

**IDENTIFICACIÓN DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO EN
MUJERES QUE ASISTEN AL SERVICIO DE
COLPOSCOPIA DE *LA LIGA DE LUCHA CONTRA EL
CÁNCER* EN LA CIUDAD DE NEIVA.**

**BEATRIZ ELENA CALDON VILLAR
ADRIANA ESTEVEZ DURAN**

TUTOR

**YENNY M. MONTENEGRO MEDINA, Bact, MSc CBB
HENRY OSTOS ALFONSO, M.D. Genetista**

LABORATORIO DE MEDICINA GENOMICA

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
2003**

**IDENTIFICACIÓN DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO EN
MUJERES QUE ASISTEN AL SERVICIO DE
COLPOSCOPIA DE LA LIGA DE LUCHA CONTRA EL
CÁNCER EN LA CIUDAD DE NEIVA.**

**BEATRIZ ELENA CALDON VILLAR
ADRIANA ESTEVEZ DURAN**

PRESENTADO A: Dr. GILBERTO ASTAIZA

TUTOR

**YENNY M. MONTENEGRO MEDINA, Bact, MSc CBB
HENRY OSTOS ALFONSO, M.D. Genetista**

LABORATORIO DE MEDICINA GENOMICA

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
2003**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
2. OBJETIVOS	7
3. CANCER DE CERVIX	8
3.1. ANTECEDENTES	8
3.2. EPIDEMIOLOGIA	8
3.3. ETIOLOGIA	8
3.3.1 <i>Papillomavirus humano</i> (HPV)	10
3.4. FACTORES DE RIESGO	10
3.5. PATOGENESIS	13
3.5.1 Papillomavirus y Carcinogénesis	14
3.6. MANIFESTACIONES CLINICAS	17
3.7. DIAGNOSTICO	18
4. METODOLOGIA	19
4.1. TIPO DE ESTUDIO	19
4.2. AREA DE ESTUDIO	19
4.3. POBLACIÓN	19
4.4. MUESTRA	19
4.5. CRITERIOS DE SELECCION	20
4.5.1. Criterios de inclusión	20
4.5.2. Criterios de exclusión	20
4.6. UNIDAD DE ANÁLISIS	20
4.7. MUESTREO	21
4.8. TÉCNICAS	21
4.8.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR	21
4.8.2 Electroforesis	22

4.9. INSTRUMENTOS	22
4.10. Operacionalización de las variables	23
4.10.1. Sociodemográficas	23
4.10.2. Factores de riesgo	23
4.10.3. Reporte de citología	23
4.10.4. <i>Papillomavirus</i> humano	24
4.11 PLAN DE TABULACIÓN	24
4.12 PLAN DE ANÁLISIS	24
4.13 ESTRATEGIAS DE DIFUSIÓN	25
5. PROCEDIMIENTOS	25
5.1. IDENTIFICACION DE PACIENTES	25
5.2. MUESTRAS	26
5.3. EXTRACION DE ADN	28
5.4. EVALUACION DE ADN	29
5.5 IDENTIFICACION DE HPV	33
6. ANALISIS DE RESULTADOS	33
6.1. CARACTERIZACION DE LAS PACIENTES	35
6.2. PRUEBAS DE LABORATORIOS	37
7. DISCUSION	41
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	

INTRODUCCION

El Cáncer de Cérvix (CC) es el segundo tumor mas frecuente en el mundo y la primera causa de cáncer en mujeres de países en vía de desarrollo¹, causando solamente en Colombia durante 1.999 más de 2.096 muertes, por lo cual se considera como un problema de salud pública que produce gran morbi-mortalidad, afectando principalmente a la población de estratos socioeconómicos bajos.¹ Así, en los datos informados por la Secretaría de Salud Departamental del Huila, entre al año 1.996 y 1.998, 679 mujeres han sido afectadas con neoplasia cervical; de las cuales el 44% se encuentran entre 15 y 44 años.⁵

A pesar de que al CC se le han atribuido diferentes factores etiológicos, se ha establecido que la presencia de ciertos tipos de *Papillomavirus humano* (HPV) son la causa principal del cáncer¹⁻⁴, los cuales se han clasificado en alto riesgo o carcinogénicos y otros como probablemente carcinogénicos¹, por lo cual la determinación del HPV en una paciente puede ser una herramienta pronostica de gran ayuda para determinar el riesgo de que una lesión intraepitelial progrese a neoplasia.

Si tenemos en cuenta que Colombia está clasificado dentro de los países de alto riesgo para CC¹ y que en nuestro medio no se cuenta con las técnicas adecuadas para identificar los diferentes tipos del virus, es de gran importancia el desarrollo de trabajos como el nuestro cuyo objetivo es iniciar una línea de investigación para la diferenciación de este agente en mujeres con factores de riesgo, mediante técnicas de biología molecular con resultados altamente específicos y sensibles en un periodo muy corto y que permitan finalmente, la prevención de estadios tardíos de esta enfermedad mejorando considerablemente la sobrevida de los pacientes.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CC es un problema de salud pública a nivel mundial que causa la muerte de 233.400 mujeres al año², siendo el segundo tumor más frecuente y ocupando la quinta causa de mortalidad por cáncer en mujeres. Sólo en el 2002, 4.100 mujeres murieron a causa de esta enfermedad en los Estados Unidos, mientras que en los países en vía de desarrollo como Chile, Perú, Costa Rica, Zimbawe y Colombia, se piensa que la mortalidad fue casi del triple.^{1,2}

En Colombia el CC, ocupa el primer lugar de mortalidad por cáncer en mujeres; causando 2.097 muertes en 1.999². La detección temprana de esta enfermedad es importante por cuanto en estadios tempranos de diagnóstico, la tasa de supervivencia a 5 años es aproximadamente del 90%, comparado con el 14% en pacientes en quienes se diagnostica en etapas avanzadas².

Diferentes grupos de investigación vienen desarrollando estudios en busca de obtener mayor información acerca de los factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad; a partir de los cuales se ha determinado que el HPV es una de las principales causas, si se tiene en cuenta que el riesgo de CC para una mujer con HPV en células cervicales es 65 veces mayor que el de una mujer HPV negativa, aumentando 130 veces más, si el tipo viral es HPV 16 para carcinomas escamosos y para adenocarcinomas cuando el agente infectante es el HPV 18.^{7,8}

En la actualidad se acepta que la fracción atribuible al HPV de CC es cercana al 100%; es decir, que casi en la totalidad de los tumores invasivos del cuello uterino es posible detectar el ADN del HPV y asumir un papel causal^{7,8}.

Se han desarrollado técnicas que permiten la rápida tipificación del HPV, estos estudios permiten determinar el tipo de virus más frecuente entre las mujeres con

citologías anormales, facilitando la determinación del riesgo asociado con el desarrollo del cáncer y permitiendo así establecer relaciones entre el tipo de HPV y las anormalidades detectadas en la citología cervicovaginal (CCV) ⁹. En Colombia, el Instituto Nacional de Cancerología (INC), ha venido desarrollando diferentes metodologías que conllevan al diagnóstico temprano del HPV, con el fin de disminuir la incidencia de la enfermedad en nuestra población, sin embargo estos estudios se encuentran aún en la fase de investigación.

En nuestra región existe un alto riesgo de CC, teniendo en cuenta que solamente la Liga de Lucha Contra el Cáncer de Neiva (LLCCN) en el 2.002 atendió 30.991 pacientes, de las cuales el 9.2% fueron informadas con citologías anormales. Por lo cual, hemos enfocado este trabajo en el desarrollo de una técnica altamente sensible y específica para la detección del HPV y posteriormente la diferenciación del HPV 16 y HPV 18, a los cuales se les atribuido un alto poder carcinogénico, con el fin implementar una técnica diagnóstica útil para el clínico y accesible a la comunidad .

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Identificar en mujeres que asisten al servicio de colposcopia de la Liga de Lucha contra el Cáncer de la ciudad de Neiva, la presencia de HPV mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Diferenciar mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los tipos de HPV 16 y 18 en mujeres positivas por PCR para HPV.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar mujeres de alto riesgo para HPV que asisten a la LLCCN
- Estandarizar la técnica de extracción de ADN de HPV a partir de muestras clínicas de colposcopia.
- Identificar mujeres positivas para HPV mediante la amplificación de la región tardía L1, altamente conservada en el género Papillomavirus.
- Diferenciar los tipos de HPV 16 y 18 mediante el uso de primers específicos de tipo, mediante PCR.
- Correlacionar factores de riesgo como la edad de inicio de las relaciones sexuales, el número de compañeros sexuales y la paridad con los hallazgos de laboratorio.

3. CANCER DE CERVIX

3.1 ANTECEDENTES

Desde 1.907 se descubrió que las verrugas humanas demostradas en 1.891 por Joshep Payne eran de naturaleza viral^{15,17}, siendo en 1.933 aislado el primer virus papiloma en conejos de rabo blanco (CRPV) por R. Shope y cols^{15,17} y en las siguientes dos décadas, demostrado que se transmitía intra especie, evolucionando en muchos casos a carcinoma. Entre 1.940 y 1.950 estudios con microscopia electrónica, confirmaron una causa viral para las verrugas cutáneas y en 1.950 Koss describió el Koilocito, una célula escamosa superficial que refleja el efecto citopático de la infecciones por HPV, reconociendo el vínculo histológico de la infección HPV a las premalignidades cervicales. Posteriormente, en 1.970 partículas del virus fueron identificadas en verrugas genitales humanas^{15,17}.

Actualmente, la identificación y diferenciación del HPV es realizado por técnicas de biología molecular como la PCR y el SSCP¹⁰, aumentando la sensibilidad para detectar el HPV y de esta manera definir el rol del *Papilomavirus* en la etiología del CC.

