



UNIVERSIDAD NACIONAL ANDRÉS BELLO

FACULTAD DE MEDICINA

TECNOLOGÍA MÉDICA

## **PROYECTO DE UNIDAD DE INVESTIGACIÓN**

**“EVALUACION DE MARCADOR PARA VIRUS PAPILOMA  
HUMANO EN MUJERES CON INFORMES DE PAPANICOLAU DE  
CELULAS ESCAMOSAS ATÍPICAS SUGERENTES DE LIE ALTO  
GRADO O CA. INVASOR (H2)”**

Autor : Alejandro Ponce Escobar.

Profesores Guía : Orlando Quezada Poblete.

Profesor Co-Guía : Fanny López Alegría

Sede República

Julio – 2014

# Indice

## **1. Capítulo 1: Resumen.**

## **2. Capítulo 2: Introducción.**

## **3. Capítulo 3: Marco teórico.**

3.1. Definición HPV.

3.2. Estructura.

3.3. Patogénesis.

3.4. Métodos de detección.

3.4.1. Criterios de Malignidad.

3.5. Identificación y detección del virus papiloma humano.

3.6 PCR acoplado a Reverse Line Blot (PCR-RLB)

## **4. Capítulo 4: Objetivos unidad de investigación**

4.1. Objetivo general.

4.2. Objetivos específicos.

## **5. Capítulo 5: Metodología**

5.1. Método de estudio.

5.2. Muestra

5.3. Variables

5.4. Criterios de selección

5.5 Protocolos de trabajo

5.5.1. Pacientes

5.5.2. Protocolo de tinción de PAP

5.5.3 Tipificación de HPV

5.6. Metodología

## **6. Capítulo 6: Resultados**

## **7. Capítulo 7: Discusión**

## **8. Capítulo 8: Conclusión**

## **9. Bibliografía**

## **10. Anexos**

## CAPITULO 1: RESUMEN

El presente trabajo corresponde al proyecto FONIS SA 12/2035 el cual consiste en la determinación de la presencia del virus papiloma humano (HPV) en 78 pacientes femeninas del sector sur de Santiago, que presentaron un PAP Atípico escamoso que no excluye lesión intraepitelial de alto grado (ASC-H). La identificación de la presencia o ausencia del HPV se realizará por medio de técnicas moleculares (PCR). A su vez a las pacientes se les realizará un PAP de rutina para determinar, por vía citológica, si existen o no hallazgos de HPV y/o patologías cervicouterinas.

## CAPITULO 2: INTRODUCCIÓN

El Virus Papiloma Humano (HPV) es uno de los precursores cancerígenos de mayor relevancia a nivel genitourinario, siendo esta infección un grave problema de salud pública. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), registra anualmente la aparición de 553.119 casos nuevos de Cáncer Cervicouterino <sup>(1)</sup>. El HPV está principalmente presente en países desarrollados y en Chile presenta una tasa de mortalidad de 5,82% hasta el año 2010<sup>(2)</sup>.

El HPV pertenece a la familia de los *Papillomaviridae*. Hasta la fecha se han descubierto alrededor de cien tipos de cepas del virus HPV, diferenciándose en las que tienen alto riesgo carcinogénico y las que tienen bajo riesgo carcinogénico. Este virus se transmite principalmente por vía sexual y afecta tanto a hombres como a mujeres, generando en ellas Cáncer de tipo Cervicouterino. A pesar de que los hombres son más bien asintomáticos, son estos quienes, en su mayoría transmiten el virus<sup>(3)</sup> debido a que tienden a tener más parejas sexuales en comparación a el sexo femenino.

La implementación del Programa Nacional del Cáncer Cervicouterino en el año 1987 ha permitido disminuir significativamente la tasa de mortalidad en la última década (desde el año 2000 hasta el año hasta el 2010) (ver Anexo 1). Esto

gracias al desarrollo del método de prevención, pesquisa, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las pacientes que desarrollan un cáncer de cuello de útero o bien de sus lesiones pre-invasoras.

Basándose en este programa, es que el método de pesquisa con la técnica del Papanicolau convencional (PAP) se vuelve una herramienta indispensable para la detección temprana de la acción del virus en las células de las pacientes. Siendo una técnica de poco presupuesto, de rápida ejecución, y entregando una cantidad de información importante, es por esto que el PAP se ha vuelto el exámen “Goldstandar” para la detección del Cáncer Cervicouterino en Chile.

Por otro lado, tenemos técnicas que nos permiten la identificación de las cepas del virus HPV. Estas técnicas son más específicas dado su naturaleza molecular. Es así como la Captura Híbrida, por ejemplo, nos permite determinar la presencia o ausencia del Virus Papiloma Humano mediante la detección del DNA viral. Esta técnica es considerada el “Goldstandar” para la detección de HPV en países desarrollados como Estados Unidos.

