brule, A., Pol, R., Franssen-Daalmeijer, N., Schouls, L., Meijer, C. y Snijders, P.** 2002. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*, 40, 779-87.
- Velázquez-Márquez, N., Paredes-Tello, M., Pérez-Terrón, H., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J. y Vallejo-Ruiz, V.** 2009. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico. *International Journal of Infectious Diseases*, 13, 690-695.
- Wang, K.** 2007. Human Papillomavirus and Vaccination in Cervical Cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 46, 352-362.
- Wang, X., Zhuang, J., Wu, K., Xu, R., Li, M. y Lu, Y.** 2010. Human semen: the biological basis of sexual behaviour to promote human papillomavirus infection and cervical cancer. *Med Hypotheses*, 74, 1015-6.
- WHO CONSULTATION ON CERVICAL CANCER SCREENING, WORLD HEALTH ORGANIZATION. DEPT. OF REPRODUCTIVE HEALTH AND RESEARCH. & WHO PROGRAMME ON CANCER CONTROL.** 2002. *Cervical cancer screening in developing countries : report of a WHO consultation*, Geneva, World Health Organization.
- Williams, V., Filippova, M., Soto, U. y Duerksen-Hughes, P.** 2011. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*, 6, 45-57.
- Woodman, C., Collins, S. y Young, L.** 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7, 11-22.
- Zea-Mazo, J., Negrette-Mejia, Y. y Cardona-Maya, W.** 2010. [Virus of sexual transmission: semen and virus relationship]. *Actas Urol Esp*, 34, 845-53.

9. ANEXOS

Anexo 1: Solución de preservación de orina

Para 1lt:

1. 0,5M EDTA, pH 8.0 solución comercialmente disponible de Ambion, cat #AM9262.
2. Color Cristal Violeta (8 onzas) disponible comercialmente de Sigma-Aldrich, cat #HT901-8FOZ.

Anexo 2: Extracción manual de DNA desde muestras de orina

Protocolo

1. Descongelar las muestras de orina a 4°C toda la noche.
2. Adicionar 14mL de la muestra de orina en un tubo Falcon de 15mL. Guardar el resto de orina nuevamente el ultra-freezer (-80°C).
3. Centrifugar a 2000rpm por 20 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Adicionar 3mL de solución 1%SDS/PK (ver Anexo 4) al tubo con el pellet y mezclar en vortex.
6. Dejar a 56°C de 6-24hrs (hasta la disolución completa del pellet). Opcionalmente, adicionar 5µl de PK 20% y mezclar en vortex. Luego del periodo de incubación, mezclar nuevamente en vortex.
7. Adicionar 1mL de PC-8 (ver Anexo 5) y centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos. Realizar este paso 2 veces.
8. Trasladar el sobrenadante de la fase superior en un nuevo tubo de 15mL.
9. Agregar 1mL de Acetato de Amonio 7.5M, 2µl de glycogeno y 8mL de etanol al 100% a cada muestra. Invertir suavemente los tubos 3 a 4 veces. El DNA debería estar flotando en la solución.
10. Incubar a -20°C por 24hrs.
11. Centrifugar las muestras a 5000 rpm por 35 minutos a 4°C.

12. Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar el pellet.
13. Lavar las muestras con 10mL de etanol al 70%, se debe hacer suavemente pero verificando que el pellet se desprenda del fondo.
14. Centrifugar a 4750 rpm por 15 minutos.
15. Descartar el sobrenadante manteniendo el pellet en el fondo del tubo (repetir paso 13, 14 y 15 una vez mas).
16. Sacar el exceso de etanol secando de manera suave, y dejando el tubo invertido sobre una hoja de papel cerca de 15 minutos.
17. Adicionar 20µl de Agua ultra pura (Hyclone) o buffer TE.
18. Dejar que la muestra se resuspenda durante toda la noche a 4°C.
19. Transferir el DNA a un tubo eppendorf de 1.5mL.

Anexo 3: Kit E.Z.N.A para la extracción de DNA de sangre y fluidos corporales (modificado).

Protocolo

1. Transferir la muestra dentro de un tubo de microcentrifuga estériles y llevar a un volumen de 250ul con 10mM Tris-HCl, PBS o Buffer de Elución (Elution Buffer).
2. Adicionar 25ul de Bufer de Reconstitución OB a cada muestra.
3. Adicionar 250ul de Buffer BL a la muestra. Aplicar vortex a máxima velocidad por 15 segundos para mezclar todo.

Oopcional: si se requiere DNA genómico libre de RNA, adicionar 5ul de RNasa A (50mg/ml) a cada muestra.

4. Incubar la muestra a 65°C por 10 minutos. Brevemente aplicar vortex al tubo una vez durante la incubación.

Nota: Durante la incubación en la etapa 5 se puede procesar la muestra.