3.2. EPIDEMIOLOGÍA

El CC es el segundo tumor más frecuente en mujeres a nivel mundial después del cáncer de seno¹. Aproximadamente 450.000 nuevos casos se detectan cada año y cerca de 200.000 muertes son atribuías a esta enfermedad¹⁰. Se dice que el 80% de los casos de cáncer de cuello uterino se detecta en los países en desarrollo, y de éstos, más de 2/3 partes se diagnostican en estados avanzados que disminuyen la tasa de sobrevida de las pacientes del 90% al 14% si se diagnosticara precozmente². En los últimos 40 años, las tasas de incidencia y

mortalidad han disminuido en casi todos los países desarrollados, fenómeno que se atribuye a las campañas de promoción y prevención mediante la detección por citología. La incidencia de CC, al igual que la mortalidad muestran una amplia variación geográfica, siendo más altas en los países en desarrollo, siendo en Latinoamérica, especialmente alta en el Caribe.

El Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE) registró 183.553 muertes en Colombia en 1.999. La primera causa de mortalidad entre los colombianos son las enfermedades cardiovasculares (50.305 muertes) y en segundo lugar se encuentra el cáncer con 26.932 muertes, de las cuales 2.097 son atribuidas a cáncer de cérvix².

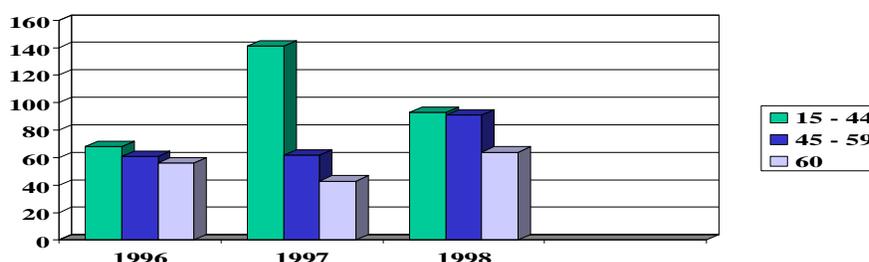
La áreas con mayor mortalidad por cáncer de cérvix en Colombia son: Valle (289), Antioquia (276), Santander (103) y Tolima (102)². En el Departamento del Huila de acuerdo a datos informados por la Secretaría de Salud Departamental, entre los años 1.996 y 1.998 se diagnosticaron 679 mujeres con tumor maligno de cuello uterino observándose un aumento notable de los casos, los cuales pasaron de 185 en 1.996 a 248 en 1.998, siendo la mayor incidencia de este tipo de tumor en mujeres con edades que oscilan entre los 15 y los 44 años, las cuales representan un 44% de mujeres diagnosticadas; el 46% restante corresponde a mayores de 45 años.⁵ (Figura 1), sin embargo estos datos no muestran la realidad de nuestra región ya que los programas epidemiológicos establecidos no informan de todos los casos presentes los cuales, tal vez nos atrevemos a sugerir, triplican esta cifra.

El CC afecta a todos los grupos de edad, pero es más frecuente en la tercera década de la vida. El carcinoma *in situ* suele diagnosticarse con más frecuencia en las personas jóvenes, estando el pico de incidencia entre los 25 y 40 años, mientras que el carcinoma invasor suele desarrollarse entre los 40 y 50 años. Estos datos sugieren que la incidencia de la enfermedad localizada disminuye con

la edad, observándose el largo tiempo que transcurre entre el carcinoma *in situ* y el carcinoma invasor; es por esto que se considera que este tipo de cáncer puede ser tratado exitosamente si se diagnostica rápida y eficazmente^{2,11}.

Figura 1. Reporte de frecuencia de casos según edad 1996-1998

No DE CASOS REPORTADOS POR LA SECRETARIA DE SALUD DEL DEPTO DEL HUILA DE TUMOR MALIGNO DE CUELLO UTERINO



3.3. ETIOLOGIA

Aunque los factores etiológicos y de riesgo que inducen el CC son múltiples (socioeconómicos, infecciosos, químicos e inmunológicos)^{2,13,22}; la infección con HPV se considera determinante^{3,4}. De acuerdo a estudios realizados en el Instituto Nacional de Cáncer de Bethesda, donde fueron analizados por PCR 1.000 muestras tumorales de CC, la prevalencia de HPV fue del 93%, llegándose a afirmar que la presencia de CC sin HPV es excepcional^{6,14}.

PAPILLOMAVIRUS HUMANO

El HPV es un virus de ADN perteneciente al género *Papillomavirus* de la familia *Papoviridae*. Esta constituido por un genoma circular de aproximadamente 7.900

pb y envuelto por una cápside proteica. Se han identificado más de 70 tipos de HPV los cuales se diferencian entre sí por el grado de homología de la secuencia de ácidos nucleicos y la afinidad específica por diferentes sitios anatómicos. Así, solamente un subgrupo de estos, está asociado con lesiones que pueden

progresar a cáncer, de los cuales los tipos 16, 18, 32, 45, 51, 52, 53, 58 y 59 están principalmente asociados con tropismo hacia los queratinocitos del epitelio escamoso en el tracto genital, ya que se han identificado en más del 90% de los CC y en el 100% de los carcinomas *in situ*.^{1,9,19}

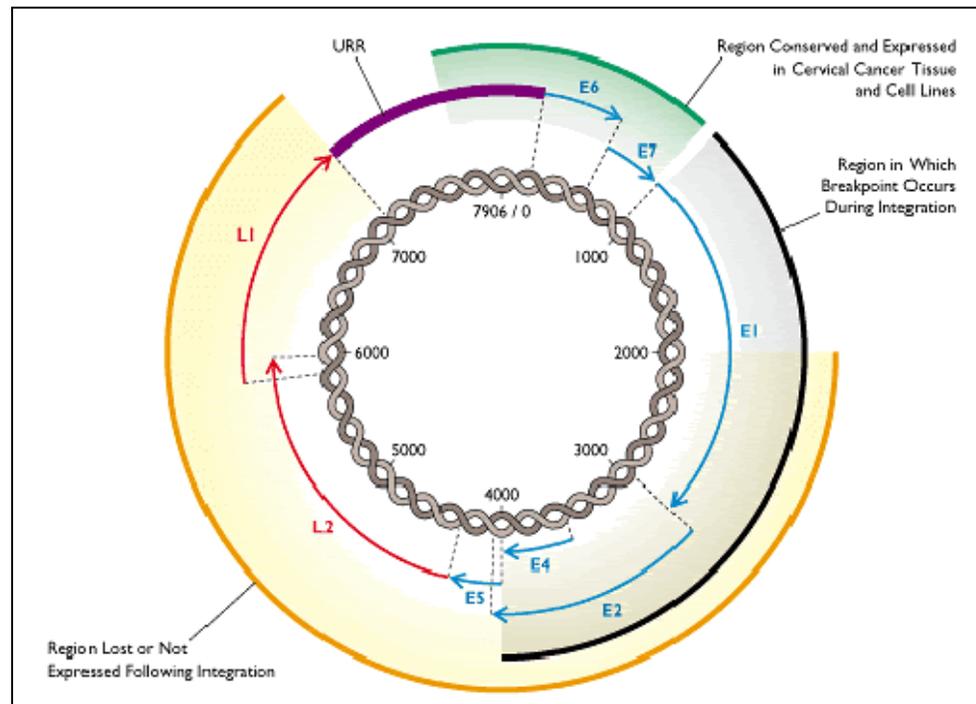
Todos los *Papillomavirus* conservan una estructura genómica semejante; la cual se puede dividir en 3 regiones diferentes: Una región **larga de control (LCR)** también denominada *URR* que corresponde al 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción. Esta región se encuentra dividida en dos dominios: el RE2, regulado por la presencia de la proteína viral E2 y donde se localiza el origen de la replicación de ADN viral, el promotor temprano; y el dominio CE (*celular enhacer*), un fuerte potenciador de la transcripción que depende exclusivamente de factores transcripcionales celulares. En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes E6 y E7; posee una caja TATA y los sitios de interacción de la proteína viral E2, además de sitios de unión para el factor celular Sp1 (*proteína estimulante de la transcripción*). En este dominio se ha descrito el origen de replicación del ADN viral, dependiente de la presencia de las proteínas virales E1 y E2 (figura 2).

La especificidad tisular de los papilomavirus reside en el CE, donde la participación conjunta de factores celulares promueve la actividad del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial. La región CE se compone

de numerosos sitios de asociación específica a diversos factores de transcripción de origen celular, tales como AP-1, NF-1/CTF, Octa-1, TEF o F entre otros.

Además, se ha descrito la presencia de un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG), el cual promueve la transcripción de HPV por estímulo hormonal.¹⁷

Figura 2: Mapa genético de HPV



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

P97, el cual dirige la síntesis de E6 y E7. De E3 aún no se conoce el producto proteico ni la función ⁸.

E4 produce proteínas que intervienen en la maduración de las partículas virales, por lo cual se cree inicia los cambios coilocíticos en las células epiteliales y E5 produce una pequeña proteína que se une a la membrana citoplasmática. La pérdida o mutación de esta última, evita la replicación episomal del ADN y favorece la integración del ADN al cromosoma, mientras que las regiones E6 y E7 producen dos oncoproteínas transformantes¹⁹.

La región tardía o late (L) que corresponde al 40% del genoma; codificadas para las proteínas pL1 (conservada en los diferentes tipos de papiloma) y pL2 (específica para cada tipo viral). Estos genes tardíos se expresan en la fase final de la infección y codifican proteínas estructurales relacionadas con el ensamblaje de las partículas virales (proteínas de la cápside)^{8,19}.