La FDA (Food and Drug Administration) ha recomendado el uso de la captúra híbrida como una prueba complementaria al PAP de rutina cuando los resultados de este último son no concluyentes (ASC-US o ASC-H).

Existen también otras metodologías para la y tipificación de HPV, entre las cuales se encuentran *Reverse Line Blot* (RLB) Enzimainmunoensayo (EIA), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), *Dot Blot* o PCR *real time*. El PCR-RLB es la metodología más económica y eficiente, ya que permite en un ensayo, detectar y tipificar más de 30 genotipos de HPV en aproximadamente 40 muestras de forma simultánea, además de poseer una alta sensibilidad y especificidad.

## CAPITULO 3: MARCO TEÓRICO

### 3.1 Definición HPV

El Virus Papiloma Humano (HPV) pertenece a la familia de los *Papillomaviridae*. Los Virus Papiloma Humano de mayor importancia son aquellos que están relacionados a cáncer en humanos y corresponden a una clasificación Alfa (Alpha). En una primera etapa, los virus alfa infectan las superficies mucosas genitales y no genitales y la superficie genital externa. Este grupo de virus papiloma es conocido como “Del tipo mucogenital”. Los tipos que están asociados al cáncer cervicouterino, denominados “De alto riesgo” se encuentran en las especies 5, 6, 7, 9 y 11<sup>(4)</sup>. El HPV-16 (el tipo más frecuente en cáncer cervicouterino) es parte de las especies 9, mientras que el segundo tipo más asociado al cáncer cervicouterino es el HPV-18, el cual pertenece a la especie 7.

### 3.2 Estructura

Los papilomavirus son pequeños. Son un virus sin cubierta, pequeños, icosaédricos y replican en el núcleo de las células escamosas. Tiene un tamaño de 52-55 nanómetros. Las partículas del virión están compuestas por una molécula de DNA bicatenario (dnDNA) circular de 8000 pares de base (pb) aproximadamente. Este DNA está contenido dentro de una cápside icosaédrica esférica, la cual está compuesta de 72 capsómeros (fig.1) y que están albergados en una superficie enrejada T=7 (número de triangulación) <sup>(5)</sup>. Las partículas del virus tienen un tamaño molecular aproximado de 70 kd.

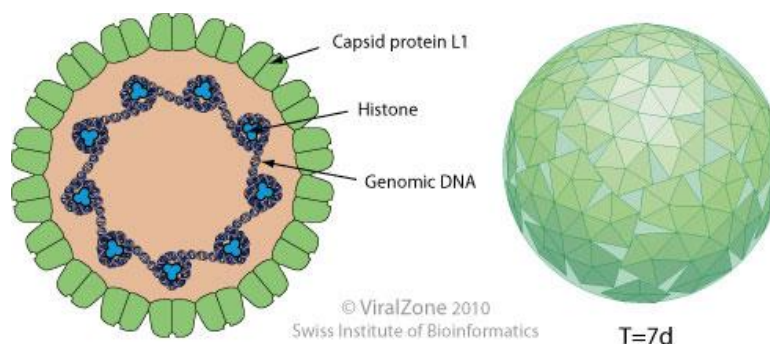


Figura 1: Cápside del Virus Papiloma Humano.

La cápside de los papilomavirus está compuesta por dos estructuras proteicas. La principal proteína de la cápside (L1) tiene un peso molecular aproximado de 55 kd y representa aproximadamente el 80% del total de la proteína viral. L2 es la otra proteína que compone la cápside y tiene un peso molecular de 70 kd aproximadamente.

Estudios demuestran que la partícula viral, en conjunto a histonas celulares se juntan para formar un complejo cromatínico<sup>(6)</sup>. El contenido de guanina-citocina que tiene la mayoría de los genomas de los papilomavirus es de aproximadamente 42%. El DNA constituye aproximadamente el 12% del peso del virion<sup>(7)</sup>.

### 3.3 Patogénesis

El ciclo vital del HPV inicia con la infección de la capa basal de las células epiteliales. Es aquí donde el virus expresa dos tipos de proteínas: E1 y E2. Estas proteínas se asocian a la replicación y transcripción de DNA viral. Por otro lado, tenemos las proteínas E5, E6 y E7 las cuales inducen la proliferación de células basales y parabasales, lo que provoca una hiperplasia epitelial<sup>(10)</sup>.