5. Adicionar 260ul de etanol absoluto a la muestra. Aplicar vortex a máxima velocidad por 20 segundos para mezclar todo. Brevemente centrifugar el tubo para recoger las gotas desde el interior de la tapa.

6. Transferir el lisado desde el paso 5 en la mini columna de DNA HiBind, centrifugar a 10000g por 1 minuto. Descartar el tubo colector.
7. Insertar la mini columna de DNA HiBind dentro de un nuevo tubo colector de 2ml. Adicionar 500ul de HB Buffer y centrifugar a 10000g por 30 segundos. Descartar el tubo colector.
8. Colocar la mini columna dentro de un nuevo tubo colector de 2ml y adicionar 700ul de DNA Wash Buffer y centrifugar a 10000g por 1 minuto. Descartar el líquido del tubo colector y colocar la mini columna nuevamente dentro del mismo tubo colector.
Nota: si la solución de DNA Wash Buffer se encuentra refrigerada debe ser llevada a temperatura ambiente antes de usarla.
9. Adicionar 700ul de DNA Wash Buffer y centrifugar a 10000g por 1 minuto. Desechar el líquido del tubo colector y colocar la mini columna dentro del mismo tubo.
10. Centrifugar a máxima velocidad (>13000g) por 2 minutos para secar la columna. Este paso es crucial para garantizar la elución óptima en el siguiente paso.
11. Colocar la mini columna dentro de un tubo estéril de 1,5ml y adicionar 50-200ul de Buffer de elución (Elution Buffer) pre-calentado (65°C) (10mM Tris-HCl, pH 8.5, 65°C). dejar reposar en la sala de temperatura por 2 minutos.
12. Centrifugar a (>13000g) por 1 minuto. Conservar el tubo que contiene el DNA. Descartar la mini columna y almacenar el DNA eluído a -20°C.

Anexo 4: Solución 1%SDS/PK

Adicionar en un tubo Falcon de 50mL:

- 45mL de agua destilada estéril (HyClone)
- 5mL de SDS10%
- Mezclar por agitación manual invirtiendo el tubo
- De la mezcla anterior extraer 50µl y eliminarlos
- Adicionar a la mezcla 50µl de proteínasa k

Anexo 5: Solución PC-8 (fenol/cloroformo 1:1)

Adicionar en un tubo falcon de 50mL:

- 25mL fenol básico insaturado
- 25mL cloroformo
- Mezclar por inversión (sin agitar)

Anexo 6: Limpieza DNA (protocolo de extracción de DNA desde muestras cervicales con Citobrush, modificado)

Protocolo

9. Agregar 200 ul Acetato de amonio 7,5M pH 7,5 a la muestra de DNA extraída. Agitar en vortex a máxima velocidad por 20 seg. Enfriar 5 min sobre hielo o 2 min. a -20°C para ayudar a precipitar proteínas. Centrifugar a 12000 rpm por 3 min a 4°C.
10. Invertiendo el tubo transferir el sobrenadante (SND) a uno nuevo cuidando de no arrastrar el pellet de proteínas.
11. Agregar 200ul de Cloroformo. Aplicar vortex full. Dejar a T°A por 2 minutos y luego centrifugar a 12.000 rpm por 8 min a T°A.
12. Transferir el sobrenadante (SND) a un tubo que contiene 600 ul de Isopropanol, para precipitar DNA. Examinar por nubecilla en interfase. Mezclar suavemente con la mano no menos de 30 veces y observar si se ven el DNA.
13. Para mejorar precipitación DNA, Incubar a -20°C por 30 min o toda la noche. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C.
14. Lavar el pellet de DNA agregando 600 ul de Ethanol 70%. Mezclar suavemente. Centrifugar a 12000 rpm por 3 min a 4°C. Eliminar bien el SND cuidando de no perder el pellet. Dejar los tubos boca abajo sobre papel absorbente unos minutos para evaporar el etanol.

- 15.** Hidratar el DNA con Buffer TE pH 7.4 (10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA pH 8). Resuspender en 100ul (si se observa pellet) en 50ul (si es muy pequeño) o en 20-30 ul (si no se observa), Dejar hidratar a T^oA toda la noche o incubar a 65° por 1 hora.
- 16.** Guardar DNA a -20°C o -70°C por períodos prolongados.

Anexo 7: Estimación de la calidad del DNA mediante la amplificación por PCR para la detección del fragmento 268 del gen de la β -globina.