3.4. FACTORES DE RIESGO

La presencia de HPV de alto riesgo no debe considerarse en ningún caso como el único evento requerido para la progresión a neoplasia, requiere en muchas ocasiones, años de desarrollo y su presentación se ve favorecida por diversos cofactores, tales como el uso de anticonceptivos orales (ACO), el hábito de fumar, la infección por VIH, el nivel socioeconómico bajo, la multiparidad y la promiscuidad entre otros. ^{2,3}

Aunque las evidencias para la asociación de cáncer cervical con el uso de anticonceptivos hormonales no es completamente consistente en algunos estudios, el publicado por Bosch y col ²⁷ encontró que el uso de estos por cinco años o más aumenta cuatro veces el riesgo de desarrollar la enfermedad en

mujeres portadoras de HPV²⁷. Estos resultados aparentemente contradictorios pueden reflejar una mejor vigilancia citología en mujeres que usan ACO en los países desarrollados.³

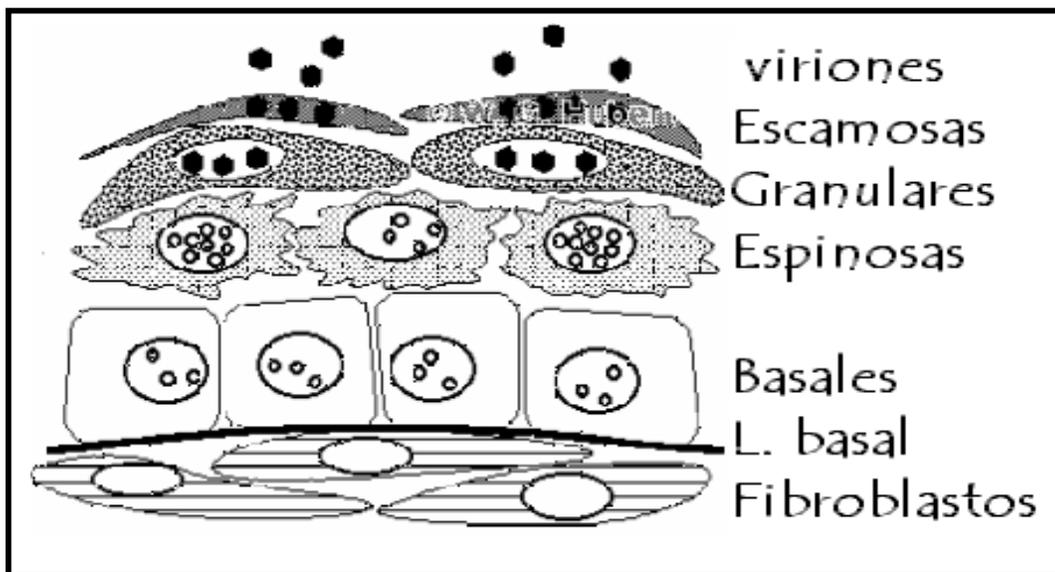
Se conoce que la infección por VIH y la inmunosupresión están asociados con el aumento del riesgo para desarrollar Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) ^{12,24}. Así mismo, se informa la relación que hay entre las mujeres HPV positivas y el número de embarazos; siendo el riesgo cuatro veces mayor en mujeres con siete o más partos comparado con las mujeres nulíparas³. En ausencia de HPV el riesgo es dos veces mayor en mujeres multiparas con respecto a las nulíparas³.

El cigarrillo ha sido relacionado con el cáncer cervical desde los años 70, basados en la correlación que se ha visto entre el tabaco y otros cánceres. Se sabe que en mujeres fumadoras, el riesgo es tres veces mayor y aunque este factor puede ser considerado como independiente de la infección con HPV no puede ser evaluado definitivamente^{3,15}.

3.5. CICLO DE VIDA DEL PAPILOMAVIRUS Y CARCINOGENESIS

Para que los *Papilomavirus* puedan penetrar e iniciar un proceso infeccioso se requiere una continuidad de tejidos, de manera que el virus pueda ponerse en contacto con las células basales de los epitelios que son las células blanco e iniciar la replicación viral en las células espinosas. El ensamble de los viriones se lleva a cabo en los estratos superiores del epitelios cuando las células se han diferenciado (células granulares). Finalmente, en las células escamosas los viriones son expulsados y pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (figura 3).

Figura 3. Ciclo de vida del *Papillomavirus humano*.



La infección puede permanecer latente o volverse productiva, dependiendo de otros factores como: el consumo de tabaco, la presencia de otros agentes infecciosos y la de esteroides, entre otros. La *Infección latente* es una infección viral sin producción del virus, en la que el ADN viral permanece en el núcleo como una molécula libre circular llamada episoma. En este momento, los efectos citopáticos del virus no están presentes en estas células, mientras que una *Infección productiva* es donde la replicación del ADN viral ocurre de manera independiente al ADN nuclear, produciendo grandes cantidades de material genético del virus y llevando a la producción de múltiples viriones. Este proceso ocurre especialmente en las células superficiales, estimulado por: factores transcripcionales específicos de diferenciación celular y de maduración epitelial, la producción de queratina y otras proteínas, terminando en la producción de proteínas de la cápside y el ensamble de nuevas partículas virales que finalmente llevan a los efectos citopáticos característicos de la infección por HPV detectados por citología o histológicamente mostrando el ADN viral en forma episomal o integrada⁸. Estos efectos aparecen aproximadamente 3 meses después de la

infección genital, con un rango entre tres y ocho meses, aunque puede prolongarse hasta por 7 años.

Los mecanismos de transformación son complejos y al parecer varían de un virus a otro. El principio general consiste en que dos o más proteínas tempranas cooperan para dar un fenotipo transformado. En la mayoría de HPVs, la proteína E2 se une a la región del promotor temprano, disminuyendo y regulando la expresión de E6/E7; la pérdida de E2 es por lo tanto el primer paso en la transformación y es lo que ocurre cuando sucede la *integración* viral, al romperse el punto de transcripción de los genes E1 y/o E2, lo que resulta en una sobreexpresión de los genes E6/E7⁸.

Los genes E6 y E7 representan los principales genes transformadores del HPV. En algunas lesiones la sobre expresión de E6, puede conducir a la unión de esta proteína con p53, formando un complejo trimérico junto con la proteína asociada a E6 que son degradados por la vía de la ubiquitina y al reducir la efectividad de p53 como regulador del ciclo celular, las células pueden pasar a S con daños.

E7 se une a p107, a la ciclina A y al pRb que regulan la progresión del ciclo celular de G1/S, bloqueando su función normal y estimulando la producción de la maquinaria replicativa de la célula por exceso de E2F libre. Este fenómeno es diferente según el tipo de virus que haya infectado la célula; en general los productos de E6/E7 de cepas de alto riesgo se unen a estas proteínas celulares de manera más eficiente que las de cepas de bajo riesgo.^{8,19}. En humanos, la proteína E6 tiene mayor afinidad por p53 cuando esta presente el aminoácido ARG en el codon 72, lo que quiere decir, que una persona con factores de riesgo similares a alguien con genotipo PRO/ARG tiene un riesgo 7 veces mayor de desarrollar CC asociado a HPV²⁸.

E5 es otro gen transformador del virus que actúa como oncogen al sobre estimular los receptores de factores de crecimiento epidérmico, que son esenciales para la proliferación de los queratinocitos en la fase G1/S, aumentando el riesgo de daños cromosómicos sin reparar, que finalmente llevan a la inmortalización de las células epiteliales y a la inestabilidad genética, y por ende a la acumulación gradual de cambios celulares específicos requeridos para la tumorigénesis. Este proceso finalmente se ve reflejado en el largo período de tiempo que se describe entre el inicio de la infección y la aparición de lesiones invasivas del cérvix.

Se ha encontrado también que E6 y E7 son activamente transcritos en el CC, lo que sugiere la expresión permanente y no regulada de estos genes para mantener el fenotipo transformado. *In vitro* se ha observado que al inhibir las funciones de E6/E7 las células transformadas vuelven a la normalidad ^{3,8,15}.

3.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Se sabe que la infección con el virus del *Papiloma humano* es asintomática, por lo cual la consulta es tardía. Los signos y síntomas de CC son variables e insidiosos. La neoplasia cervical precoz suele ser asintomática pero algunas pacientes presentan una secreción vaginal oscura de olor fétido, con filtraciones por fístulas vesicales o rectales, lesiones exofíticas o ulceradas, anorexia, pérdida de peso así como dolor lumbar. También puede presentarse macroscópicamente como una masa necrótica, exofítica y fungosa; como una úlcera maligna o como una lesión difusamente infiltrativa con alteración mínima de la superficie. Clínicamente el carcinoma invasor se manifiesta con hemorragia uterina anormal o secreciones vaginales. La obstrucción del conducto endocervical puede causar acumulación de sangre en la cavidad uterina y ocasionar infección.

3.7 DIAGNÓSTICO

La neoplasia cervical precoz puede detectarse antes de que se manifieste clínicamente por medio del examen citológico de extendidos cervicales. Microscópicamente hay 3 tipos distintos: carcinoma escamoso no queratinizante de células grandes que es el tipo más común, el carcinoma escamoso de células grandes queratinizante, que le sigue en frecuencia, y el carcinoma indiferenciado de células pequeñas que es poco frecuente.

La prueba de Papanicolau puede detectar el 90% o más de las neoplasias cervicales iniciales, pero su sensibilidad disminuye para descubrir un cáncer cuando existe un tumor francamente invasor o unas masas fungosas. La inflamación, la necrosis y las hemorragias pueden dar falsos positivos y es preciso realizar una biopsia bajo control colposcópico siempre que exista cualquier lesión visible en el cervix independiente de los hallazgos del frótis de Papanicolau.

El diagnóstico citológico de lesiones premalignas se lleva a cabo de acuerdo con el Sistema Bethesda¹⁸, el cual tiene una categorización general de acuerdo a los hallazgos anormales. Esta categoría es usada después como una ruta de triage para separar las muestras que son completamente normales mostrando cambios benignos y otras con células epiteliales anormales.

Diagnostico por Técnicas Moleculares

Existen diferentes métodos de diagnóstico virológico que implican el empleo de técnicas como Southern blot, dot blot, hibridización in situ, captura híbrida y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) entre otras. La PCR es una de las técnicas más sensibles; actualmente que tiene la ventaja de detectar cantidades mínimas de ADN viral, dependiendo de los primers usados.