Las proteínas E6 y E7 participan en el proceso de oncogénesis, las proteínas E6 de los tipos virales HPV-16 y HPV-18, son capaces de interactuar con las proteínas celulares encargadas de mantener el correcto funcionamiento del ciclo celular. El DNA del virus HPV produce una interrupción en la región de lectura abierta (ORF) E1-E2, lo que impediría un adecuado efecto inhibitorio de E2 en la región de control TATA box, vecina al promotor P97 y produciendo de esta forma la unión de factores de transcripción (SP1 y Complejo de Transcripción TFIID)<sup>(8)</sup>, activando la expresión de las proteínas E6 y E7. La proteína E6 se une a la proteína P53 y forma un complejo con proteínas celulares (Proteína ligante de E6, proteína ligante de Calcio y proteína Kinasa) sobre el cual actúa un complejo enzimático (Ubiquitina), degradando a P53. El efecto final es un aumento en la transcripción del DNA dañado (producto de la inhibición de gen P21 o WAF1), activando etapa G1 y bloqueo de la apoptosis de células mutadas (debido a la inhibición del gen Bax), sumado a la propagación de mutaciones descontroladas a las células hijas, las que pueden llevar a una neoplasia.

El gen de la proteína E7 del HPV-16 coopera con el oncogen ras, coopera con la proteína E6 en la inmortalización de los queratinocitos humanos primarios<sup>(11)</sup>. La proteína E7 se une específicamente a la proteína del retinoblastoma (PRB). Esta proteína corresponde a un supresor tumoral<sup>(12)</sup> para liberar el factor de transcripción E2F, el cual se encuentra unido basalmente en fase G1. Producto de esta unión, se activan genes de proliferación c-myc, Timidina Kinasa y polimerasa Alfa. Se cree que ésta interacción entre proteína E7 y PRB sea un paso de la carcinogénesis<sup>(12)</sup> ya que ésta inhibe la unión entre el PRB y el DNA, al igual que su unión a proteínas celulares, y proteínas virales transformantes lo que bloquea la acción supresora de PRB.

### 3.4 Métodos de detección

El método más usado para la detección en etapas tempranas del virus papiloma humano es la técnica de Papanicolau (PAP). Esta técnica consiste en realizar una citología exfoliativa por medio de la obtención de células del cuello del útero, donde se encuentra la unión escamo-columnar, a través de un elemento que recolecta las células. Este elemento puede ser una tórula (espátula) de madera o bien un citobrush (cepillo de cerdas suaves). Una vez obtenida la muestra, se procede a depositarla en portaobjetos y se realiza un extendido a través de éste. Se procede a fijar las muestras obtenidas con citospray (un fijador de base alcohólica) para que luego cada muestra sea teñida con el protocolo de tinción de Papanicolau. Este protocolo consiste en la tinción de todas las células del extendido por medio de 3 colorantes: Hematoxilina de Harris, EA50 y Orange G.

En un extendido ideal, se espera encontrar células epiteliales superficiales, intermedias, metaplásicas y endocervicales (estas dos últimas son indicativo de que la muestra obtenida, abarcó la zona de transformación correctamente), además de una cantidad significativa de células por campo (se considera un PAP "Insatisfactorio" cuando encontramos menos de 5 células por campo).

### 3.4.1 Criterios de malignidad

Para poder predeterminar la presencia de una lesión existen distintos criterios celulares que necesitan ser pesquisados por el especialista para que de esta forma se pueda sugerir un tipo de lesión. Podemos dividir las lesiones en dos grupos: Lesiones de bajo grado y lesiones de alto grado. Las lesiones de bajo grado son aquellas que comienzan a afectar el primer tercio basal de células del epitelio del cuello del útero y según la nomenclatura internacional Bethesda <sup>(9)</sup> son clasificadas como Lesiones Intraepiteliales escamosas de bajo grado (“*Low grade squamous intraepithelial lesión [LSIL]*”) abarcando cambios por HPV y neoplasia intraepitelial uno (NIE I). A su vez encontramos las lesiones que afectan dos tercios del epitelio o bien la totalidad de este. Estas lesiones son clasificadas como Lesiones Intraepiteliales escamosas de alto grado (“*High grade squamous intraepithelial lesión [HSIL]*”) que abarcan las displasias moderadas y severas, Carcinoma in-situ, neoplasia intraepitelial dos y tres (NIE II, NIE III).

La citología nos permite determinar y clasificar este tipo de lesiones, analizando parámetros determinados. De estos parámetros, se destacan dos principalmente: Se muestran cambios a nivel de núcleo y citoplasma. A medida que las lesiones avanzan en severidad, los cambios (tanto nucleares como citoplasmáticos) empiezan a ser más notorios, adoptando aspectos más basales y perdiendo toda relación entre núcleo y citoplasma.