Master Mix PCR β -globina

Master mix beta-globina	1X (μ l)	Concentración Final
H2O	4.2	
5X buffer	3.0	1X
MgCl ₂ 25mM	0.9	15mM
dNTPs 1.25mM	2.4	0,2mM
Primers GH20 10 μ M	0.68	0,45 μ M
Primers PCO4 10 μ M	0.68	0,45 μ M
Taq polymerase 5U/ μ l	0.12	0,04 units/ μ l
DNA	3.0	
Volumen total	15	

Control positivo: DNA genómico (Promega), Control negativo: mix de PCR mas agua (HyClone) como muestra, Partidores GH20 (5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3') y PCO4 (5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'). Fragmento a hibridar: 268pb.

Programa Termociclador PCR β -globina

Denaturación inicial: 94°C/3 min

35 ciclos:

Denaturación: 94°C/30 seg.

Alineación: 55°C/30 seg.

Extensión: 72°C/30 seg.

Extensión Final: 72°C/5 min

4°C ∞

Anexo 8: Detección y genotipificación de HPV: Amplificación

Master Mix PCR-BGINN (kit *HPV easy Typing*, protegido por proceso de patentación)

Programa Termociclador PCR-BGINN (kit *HPV easy Typing*, protegido por proceso de patentación)

Anexo 9: Detección y genotipificación de HPV: Hibridación**Protocolo**

Antes de llevar a cabo el protocolo de hibridación propuesto es necesario tomar en consideración los siguientes puntos:

- Calentar y mantener a 42°C las soluciones de Hibridación, Lavado 1 y Lavado 2, hasta su uso.
- Colocar un recipiente con agua en la estufa utilizada para el proceso de hibridación con el fin de proporcionar un ambiente húmedo, manteniendo las rejillas de ventilación abiertas.

Denaturación de productos PCR:

1. En un tubo de 0,5 ml colocar 130 µl de Solución Hibridación y agregar los 25 µl del producto PCR.
Opcional: se puede realizar este paso directamente en el tubo de 0,2 ml que contiene el producto PCR agregando los 130 µl de solución de hibridación. Tapar bien.
2. Denaturar a 95°C por 10 min. Sacar los tubos del Termociclador o bloque térmico y enfriar inmediatamente sobre hielo por 10 min.
Importante: poner extremo cuidado que los tubos no se destapen para evitar contaminación de amplicones; sobre todo si se trabaja con tubos de 0,2 ml.
3. Centrifugar los tubos a 10.000g por 10 seg. antes de abrirlos para evitar contaminación.

Hidratación de las Tiras Diagnósticas:

Mientras se enfrían los tubos en hielo (paso 2 anterior), colocar 150 ul de Solución Hibridación a cada carril de la bandeja de 8 canales, agregar las tiras diagnósticas e hidratarlas a temperatura ambiente por 5 min. **Importante:** tomar las tiras diagnósticas con una pinza desde el tubo que las contiene.

Hibridación de los productos PCR sobre las tiras diagnósticas:

1. Agregar los productos PCR denaturado (155 ul) sobre cada tira diagnóstica, e incubar a 42°C por 60 min en ambiente húmedo con agitación leve (el agitador se coloca dentro de la estufa como también una fuente con agua para dar el ambiente húmedo).
Opcional: se puede realizar agitación manual cada 5 minutos. Evitar formar burbujas.
2. Retirar la Solución de Hibridación con una pipeta Pasteur plástica estéril.
 1. Agregar 1ml de la Solución Lavado 1. Incubar a 42°C por 10 min con agitación. Repetir paso 3.
 2. Retirar la Solución Lavado 1 con una pipeta Pasteur plástica estéril y agregar 1 ml de Solución Lavado 2 (ver Anexo 13). Incubar a 42°C por 2 min con agitación.
 3. Preparar la Solución del Conjugado.
 4. Retirar Solución Lavado 4 con una pipeta Pasteur plástica estéril y agregar 1 ml de Solución del Conjugado recién preparada. Incubar a 42°C por 30 min con agitación. Retirar la Solución del Conjugado.
 5. Agregar 1 ml de Solución Lavado 4. Incubar a 42°C por 10 min con agitación. Repetir este paso.
 6. Retirar Solución Lavado 4 y agregar 1 ml de Solución Detección. Incubar a 42°C por 1 min con agitación. Este paso prepara la tira para la reacción de revelado. Retirar Solución Detección.

Revelado de la Tira diagnóstica:

1. Preparar la Solución del Sustrato en un tubo envuelto en papel de aluminio (solución fotosensible)
2. Agregar 0,5 ml de Solución del Sustrato. Incubar a 42°C por 30 min en oscuridad sin agitación.
3. Detener la reacción agregando aproximadamente 1 ml de agua destilada con una piseta.
4. Sacar las tiras diagnósticas con pinzas y ponerlas sobre una hoja de papel para secarlas. Una vez secas se pueden cubrir con una cinta scotch para guardarlas. Opcional: se pueden digitalizar.
5. Los resultados se pueden leer inmediatamente o dentro de las 24 hrs. Para leer poner la tira diagnóstica en paralelo con la plantilla patrón