4. METODOLOGÍA

4.1. TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de tipo ***Estandarización de una Técnica***, con el objetivo de identificar el virus de HPV y diferenciar los tipos 16 y 18 en las mujeres que asisten a la consulta de colposcopia de la LLCCN.

4.2. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio es la LLCCN y sus áreas de influencia.

4.3. POBLACIÓN

Son todas las mujeres en edad fértil que asisten al servicio de colposcopia en la LLCCN, que cumplen con los criterios de inclusión.

4.4. MUESTRA

Se tomaron 58 muestras positivas para HPV según colposcopia, para llevar a cabo la amplificación de la región conservada L1 de Papilomavirus y la diferenciación del tipo específico (HPV 16, 18 u otro).

Como control negativo se le realizó el mismo procedimiento a 20 muestras de citología normal para determinar la especificidad de la técnica. Dada la ausencia de una prueba de oro para definir sensibilidad, esta se calculó comparando nuestro resultado con el de las biopsias, prueba diagnóstica empleada actualmente en la institución de referencia.

Los controles positivos empleados, fueron las cepas Siha (HPV 16) y Hela (HPV 18), donadas por el Instituto Nacional de Cancerología.

4.5. CRITERIOS DE SELECCION

4.5.1. Criterios de inclusión

Las muestras analizadas deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Mujeres colombianas que asistan al servicio de colposcopia de la LLCCN.
- Pacientes sexualmente activas
- Antecedentes de citología anormal
- Paciente con diagnóstico de Cáncer de Cérvix

4.5.2. Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión de las muestras son los siguientes:

- Mujeres que no asistan a la LLCCN
- Pacientes con citología normal
- Mujeres con procedimientos previos como: Histerectomía, Conización, criocauterización.

4.6. UNIDAD DE ANÁLISIS

La muestra se obtendrá a partir de cepillados endocervicales y exocervicales, previo consentimiento informado (Anexo 1) de cada una de las mujeres seleccionadas que acuden a la consulta de colposcopia de la LLCCN.

4.7. MUESTREO

La muestra es recolectada con escobillón desechable, por medio de cepillado endocervical y exocervical. Se transporta en un tubo falcon de 15 ml con 5 ml de solución PBS (Buffer fosfato salino) + timerosal al 0.05%, bajo refrigeración.

4.8. TÉCNICAS

Con el fin de tener un acercamiento a las diferentes técnicas de biología molecular empleadas para la detección del HPV se realizó una pasantía por el Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de Bogotá.

4.8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El conocimiento de los pasos esenciales de la división celular marcó la pauta para implementar la técnica, ya que la PCR consiste en efectuar una amplificación de una secuencia específica de ADN en más de 10^6 veces, por medio de la repetición de un ciclo de amplificación con ADN polimerasa termoestable y un par de iniciadores que flanquean la secuencia de interés. Toda PCR incluye tres pasos generales: Denaturación, Alineamiento y Extensión, para completar un ciclo de reacción. En la **Denaturación**, se abren las cadenas que van a ser amplificadas en dos filamentos complementarios (Templete) por medio de altas temperaturas; el **Alineamiento** es la unión de los primers (secuencia de nucleótidos sintetizados que son complementarios a la región 3' del fragmento a sintetizar) al templete para permitir la acción de la polimerasa y la **Extensión** es donde la reacción se ajusta a la temperatura óptima de la enzima para permitir la adición de los nucleótidos y llevar a cabo la amplificación.

4.8.2 Electroforesis

La electroforesis es una técnica analítica de separación que tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico como consecuencia de su relación carga/masa. Los ácidos nucleicos están cargados negativamente. La electroforesis en gel se realiza en cubetas apropiadas, generalmente horizontales, y requiere dos elementos indispensables: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio amortiguado que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. La fase estacionaria o soporte, es un polímero de naturaleza gelatinosa con un tamaño de poro homogéneo que se haya sumergido y embebido en la fase móvil.

Transcurrida la electroforesis, la localización relativa de los fragmentos se determina mediante distintos métodos de detección. La tinción con bromuro de etidio y las sondas fluorescentes, son métodos para la detección de fragmentos de ADN.

4.9. INSTRUMENTOS

La información será recolectada a través de una entrevista a la pacientes que asisten al servicio de colposcopia, previo consentimiento informado (Anexo 2).

4.10. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

4.10.1. Socio-Demográficas

Son las características de persona, tiempo y lugar de las mujeres que van a la consulta de colposcopia a la LLCCN.

DIMENSIÓN	CATEGORÍAS	INDICADOR	NIVEL DE MEDICIÓN
Nombre			Nominal
Edad	-Número de años cumplidos	Porcentaje por grupo de edad	Razón
Procedencia	-Urbano -Rural -Ciudad y departamento	Porcentaje por cada categoría	Nominal

4.10.2. Factores de Riesgo

Características de la sexualidad de la paciente

DIMENSIÓN	CATEGORÍAS	INDICADOR	NIVEL DE MEDICIÓN
Parejas sexuales	Número parejas sexuales	Promedio de parejas	Razón
Gestaciones	Número de gestaciones	Promedio de gestaciones	Razón
Tabaquismo	Habito de fumar	Promedio para cada categoría	Nominal

4.10.3. Diagnostico de la citología

Características reportadas en la citología de la paciente

DIMENSIÓN	CATEGORÍAS	INDICADOR	NIVEL DE MEDICIÓN
Tipo de lesión presente en las pacientes	ASCUS	Porcentaje por cada categoría	Nominal
	LG-SIL	Porcentaje por cada categoría	Nominal
	HG-SIL	Porcentaje por cada categoría	Nominal
	Carcinoma escamocelular	Porcentaje por cada categoría	Nominal
	AGCUS	Porcentaje por cada categoría	Nominal
	Adenocarcinoma	Porcentaje por cada categoría	Nominal

4.10.4. Papilomavirus Humano (HPV)

El HPV es un virus de ADN presente en mujeres que asisten a citología.

DIMENSIÓN	CATEGORÍAS	INDICADOR	NIVEL DE MEDICIÓN
Extracción de ADN	-Presencia o ausencia de ADN	Porcentaje por cada categoría	Nominal
Identificación del HPV	-Presencia o no de HPV	Porcentaje por cada categoría	Nominal
Tipificación del virus	-Tipo de HPV (16, 18, otro)	Porcentaje de cada categoría	Nominal

4.11. PLAN DE TABULACIÓN

Los datos recolectados serán analizados en el programa EPI-INFO 2.000 y luego organizados en tablas y gráficas en un procesador de textos.

4.12. PLAN DE ANÁLISIS

Para evaluar la especificidad y la sensibilidad de las técnicas utilizadas se empleará el riesgo relativo (RR) y odds ratio (OR) en el programa EPI-INFO2000, así como las medias y modas.

4.13. ESTRATEGIAS DE DIFUSIÓN

Los resultados obtenidos se enviarán para su publicación en una revista de circulación nacional y se expondrán en congresos nacionales.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES

De acuerdo con los criterios de selección mencionados anteriormente se incluyeron 58 pacientes identificadas entre octubre y diciembre del 2003 procedentes de: Neiva, Nataga y Aipe entre otros.

Entre diciembre del 2002 y septiembre del 2003, previo consentimiento informado se tomaron especímenes de pacientes positivas, con el fin de llevar a cabo la estandarización de las técnicas presentadas en este estudio, por lo cual no serán tomadas como muestras para el análisis estadístico.

A veinte mujeres con muestras de citología normal que asistieron a la LLCCN, previo consentimiento informado se les tomó un cepillado adicional para emplearlas como controles negativos. Estas mujeres fueron identificadas ya que asistieron al servicio de ginecología de la LLCCN por motivos diferentes a sospecha de HPV y se incluyeron en el estudio, después de obtener el resultado de la citología por el Laboratorio de esta institución.

5.2. MUESTRAS

A cada paciente, se le tomó un cepillado de endocervix y exocervix en un tubo falcon de 15ml con 5 ml de buffer PBS y timerosal al 0.05%. Posteriormente se le realizó una entrevista para completar el instrumento de análisis y los demás datos se obtuvieron mediante la revisión de la Historia Clínica.

5.3. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la obtención de ADN se emplearon tres métodos: Cloroformo Alcohol Isoamílico (24:1), extracción según Walboomers⁹ y la extracción según Gómez y cols.²⁹

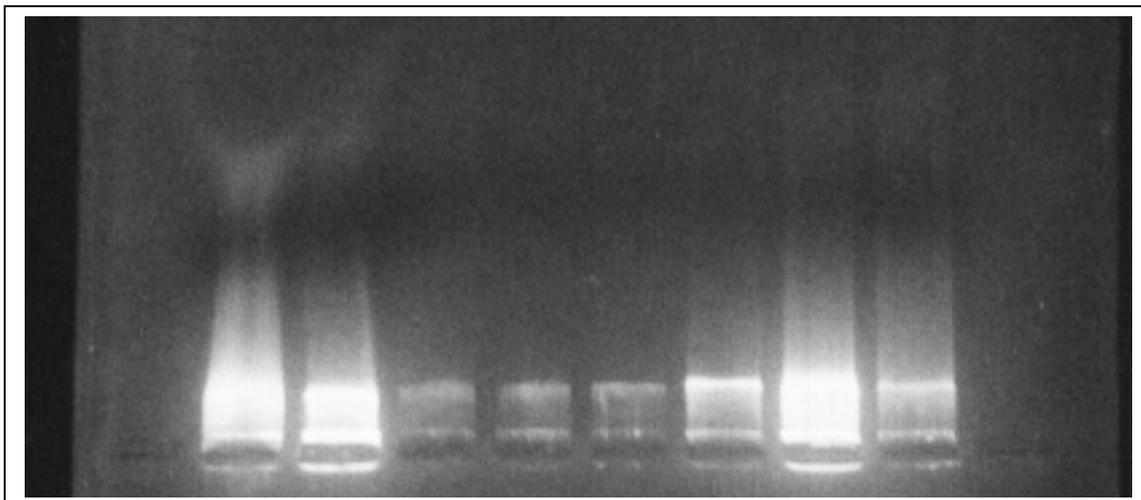
En la extracción con Cloroformo Alcohol Isoamílico (24:1) (Anexo 3), se utilizó SDS (Suero Dodecil Sulfato) como detergente para ayudar a romper las membranas celulares y la proteinasa K que como su nombre lo indica rompe proteínas. Adicionalmente, se aumentó el tiempo de lisis, de 10 minutos a 12 horas para mejorar la degradación. La confirmación de la extracción fue realizada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.. (Figura 4)

Figura 4: Extracción de ADN con la técnica de cloroformo-OH isoamílico, a partir de muestras de colposcopia.