Dentro de los cambios más importantes, se puede encontrar:

- Hiperchromasia Nuclear.
- Polimorfismo Nuclear.
- Anisocariosis.
- Anisocitosis.
- Distribución anormal de la cromatina nuclear.
- Irregularidades de la membrana nuclear.



A su vez, existen cambios de tipo secundario, que no son tan relevantes como los nombrados anteriormente. Se pueden encontrar:

- Binucleaciones o multinucleaciones.
- Alteraciones de las formas citoplasmáticas.
- Alteraciones en el patrón de descamación celular.
- Aumento del tamaño del nucléolo.

Si la evidencia citológica no es suficiente para determinar y clasificar una lesión, Bethesda clasifica las células como Células Escamosas Atípicas (*“Atypical squamous cells”*[ASC]). Dentro de esta categoría están las Células Escamosas Atípicas de Significado Intedeterminado (*“Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance [ASC-US]”*) que abarcarían cambios celulares que podrían corresponder a lesiones de bajo grado, sin embargo los criterios de malignidad no son suficientes para clasificarlas como tal.

Otra clasificación son las Células Escamosas Atípicas que No Pueden Excluir una Lesión Intraepitelial de Alto Grado (*“Atypical Squamous Cells Cannot Exclude HSIL [ASC-H]”*). Este término es utilizado para aquellos PAP que no permiten confirmar una lesión, sin embargo se sospecha de una lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

### **3.5 Identificación y Detección Virus Papiloma Humano**

La ausencia o presencia del virus HPV se confirma utilizando DNA viral de éste, y es determinada por el método de Captura Híbrida. Este método captura 13 tipos de DNA viral de alto riesgo, los cuales generan displasias intraepiteliales y carcinoma cervicouterino.

En la captura de híbridos se utiliza RNA capaz de detectar distintos tipos de virus papiloma humano. Si la muestra resulta positiva para HPV, se produce un híbrido de RNA-DNA que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y es detectado mediante una reacción tipo ELISA, el cual utiliza un

compuesto quimioluminiscente la cual revela esta reacción. El DNA viral es cuantitativo y nos permite, a través de esta quimioluminiscencia, revelar la cantidad de DNA viral que hay en la muestra.

Esta técnica dispone de dos tipos de sonda, cinco para virus de bajo grado (6, 11, 42, 43, 44) y trece tipos para alto y mediano grado (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68).

La técnica molecular utilizada para la detección y tipificación del DNA viral es la Reacción de Polimerasa en Cadena (*Polymerase Chain Reaction [PCR]*) y sus variantes: PCR anidada, PCR múltiple, estudio de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Estos pueden combinarse con hibridación o digestión enzimática de los productos de amplificación para la tipificación viral.

### **3.6 PCR acoplado a Reverse Line Blot (PCR-RLB)**

La técnica de PCR es la técnica más sensible para la detección de secuencias de DNA del virus HPV en muestras clínicas<sup>(12)</sup>. El principio de esta técnica se basa en la replicación *in vivo* del DNA: el DNA bicatenario se desenrolla, resultando un DNA monocatenario el cual se duplica y se enrolla nuevamente. La técnica de PCR busca repetir este proceso las veces que sea necesario para obtener la secuencia de DNA que se busca. Esto se logra en 3 procesos que forman un “ciclo” del método de amplificación:

- Desnaturalización del DNA por fusión de temperaturas altas para que el DNA bicatenario hebra pase a DNA monocatenario. La desnaturalización es prácticamente instantánea cuando toda la mezcla alcanza una temperatura de 94°C, pero la inercia térmica hace que haya que mantener la temperatura de la desnaturalización durante unos segundos. Sin embargo si se prolonga el tiempo, podría dañar el DNA diana y reducir la actividad de la Taq Polimerasa<sup>(16)</sup>.
- Unión (anilamiento) de dos oligonucleótidos (utilizados como cebadores) al DNA diana. Esta unión es el proceso de hibridación que realiza el ciclo, en

donde obtendremos una molécula de DNA bicatenario a partir de dos moléculas monocatenarias que tienen secuencias complementarias. Para llevar a cabo este proceso, se debe disminuir la temperatura de la reacción con respecto al primer paso (desnaturalización), de modo que los cebadores puedan hibridarse a las moléculas diana pero las cadenas largas de la molécula original no puedan re-asociarse entre sí. La temperatura a la que se realiza la hibridación depende de la secuencia del cebador que se utiliza, pero la temperatura oscila entre los 55°C a los 65°C<sup>(16)</sup>.

- Extensión de la cadena de DNA por adición de desoxi-nucleótidos a partir de los cebadores, utilizando una DNA polimerasa que utiliza como catalizador la presencia de iones de magnesio<sup>(16)</sup>..

Si se desnaturaliza una molécula de DNA, se obtendrán dos cadenas libres, al dejar enfriar la preparación, eventualmente ambas moléculas se unirán por complementariedad de bases hasta que el DNA se re-naturalice por completo. Sin embargo este proceso es lento, por lo que si la re-naturalización se lleva a cabo en presencia de pequeños oligonucleótidos cuya secuencia sea complementaria a alguna porción de la molécula diana, estas pequeñas moléculas se unirán rápidamente a la región complementaria de la molécula diana antes de que ésta llegue a re-naturalizarse. El resultado es que cada una de las cadenas originales se mantienen monocatenarias excepto en la región en la que se ha unido el oligonucleótido. En esa región, una polimerasa de DNA puede sintetizar a partir del extremo 3' libre de la molécula pequeña, usando como molde la secuencia de la molécula grande. Por este motivo, las moléculas cortas que inician la síntesis de DNA se llaman cebadores (o *primers* en inglés)<sup>(16)</sup>..

Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos monocatenarios, con un grupo hidroxilo 3' a partir del que se sintetiza la nueva cadena de polinucleótidos. La característica más importante de un cebador es su especificidad, es decir, solo se podrá unir a una región concreta del DNA diana. Esto asegura que solo se amplifica la región de interés. Para asegurar este parámetro. Se utilizan cebadores con un mínimo de 17 nucleótidos, ya que se estima que esta longitud es suficiente

para reconocer una sola secuencia en un genoma eucariota. Se pueden utilizar cebadores de longitudes mayores, pero generalmente el rango de tamaños de un PCR normal varía entre los 17 a 25 nucleótidos<sup>(16)</sup>..

Los elementos necesarios para la realización de una técnica de PCR son: DNA diana original (que se quiere amplificar), los cebadores, la polimerasa de DNA y nucleótidos libres que se incorporan a la cadena sintetizada.

La polimerasa del DNA utilizada es la responsable de la extensión de la nueva cadena de DNA a partir de un cebador. El tipo de polimerasa utilizada viene determinada por las características de cada PCR, vale la pena decir que en la actualidad existen distintas variaciones a la técnica de PCR, teniendo cada vez objetivos más específicos. Como la reacción ha de someterse a numerosos ciclos de desnaturalización y re-naturalización, se utiliza una polimerasa termoestable, es decir, pueden soportar elevadas temperaturas durante el largo del tiempo, sin perder su actividad. Es por eso que se utiliza una Taq Polimerasa (Taq debido al origen de la polimerasa, la cual proviene de una bacteria de la especie *Thermus aquaticus*). La Taq polimerasa requiere la presencia de ión magnesio como cofactor, por lo que todas las soluciones utilizadas deberán llevar este elemento. La temperatura óptima de polimerización de la Taq es de 72°C, a esta temperatura se incorporan unos 100 nucleótidos por segundo<sup>(16)</sup>..

Los nucleótidos libres necesarios para sintetizar las nuevas cadenas, tienen una buena resistencia al calor y su vida media es de más de 40 ciclos de calentamiento. Como se trata de sintetizar DNA, se utilizan desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), que pueden incorporarse al extremo 3' de una cadena creciente por su grupo fosfato 5'.

Una de las técnicas basadas en PCR más sensible para la detección de secuencias del DNA del HPV es el “*Reverse Line Blot*” (RLB). Esta técnica utiliza los iniciadores denominados GP5+/GP6+, que amplifican la región L1 de 36 tipos distintos de HPV (18 de genotipos de alto riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82 subtipos IS39 y W13B/MM4) y 18 de bajo riesgo

(6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 70, 71, 72, 81, 83, 84 y CP6108) . La técnica se basa en la hibridación de sondas para cada tipo viral sobre una membrana con los productos de PCR marcados con biotina que, a su vez, son conjugados con estreptavidina-peroxidasa y, finalmente, revelados con ECL en una película de autoradiografía.

Los resultados se ven mejor cuando se coloca la película sobre una cuadrícula impresa, o bien escanear la imagen e importar en un software como BioNumerics (Matemáticas Aplicadas, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Cada resultado de la sonda debe ser interpretado con referencia a las sondas de control positivo y el control negativo. Los resultados se califican como: como negativos, débiles o positivo. Los resultados positivos son aquellos que muestran la señal fuerte (en términos de intensidad de señal) igual o más fuerte que la sonda de control positivo. Los resultados negativos son aquellos en donde la señal está ausente o es igual a la del control negativo (en el caso de la señal de fondo). Los resultados débiles, son aquellos donde la señal es más débil que la sonda de control positivo, pero más fuerte que el control negativo. Esto puede deberse a mutaciones puntuales que llevan a una unión débil de la sonda o no existe una unión específica en la formación de primers.