Buscando mas eficiencia en la extracción del ADN se ensaya el método Fenol – Cloroformo-Alcohol Isoamílico (Anexo 4), en donde el fenol actúa como solvente orgánico, mejorando la separación entre la fase orgánica y la fase acuosa en la que se encuentra el ADN. (Figura 5)

Figura 5: Extracción método Fenol-Cloroformo-OH isoamílico



Aunque obtuvimos resultados favorables e iniciamos nuestros ensayos de PCR decidimos probar la técnica publicada por Walboomers y colaboradores⁹ (Anexo 5), sin obtener buenos resultados. Finalmente se ensayo lo planteado por Gómez y cols²⁹ (Anexo 6), obteniendo mejores resultados que con las técnicas anteriores y disminuyendo los costos y tiempo del procedimiento (figura 6). Adicionalmente, la metodología de éste, no expone al laboratorista a compuestos altamente tóxicos como el fenol, obteniendo entre 100 y 200 ng/μl.

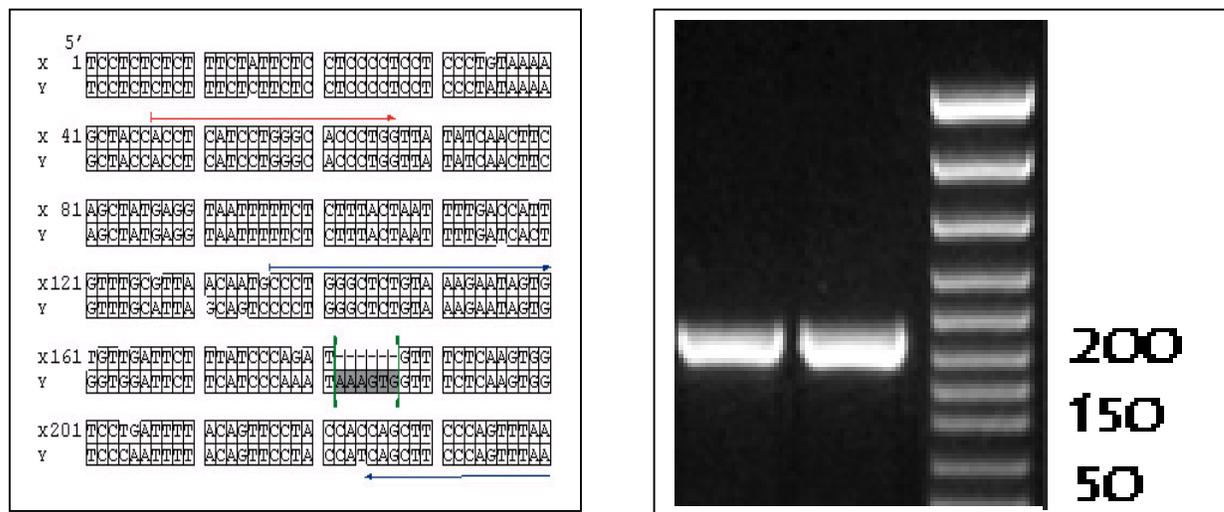
Figura 6. Extracción de ADN con el método propuesto por Gómez y cols²⁹.



5.4. EVALUACIÓN DE ADN

Con el fin de determinar la calidad del ADN para PCR, ha todas las muestras, se les realizo la amplificación del marcador de sexo *amelogenina*, empleado como control de calidad en pruebas de paternidad y cuyo producto en mujeres es de 212 pb, empleando los primers propuestos por *Promega*. Su amplificación, se realizo de acuerdo con la estandarización hecha por el laboratorios de Genética Médica de la Universidad Surcolombiana para pruebas de Paternidad³⁰ en un volumen final de 25 μ l que contenía entre 50 y 100 ng de ADN, 1X de Buffer Taq ADN polimerasa, 0.25 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 pM de cada primer y 0.5 U de Taq ADN polimerasa y el programa de termociclador: 96°C 2 min, 9 ciclos (94°C 1 min; 62°C 1 min; 70°C 1.30 min), 19 ciclos (90°C 1 min; 62°C 1 min; 70°C 1.30 min), 60°C 30 min. Se probó la reacción de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y con un marcador de peso molecular pRB322 Hae III. Se considero como un ADN adecuado cuando se observo una banda de 212 pb. (Figura 7)

Figura 7: Ubicación y amplificación de la amelogenina



Las muestras negativas para amelogenina, fueron consideradas como muestras no aptas para seguir el estudio molecular, ya que no se cuenta con un ADN apropiado para entregar un resultado confiable.

5.5. IDENTIFICACIÓN DE HPV

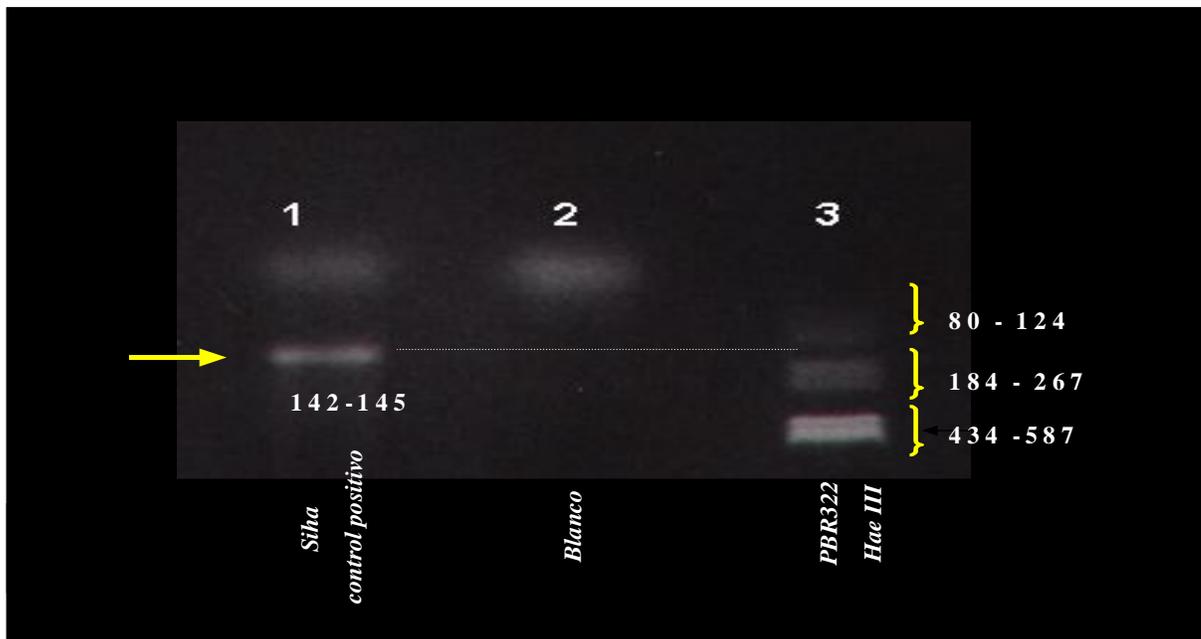
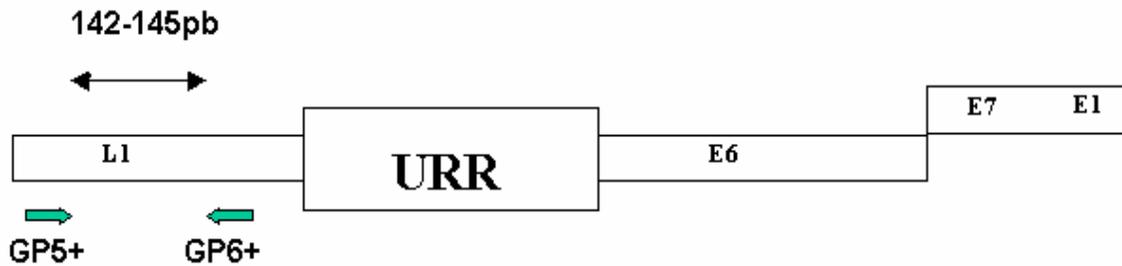
Para la detección del genoma del HPV se amplificó por PCR un fragmento de la región L1 en las muestras de ADN positivas para amelogenina; empleando el juego de primers GP5+ (5-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3) y GP6+ (5-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3), sintetizados por *Integrate ADN Thecnologies, INC. USA* y reactivos de la casa comercial *Sigma y Pharmacia*. La estandarización se realizó tomando como base las publicaciones hechas por Walbommers y colaboradores^{20,21} a partir de 100 ng de ADN; en un volumen final de 50µl: 0.2 mM de dNTP; 1.5 mM de MgCl₂; 2 pmol de cada primers y 0.2 U de Taq polimerasa. Se probó la reacción de amplificación en electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio, empleando como marcador de peso molecular a pRB322 Hae III. (Figura 8). El perfil térmico fue el siguiente: 94°C/5 minutos; 40 ciclos (95°C/ 30s; 45°C/ 60s; 72°C/ 60s); 72°C/10 minutos.

Para llegar a la estandarización se realizaron múltiples ensayos con la técnica descrita por Karlsen²² y Walboomer^{20,21} realizando variaciones en el MgCl₂ principalmente (Tabla 1), ya que esta es la coenzima que activa la Taq y da especificidad al proceso. Además se modificó la concentración de los dNTPs que dependen de la cantidad de MgCl₂ empleado.