En la imagen dos, se explican los posibles resultados de un PCR-RLB:

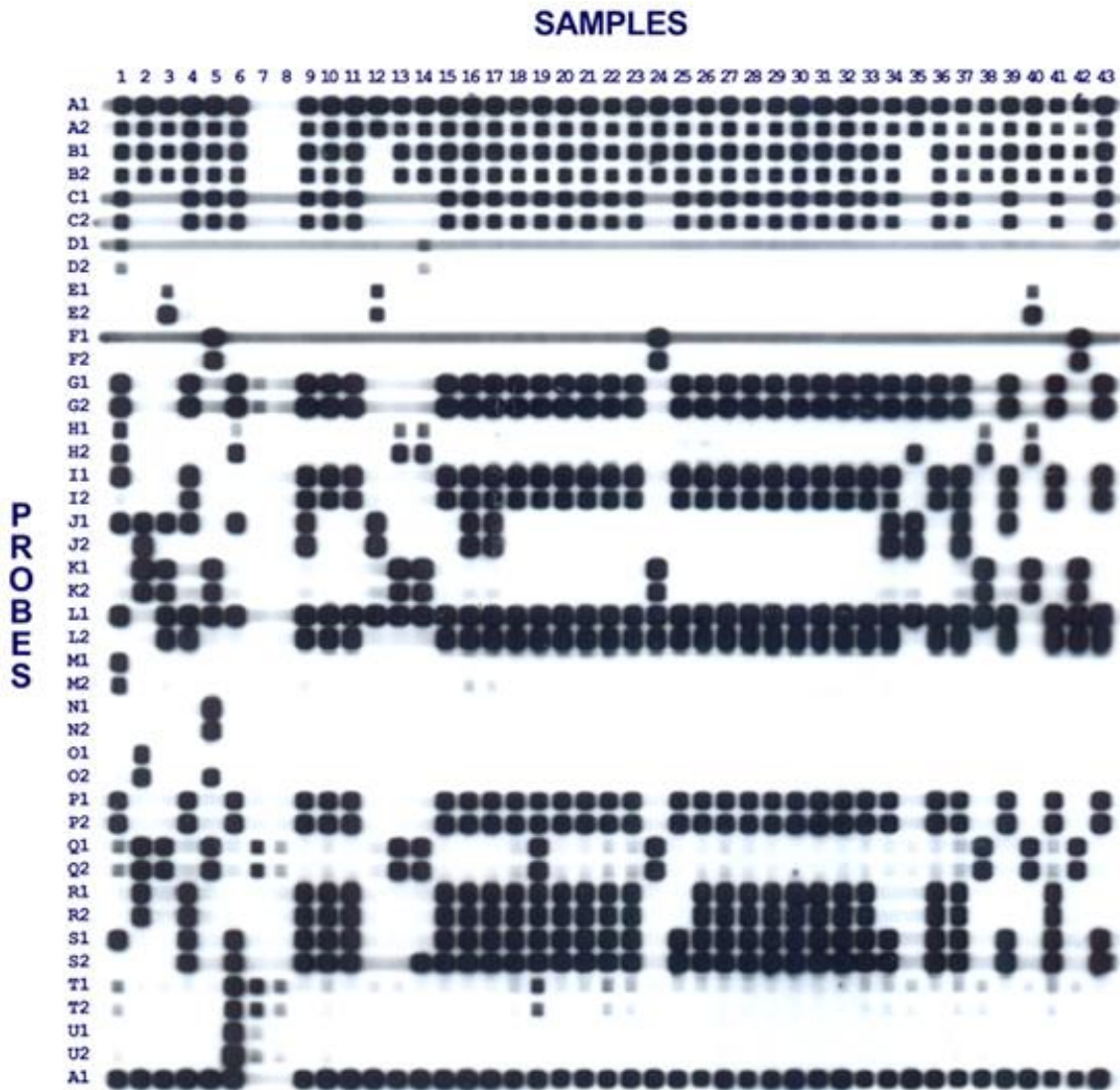


Imagen 2 (*Multiplex PCR and Reverse Line Blot Hybridization Assay (mPCR/RLB, Matthew V. N. O'Sullivan, Fei Zhou, Vitali Sintchenko, Fanrong Kong, and Gwendolyn L. Gilbert)*) vemos la representación de resultados de un PCR-RLB. Las muestras 1 a 6 representan los controles positivos. Ellas tienen al menos una sonda positiva para cada una de las 43 sondas. Cada una de las secuencias objetivo (A hasta la U) es detectada por dos sondas distintas para maximizar la especificidad del ensayo. Las sondas A1 y A2 representan sondas especie-específicas las cuales deben ser positivas para cada muestra y de esta forma ayudar a la orientación de la lámina. La zona A1 se repite al final de la membrana. Las muestras 7 y 8 son controles negativos. Vale la pena mencionar

las sondas Q1, Q2, T1 y T2 las cuales marcan en los controles negativos, lo que indica una unión no específica de los primers o de los productos del primer. Para estos se requiere un nuevo diseño de sondas o primers. Las sondas C1, D1 y F1 muestran una línea a través de la membrana, probablemente debido a una absorción de algunos sustratos no específicos del complejo estreptoavidina – peroxidasa o sustrato quimioluminiscente, sin embargo este artefacto es fácil de distinguir con respecto a las marcaciones positivas de la membrana. Las sondas D1 y D2 presentan una señal relativamente débil en comparación a las demás sondas, esto puede deberse a la presencia de amplicones que conducen a una menor eficiencia de la amplificación. La sonda J2 es negativa en muchas de las muestras, sin embargo positivas en otras (1, 3, 4, 6, 39), eso se debe a una probable mutación en el sitio de unión J2 para estas muestras.

## **CAPITULO 4: OBJETIVOS UNIDAD DE INVESTIGACIÓN**

### **4.1 Objetivo General**

Identificar la presencia del virus papiloma humano (HPV) en pacientes portadoras de un informe citológico ASC-H en un tamizaje realizado entre los años 2008-2009 en los servicios de atención primaria del sector sur de Santiago de Chile y divididas por cohorte según tratamiento realizado

### **4.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar a las pacientes según patología ginecológica en estudio.
- Caracterizar a las pacientes según tratamiento realizado para estas patologías.
- Identificar la presencia del HPV en el genoma de las pacientes a través de PCR.

## **CAPITULO 5: METODOLOGÍA**

### **5.1 Tipo de estudio**

El presente trabajo es un diseño observacional de tipo transversal (cross-sectional)



## 5.2 Muestra

La muestra consta de 44 pacientes de sexo femenino, de diferentes edades y comunas de la región Metropolitana en Santiago, Chile. Estas pacientes provienen de un estudio previo (“*Follow-up of women with atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesions (ASC-H)*”), realizado en el año 2009, el cual consistió en un seguimiento de 3 años a pacientes que se sometieron a un PAP de rutina (entre los años 2005-2006). Esta toma de muestra fue descriptiva, cuantitativa y monitoreada, proveniente de una cohorte de mujeres pertenecientes al Programa de Búsqueda y Control de Cáncer Cervical en Chile

Algunos de estos exámenes tuvieron como resultado un Papanicolau Atípico de alto grado (ASC-H). A las pacientes con este diagnóstico se les realizó un estudio completo y fueron diagnosticadas con distintas patologías cervicouterinas. Los centros de salud primarios de estas pacientes están asociados al Hospital Barros Luco Trudeau, lugar donde se procesaron las muestras tomadas.

## 5.3 Variables

Las variables para el presente trabajo son:

- Edad: Las edades de las pacientes fluctúan entre los 20 años y los 80 años.
- Comuna: Las pacientes pertenecen al sector sur de Santiago, localizándose dentro de las comunas de: Pedro Aguirre Cerda, San Bernardo, San Joaquín, Paine, Lo Espejo, San Miguel, La Cisterna, Buin, La Granja, El Bosque.
- Resultado de su PAP.
- Diagnóstico por Biopsia.
- Tipo de tratamiento recibido: Criocirugía, Cono, Histerectomía Parcial/Total.
- Fecha último PAP.

- Lapso de tiempo entre: la detección de su enfermedad primaria, la fecha en que recibió el tratamiento para ésta y fecha de la muestra actual.
- Según el tratamiento realizado, mantiene o no el virus HPV en su organismo, determinado por técnica de PCR y PAP.

## 5.4 Criterios de selección

### Criterios de exclusión:

- Pacientes con histerectomía parcial o total; Pacientes con Radioterapia; Pacientes con Quimioterapia; Pacientes Fallecidas

### Criterios de Inclusión:

- Pacientes con Criocirugía; Pacientes con Cono; Pacientes sin tratamiento.

La cohorte del estudio será de acuerdo al tratamiento que se realizó.

## 5.5 Protocolos de trabajo

### 5.5.1 Pacientes

Las pacientes serán citadas vía telefónica para la toma de muestra. Sus fichas ya fueron vistas previamente por lo que todas cumplen con los requisitos de inclusión al estudio. El consentimiento informado que firmó cada paciente se adjunta en el anexo.