TABLA 1: Estandarización de la PCR para HPV,

	Concentraciones iniciales							
MgCl ₂	1mM	1.5mM	2.0mM	2.5mM	3.0mM	3.5mM	4.0mM	5.0mM
DNTp	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM
PRIMER	10pM	10pM	10pM	10pM	10pM	10pM	10pM	10pM
TAQ	0.5U	0.5U	0.5U	0.5U	0.5U	0.5U	0.5U	0.5U

Figura 8. Amplificación de DNA de HPV los primers GP 5 + y GP 6+.



Otra variación realizada fue para la detección del producto amplificado, reemplazando el SRBY-Gren I. Sigma por bromuro de etidio, ya que con el primero no obtuvimos los resultados esperados.

Al realizar los ensayo de PCR se observa que existe variación en la concentración de los reactivos dependiendo la casa comercial y las condiciones ambientales como humedad y temperatura que interfieren en la estandarización. Es por esto,

que se realizaron variaciones en los métodos descritos, para poder adecuar las condiciones de PCR necesarias en nuestro laboratorio.

Se ensayaron dos juegos de primers (GP5/GP6 y GP5+/GP6+), pero se decidió utilizar el juego GP5+/GP6+ ya que su tamaño es mayor, aumentando la especificidad de la amplificación. Existen otros primers consenso como el GP11/GP12 y MY09/MY11, pero estos presentan mas mismatch entre tipos de HPV; lo que disminuye su especificidad. (Tabla 2).

Tabla 2: Alineamiento de los primers GP5+y GP6+ con el número de mismatches en 9 tipos de HPV.

Mismatches	GP5	GP6
HPV1a	5	7
HPV5	6	8
HPV6b	0	1
HPV8	3	10
HPV11	0	0
HPV16	2	0
HPV18	0	1
HPV31	0	2
HPV33	0	2

Para confirmar un resultado negativo para HPV por amplificación de L1, es necesario obtener más de una muestras del mismo paciente con este resultado.

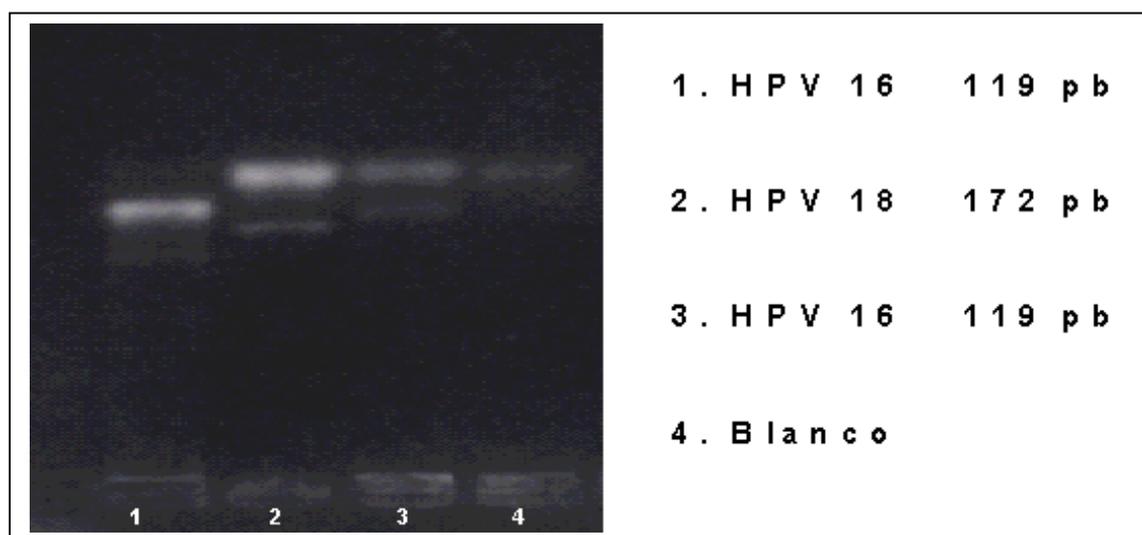
DIFERENCIACIÓN DE LOS TIPOS DE HPV 16 Y 18

A las muestras positivas para GP donde se les confirmo la presencia de HPV, se les realizó la determinación del tipo específico de este virus por PCR, empleando primers para HPV 16 (5-TCAAAGCCACTGTGTCCTGA-3 / 5-CGTGTTCTTGATGATCTGCAA-3) y 18 (5-CCGAGCACGACAGGAACGACT-3 / 5-TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT-3), que determinan fragmentos de 119 y

172 pb respectivamente. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por *Integrate ADN Technologies, INC. USA* y las condiciones de amplificación empleadas de acuerdo con lo descrito por Karlsen y cols²².

La amplificación se hizo mezclando los dos juegos de primers a partir de 100 ng de ADN; en un volumen final de 50µl: 0.2 mM de dNTP; 1.5 mM de MgCl₂; 20 pmol de cada primers y 0.2 U de Taq polimerasa. Se utilizaron como controles positivos las líneas celulares Siha (HPV –16) y Hela (HPV –18) y se incorporaron controles negativos para el DNA de HPV por cada 5 muestras analizadas. El perfil termico empleado fue el siguiente: : 94°C; 35 (95°C por 30 seg, 57°C por 30 seg y 72°C por 1 min) y 72°C durante 10 min. Se probó la reacción de amplificación en electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio, empleando como marcador de peso molecular a pRB322 Hae III. (Figura 10).

Figura 10: Amplificación de los tipos HPV 16 y HPV18 a partir de muestras de colposcopia.



Las muestras de HPV positivas para GP que no amplificaron para HPV16 ni HPV 18 se consideran positivas para Papilomavirus diferentes a HPV 16 y 18.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. CARACTERIZACION DE LOS PACIENTES

Se identificaron 58 pacientes procedentes de diferentes zonas del departamento (Tabla 3) identificadas del 1 al 58.

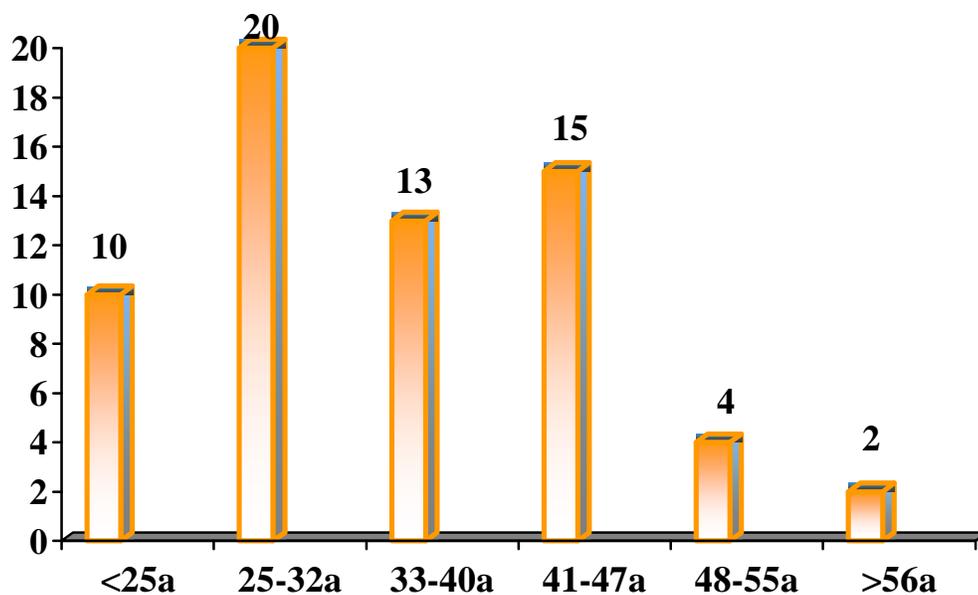
Tabla 3: Distribución de pacientes estudiados según su lugar de procedencia

Procedencia	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
aipe	5	9,6%	9,6%
algeciras	2	3,8%	13,5%
altamira	2	3,8%	17,3%
campoalegre	1	1,9%	19,2%
cauca	1	1,9%	21,2%
colombia	1	1,9%	23,1%
fortalecillas	1	1,9%	25,0%
gigante	2	3,8%	28,8%
la plata	2	3,8%	32,7%
nataga	6	11,5%	44,2%
natagaima	1	1,9%	46,2%
neiva	22	42,3%	88,5%
palermo	1	1,9%	90,4%
pitalito	1	1,9%	92,3%
rivera	1	1,9%	94,2%
suaza	1	1,9%	96,2%
tesalia	1	1,9%	98,1%
villavieja	1	1,9%	100,0%
Total	52	100,0%	100,0%

El promedio de edad fue de 33 años con un rango entre 17 y 64 años, el 3.7% era menor de edad y el 80.1% menor de 40 años. Solamente un 9.4% de los pacientes era mayor 50 años. Al realizar la estratificación por grupos de edad, la

moda se encontró entre los 25 y 32 años (20 casos), seguida por el grupo de 33 a 40 años. (Figura 11).

Figura 11: Distribución por rangos de edades de los 43 pacientes estudiados.



Todos los pacientes fueron incluidos por cumplir los criterios de selección, incluyendo adicionalmente 20 muestras de mujeres con citología normal como control negativo.

Al revisar factores de riesgo como: el número de compañeros sexuales, se encontró que lo más frecuente es una sola pareja o dos, con un rango entre 1 y 10, iniciando su vida sexualmente activa en promedio a los 18.5 años (15-28 años). El número de gestaciones oscilo entre 0 y 11 con una moda de 2.6, mientras que el tabaquismo se presento solo en una paciente, (Tabla 4).

Tabla 4: Factores de Riesgo en la muestra de estudio

EDAD INICIO DE R. SEXUALES		No DE COMPAÑEROS SEXUALES		No DE GESTACIONES	
14-16 años	18	1	22	0	6
17-19 años	16	2	18	Entre 1 y 2	22
20-22 años	08	3	04	Entre 3 y 4	13
23-25 años	06	4	03	Entre 5 y 6	08
> de 26 años	02	5	02	Más de 7	02
		10	01		

19 (34.5%) mujeres fueron incluidas por presentar citologías con diagnóstico de ASCUS, 26 (47.4%) con LGSIL, 6 (10.9%) con HGSIL, una con NIC I y una con NIC II, para un total de 55 pacientes. De tres no se encontró informe en la historia clínica. Con respecto al resultado de las biopsias tomadas en la colposcopia el informe más frecuente fueron las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (60%), seguido por NIC I (15%) y NIC III (15%) (Tabla 5)

Tabla 5: Resultado de biopsia de cérvix en las pacientes estudiadas

Biopsia	Frecuencia	Porcentaje
negativa	2	10,0%
LEIBG	12	60,0%
NIC I	3	15,0%
NIC II	1	5,0%
NIC III	1	5,0%
Ca invasor	1	5,0%
Total	20	100,0%

6.2. PRUEBAS DE LABORATORIO

Extracción de ADN

Como se mencionó anteriormente, para la extracción de ADN se emplearon tres métodos, obteniendo una eficiencia de 83.3% (5/6) con fenol Cloroformo - OH

isoamílico, 48.7% (19/39) con la técnica de Walboomers y 93.7% (15/16) con la de Gómez y cols. Sin embargo con ninguno de los métodos se *obtuvo* un ADN de buena calidad, por lo cual en todos los casos fue necesario limpiar los ácidos nucleicos con etanol, mejorando su calidad pero disminuyendo la cantidad.

Evaluación de ADN

A las muestras procesadas con las técnicas de Walboomers y Gómez que fueron los métodos empleados, se les realizó la amplificación del loci AMELOGENINA obteniendo producto en 26/50 (58.6%).

identificación de HPV

De las muestras positivas para AMELOGENINA, 21 fueron positivas para HPV.

Diferenciación de los Tipos HPV 16 y HPV 18

De las muestras positivas para HPV (36.2%), 16 han sido positivas para HPV 16, 2 para HPV 18. En una mujer se encontraron los dos tipos, mientras que 4 fueron negativas para los dos.

7. DISCUSIÓN

La toma de muestras en la LLCCN permite el desarrollo de trabajos representativos para el departamento en enfermedades como cáncer de cervix, ya que esta es la institución de referencia para este tipo de patologías en el departamento y por ser una institución sin ánimo de lucro, todas las personas tienen fácil acceso a sus servicios. Es por eso, que en nuestra muestra a pesar de no ser aún representativa, se encuentran pacientes procedentes de 18 de los 38 municipios que constituyen al Huila.

Veintidós de los 52 pacientes fueron procedentes de Neiva (42.3%), sin embargo esto no es indicativo de una mayor frecuencia de HPV en la ciudad con respecto al resto del departamentos, sino a la facilidad que tienen las personas para acceder al servicio y a que en algunos municipios como Pitalito y Garzón se cuenta con entidades de segundo nivel que no hacen necesaria la remisión a la ciudad de los pacientes en la mayoría de los casos.

Todas las pacientes fueron incluidas por presentar una citología normal, permitiéndonos acceder con mayor probabilidad a muestras infectadas por HPV, si consideramos a este como el principal factor predisponente de cáncer de cérvix y cumpliendo con los criterios de inclusión planteados en la metodología del estudio.

Aunque el promedio de edad para el inicio de las relaciones sexuales fue alto (18.5 años), este dato no permite llevar a cabo una aseveración correcta del comportamiento social, pues la moda fue 15 años (9/50), siendo el 44% menor de edad, por tanto es importante mencionar que el mejoramiento del comportamiento y pronóstico de esta enfermedad no debe ser una preocupación exclusiva del área médica, sino que es necesario el trabajos interdisciplinarios donde se involucren

trabajadores sociales, docentes, sicólogos y enfermeros entre otros, e instituciones como el ministerio de educación y Bienestar familiar.

Al observar el número de compañeros sexuales en la muestra de estudio, se observa un comportamiento opuesto al esperado ya que de acuerdo a lo publicado por literatura³, la relación es directamente proporcional al riesgo de infectarse con el virus. No obstante, aclaramos que este resultado no esta sugiriendo la promiscuidad como factor protector, sino esta reflejando el patrón cultural manejado en nuestra sociedad donde es aceptada la promiscuidad del sexo masculino tal como lo sugiere *de San Jose y Cols*³¹ para la población Española y Colombiana

Contrario a lo publicado para las población de Dinamarca³², Tailandia³³ y Costa Rica³⁴ en nuestra muestra, al igual que en la población Noruega³⁵, el número de gestaciones no esta correlacionado con la susceptibilidad a cáncer de cérvix, por tanto la alta incidencia en nuestra población podría deberse mas ha factores genotípicos que a efectos de heredabilidad.

Aunque la frecuencia de tabaquismo en la muestra estudiada fue baja (1/58), consideramos, es importante aumentar el número de mujeres estudiadas para llevar a cabo una discusión correcta de este posible factor predisponente.

Solamente 3 de las 58 mujeres incluidas en el estudio, mayores de 39 años asistieron en estadios avanzados de la enfermedad, lo que puede estar indicando un buen resultados a los esfuerzos hechos por el sistema de salud con las campañas de promoción y prevención, por consiguiente; estos programas están cumpliendo su objetivo al mejorar la calidad y pronostico de vida de las mujeres Huilenses.

A pesar que con el método de fenol-cloroformo-álcool isoamílico se obtuvieron buenos resultados, se decidió realizar experimentos con otros procedimientos, porque los reactivos empleados en este, exponen a altos riesgos tóxicos al laboratorista, alcanzando una eficiencia mayor con la técnica publicada por Gómez y cols²⁹, la cual puede ser mejorada lavando el material genético con técnicas comerciales como la cromatografía de intercambio iónico, lo cual no aumenta de forma significativa el costo de la prueba

Debido a la falta de un espectrofotómetro confiable, la cuantificación y cualificación del ADN debía hacerse con el método de agarosa, lo que implica el uso del 20% (entre 10 y 20ul) del material obtenido, cantidad significativa si se tiene en cuenta que todo resultado negativo debe ser confirmado por repetición empleando en cada ocasión 10 ul, por tanto se decidió realizar la amplificación del locus *humamelogenina*, un marcador del cromosoma X ubicado en la posición q22-28, dentro de la región no codificante del gen de la Amelogenina, pues además de demostrar la presencia de ADN, determina el efecto de posibles inhibidores de la PCR presentes en la muestra como la hemoglobina.

Este método permitió confirmar la calidad del ADN en 34/58 muestra procedas con los métodos de Walboomers y Gómez, por tanto a pesar de mostrar baja eficiencia, es importante mencionar que no se realizo en las muestras procesadas con fenol-cloroformo donde la calidad se evaluó con geles de agarosa, así el bajo número de muestras positivas no se puede atribuir a que es un mal marcador, sino a la calidad de la extracción

Similar a lo publicado¹, el tipo identificado con mayor frecuencia en esta muestra fue el HPV 16, hallado en el 76.2% de las muestras positivas para HPV, mientras que HPV 18 solo se presento en dos muestras (9.5). Es importante mencionar que

en cuatro pacientes no fue posible llevar a cabo la tipificación, lo que podría indicar la presencia de más tipos circulante de alto riesgo en nuestra población.

Al correlacionar las variables no se hallaron diferencias significativas entre la presencia de HPV y el estadio de la enfermedad, lo que puede indicar que la sensibilidad de nuestra técnica, después de ser ajustada será buena para ayudar a un diagnóstico temprano, objetivo final del proyecto.

CONCLUSIONES

1. El comportamiento de los diferentes factores de riesgo en las mujeres de estudio, podría sugerir que en nuestra población, la heredabilidad asociada a los comportamientos sociales, es un factor predisponente de la enfermedad de menor importancia al que puede ser atribuido a la predisposición genética.
2. Adicionando a la extracción propuesta por Gómez y cols, el lavado por cromatografía, consideramos que es el método recomendado para continuar el desarrollo de esta línea de investigación.
3. La amelogenina es un buen marcador para evaluar la calidad del ADN.
4. Hasta el momento el HPV 16 es el tipo mas frecuente encontrado en el estudio, sin embargo se demuestra la importancia de continuar la línea de investigación mejorando la calidad de las técnicas y ampliando el número de tipos tipificables.

RECOMENDACIONES

Continuar el desarrollo de la línea de investigación en HPV y cáncer de cérvix de forma organizada pero continua, involucrando estudiantes tanto de pregrado como de postgrado.

BIBLIOGRAFIA

1. Muñoz N, Bosch F, y colaboradores. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003; 384:518-27.
2. Zambrano A, Camacho H. Estrategias para la prevención del Cáncer en Colombia. *Acta Médica Colombiana* Vol. 27 No 4- Julio-Agosto 2002.
3. Bosch F, Lorincz A, Muñoz N y colaboradores. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin Pathol* 2002; 55: 244-265.
4. Clifffors GM, Smith JS y colaboradores. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer* 2003, 88: 63-73.
5. Estadísticas Servicio de Epidemiología Secretaría de Salud Departamental del Huila.
6. Koss L.G. Comentario Editorial: human papillomavirus-pasager, driver or both? *Human Pathology*. 1998 vol 29: 309.
7. Indicadores básicos de Salud Colombiana 2001. 2 ed. Ministerio de salud Publica. Organización Panamericana de la Salud.
8. Herrera H, Restrepo P y colaboradores. El virus de paliloma humano y su relación con la neoplasia cervical humana. Universidad Javeriana de Colombia.
9. Walboomers J, Jacobs M y colaboradores. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer mord-wide. *Journal Pathology* 1999 col.198:12-19.
10. Hines J. Jenson B. *Pathology of Infectious Disease*. 1997 vol 1: 199-206.
11. Adam E, Berkova J y colaboradores. Papilloma detection: Demographic and benavioral characterics influencing the identificatio of cervical disease. *American Journal on Obstetric and Gynecology*. 200 vol 182: 257-264.
12. Ahdieh L, Muñoz N y cols. Cervical Neoplasia and Repeated Positivity of Human Papillomavirus Infection Human Inmunodeficiency Virus seropositive and seronegative woman. *Am. J of Epidemiology*. 2000 vol 151: 1148

13. Brinton LA, Reeves WC y cols. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiology*. 1989; 130:486-496.
14. Zur H, Are Human papillomavirus infections necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of cervix? *Int J Cancer* 1995. vol 63: 317
15. Tópicos de infectología. Los papilomavirus como agente oncogénicos. *Pag: 221-231*.
16. Muñoz N, Bosch F. Relación Causal entre el virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino y consecuencias para la prevención. *Bol Oficina Sanit Panam* 121(6), 1996.
17. CONNOR D, Chandelr W. y cols. *Pathology of Infections Disease*. 1997 1ra edición: 201.
18. Kurman R, Solomond D. *The Bethesda System-For Reporting Cervical/vaginal cytologic diagnosis*. Springer. New York. 18 J 1994 .
19. Fusté B, Carreras R. Los papilomavirus como agentes inductores de cáncer de cervix. *Evidencias biológicas*. Servicio de Ginecología y obstetricia. Universidad de Barcelona.
20. Peter J, Walboomers J, The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *Journal of General Virology* 1990, 71: 173-181.
21. Husman A, Walboomers J y cols. The use of general primers Gp5 y Gp6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*. 1995, 76:1057-1062.
22. Karlsen F, Kalantaru M y cols. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *Journal of clinical microbiology*, September 1996. *Pag:2095-2100*.
23. Instituto Nacional de Cancerología, *Guia de Prácticas Clínicas en Enfermedades Neoplásicas*. Bogotá. 2001, 2da edición: 413-437.
24. Sun X, Kunh L y cols. Human Papillomavirus Infection in Women infected with the Human immunodeficiency Virus. *Nejm*, Vol 337, Number 19: 1343-1349.
25. Peter J, Van der Brule y cols. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of broad spectrum of

- human papillomavirus genotypes. *Journal General Virol.* Vol 71: 173-182. 1.990
26. Resnick R, Cornelissen M y cols. Detection and Typing of Human Papillomavirus in Archival Cervical Cancer Specimens by DNA Amplification With Consensus Primers. *Journal of the National Cancer Institute.* Vol 82, No 18, September 19, 1.990.
27. Bosch F, Rohan T y cols. Papillomavirus research update highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *Journal of clinical pathol* 2001; 54:163-175.
28. Madeleine M, Shera K y cols. The P53-Arg72-Pro polymorphism, human papillomavirus and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* Vol 9 225-227; Febrero 2000.
29. Gómez M, Abba M y Golijow C. Detección y genotipificación del papillomavirus humano (HPV) por PCR-LIS-SSCP. CIGEBA, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
30. Montenegro Y, Ostos H. Manual de Procedimientos para Pruebas de Paternidad. Laboratorio de Medicina Genómica. Universidad Surcolombiana. 2000.
31. Castellsagué X, Ghaffari A, Daniel RW, et al. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Infect Dis* 1997;176:353–61.
32. Kjaer SK, de Villiers EM, Haugaard BJ, et al. Human papillomavirus, herpes simplex virus and cervical cancer incidence in Greenland and Denmark. A population-based cross-sectional study. *Int J Cancer* 1988;41:518–24.
33. Thomas DB, Ray RM, Koetsawang A, et al. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Am J Epidemiol* 2001;153:723–31.
34. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer* 2001;84:1219–26.

35. Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, et al. Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol* 2000;29:817–25.

Anexo 1: Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

IDENTIFICACION DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO EN MUJERES QUE ASISTEN AL SERVICIO DE COLPOSCOPIA DE LA LIGA DE LUCHA CONTRA EL CANCER EN LA CIUDAD DE NEIVA

INVESTIGADORES: *Adriana Estévez Durán (Est. Medicina XI), Beatriz Elena Caldón Villar (Est. Medicina X), Yenny M. Montenegro (Bacterióloga Msc Genética), Henry Ostos Alfonso (M.D. Genetista), Wolfgang Barrera, Marta Liliana Pérez (M.D. Ginecólogos), Luis Guillermo Cano (M.D. Ginecólogo Oncólogo).*

OBJETIVO: El objetivo de este proyecto de investigación es identificar el Papilomavirus humano en las mujeres que asisten a la consulta de colposcopia en la LLCC en Neiva.

Yo: _____ con
cédula de ciudadanía No: _____ de _____,
autorizo a los participantes de este proyecto de investigación para que accedan a la información necesaria de mi historia clínica y estoy dispuesto(a) a donar una muestra de cepillado endo y exocervical, para que sean objeto de estudio.

Certifico que he recibido la información suficiente de parte de los integrantes del proyecto acerca del destino del material otorgado por mi para la investigación, y soy conciente que nadie dispondrá de ellos con fines diferentes a los planteados en el proyecto de investigación sobre cáncer propuesto por el Laboratorio de Medicina Genómica de La Universidad Surcolombiana. He sido informado que no existe riesgo de enfermedad o complicación agregada a mi condición, por el hecho de colaborar con el desarrollo del mismo y que las pruebas realizadas no tendrán costo alguno.

Por el derecho a participar en esta investigación no recibiré remuneración económica alguna; pero tendré derecho a beneficiarme de los resultados finales, los cuales, pueden ser de utilidad en el futuro para mejorar las condiciones de nuestro departamento.

Firma del Paciente: _____
Documento: _____ **de:** _____

Firma Testigo: _____
Documento: _____ **de:** _____

Anexo 2: Instrumento

IDENTIFICACION DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO EN MUJERES QUE ASISTEN AL SERVICIO DE COLPOSCOPIA DE LA LIGA DE LUCHA CONTRA EL CANCER EN LA CIUDAD DE NEIVA

Historia:Nº:_____

Fecha:_____

Datos personales

Nombre_____

Edad:_____

Procedencia_____

Antecedentes

Edad de inicio de relaciones sexuales: _____

Numero de parejas sexuales: _____

Numero de Gestaciones: _____

Tabaquismo: Si_____ No_____

Reporte de citología:: ASCUS:_____

LG-SIL:_____

HG-SIL:_____

Biopsia: _____

Procedimientos en el laboratorio

EXTRACCIÓN DE DNA:	PCR CON PRIMERS GP5+/GP6+	PCR CON PRIMERS HPV 16 Y HPV18	
amplificación de ameloginina	Amplificación	Amplificación	
		HPV 16	HPV 18
Si	Si	Si	Si
No	No	No	No

Anexo 3: Extracción ADN Con Cloroformo Alcohol Isoamílico

1. Poner en un eppendorf de 2ml la muestra + 450µl de buffer de digestión
2. Adicionar 25µl de SDS al 20% y 25µl de pK
3. Incubar a 37°C. por 6 horas a 12 horas
4. Adicionar medio volumen de NaCl 5M y un volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1)
5. Agitar por 10 minutos
6. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos
7. Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo + 0.6 vol de isopropanol.
8. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos y luego botar sobrenadante
9. Adicionar 2 vol de etanol 100% frio y centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos y luego botar el sobrenadante
10. Lavar con etanol al 70% y dejar 15 minutos a -20°C y centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos, lavar con etanol 100% y centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos y botar el sobrenadante
11. Dejar secar al aire y reconstituir en 150µl de agua MQ.

Anexo 4: Extracción ADN Con Fenol-Cloroformo Alcohol Isoamílico

1. Adicionar 1ml de buffer de extracción X4
2. Incubar a 55°C. Durante 24 horas. (toda la noche)
3. Adicionar 10µl de pK 20mg/ml e incubar nuevamente a 55°C por 24 horas.
4. Adicionar 10µl de pK 20mg/ml e incubar nuevamente a 55°C por 24 horas.
5. Sacar el producto de las 72 horas y adicionar 500µl de cloroformo OH isoamílico y fenol (25:24:1).
6. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente
7. Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos
8. Tomar la capa superior + 250 de acetato de amonio 7.5M + 1ml de etanol al 100%.
9. Centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos
10. Descartar sobrenadante
11. Adicionar 40µl de agua MQ y dejar disolver toda la noche a temperatura ambiente.
Denaturar 5 minutos a 70°C (30 minutos a 37°C).

Anexo 5: Extracción ADN con la técnica de Walbomers

1. Recoger la muestra de endocervix y exocervix en 5ml de PBS + timerosal 0.05% (concentración final)
2. Vortex fuerte por un minuto
3. Sacar el cepillo al lado del mechero
4. Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm
5. Descartar sobrenadante
6. Añadir al botón celular 1ml de Tris-HCl 10mM pH 8.3
7. Vortex
8. Sacar dos alícuotas

Refrigerar a -80°C hasta PCR.

Anexo 6: Extracción ADN con la técnica de Gomez y cols

1. Recolectar la muestra de endocervix y exocervix en 5ml de PBS con timerosal 0.05% en tubos estériles, y conservado a 4 °C hasta su procesamiento (dentro de las 24 h).
2. Vortex fuerte por un minuto
3. Sacar el cepillo al lado del mechero
4. centrifugar a 14.000 rpm durante 5 min,
5. resuspenda y lave con 1 ml de PBS.
6. Incube el sedimento celular durante 24 h a 56 °C en 400 µl de buffer de extracción (50 mM Tris-ClH pH 8,5; 1 mM EDTA; 1% Triton X100 y 0,5% Tween 20) y 250 µg/ml de proteinasa K
7. Inactive la proteinasa K por hervor durante 10 min.
8. Se utilizan 10 µl del lisado para las reacciones de amplificación