### 5.5.2 Protocolo tinción PAP

El protocolo que se realizará para las muestras de PAP es el siguiente:

1. Lavar muestras en alcohol 95°.
2. Lavar muestras en alcohol 70°.
3. Lavar muestras en alcohol 50°.
4. Lavar muestras en agua destilada.
5. Hematoxilina de Harris. 3-5 minutos
6. Lavar muestras bajo llave de agua corriendo.
7. Alcohol ácido 0.1% 10 segundos
8. Lavar muestras en agua destilada
9. Lavar muestras en alcohol 70°
10. Lavar muestras en alcohol 95°
11. Solución Orange G 3-4 minutos
12. Lavar muestras en alcohol 95°
13. Lavar muestras en alcohol 95°
14. Solución EA 50 3-4 minutos
15. Deshidratar muestras en alcohol 95° 3 minutos
16. Deshidratar muestras en alcohol 95° 3 minutos
17. Deshidratar muestras en alcohol 100° 3 minutos
18. Xilol 5 minutos
19. Xilol 5 minutos.

### 5.5.3 Tipificación de HPV

Se utilizó la técnica de *Reverse Line Blot* (RLB) con productos de PCR biotinilados. Este método permite la hibridación no radiactiva de productos de PCR biotinilados con diferentes sondas de oligonucleótidos mediante un sistema de *Miniblotter*. Se utilizaron 36 oligosondas modificadas (18 de genotipos de alto riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82 subtipos IS39 y W13B/MM4) y 18 de bajo riesgo (6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 70, 71, 72, 81, 83, 84 y CP6108)). Las oligosondas se unieron de forma

covalente a una membrana Biodyne C activada con EDAC. Los productos de PCR obtenidos con los partidores GP5+ y GP6+ biotinilado, fueron denaturados a 96°C, enfriados en hielo, aplicados en cada capilar del *Miniblotter*, de forma perpendicular a las líneas de las oligosondas. La hibridación fue completada luego de 1 hora y luego la membrana fue removida y lavada. Para detectar la señal de hibridación del ADN, la membrana se incubó con un conjugado de streptoadivina-peroxidasa que interactúa con el producto de PCR biotinilado, seguido por detección quimioluminiscente mediante autorradiografía.

### 5.5.3 Protocolo PCR/RLB

1. Denaturación a 94°C por 4 minutos
2. 40 ciclos de amplificación, cada ciclo incluye un paso de denaturación a 94° por un minuto.
3. Anillamiento a 40°C por dos minutos.
4. Elongación a 72°C por 1 minuto y medio. La elongación final se puede prolongar más minutos.
5. En un Minibloter, se unen covalentemente las oligosondas con a la membrana, la cual se activa con EDAC 16% (P/V).
6. Se gira la membrana en 90 grados y se realiza la hibridación de los productos denaturados de la PCR a 42°C por 45 minutos
7. Dos lavados de 10 minutos a 52°C con 2X SSPE (1X SSPE contiene 0,18M NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 mM EDTA pH 7,4) y 0,5% de SDS.
8. Se incuba la membrana con la estreptoavidina peroxidasa (1:4000 de dilución) por 45 minutos a 42°C
9. Dos lavados con 2X SSPE por 5 minutos a temperatura ambiente.

## 5.6 Metodología

Para este estudio se realizaron dos tomas de muestra: la primera fue un PAP de rutina y la segunda para el estudio molecular. La finalidad de someter a las pacientes a la toma de muestra de PAP al mismo tiempo que el PCR es para validar el resultado del PCR junto al PAP. Ambas fueron realizadas el mismo día (no se citará a la paciente nuevamente). Ambas tomas de muestra se realizaron en la Unidad de Patología Cervical (UPC), en la sección de Reproducción Humana, en el Hospital Barros Luco Trudeau. El PAP fue procesado y analizado en dicho establecimiento, mientras que las muestras moleculares fueron enviadas para ser procesadas y analizadas en el Instituto de Salud Pública (ISP).

El procedimiento estuvo a cargo de un equipo de salud compuesto por dos matronas, un auxiliar técnico y personal de aseo. La obtención de las muestras se realizaron los días Jueves en un box de la UPC, previamente a ésta, las pacientes pasaban a una entrevista, donde se les informaba a las pacientes de ambos procedimientos, se llenó cada ficha con los datos personales de las pacientes, además de las fechas del último PAP, se completó el formulario de entrega para el departamento de virología del ISP, y se firmó el consentimiento informado de las pacientes. Finalmente los PAP fueron derivados a la unidad de Anatomía Patológica del Hospital Barros Luco y al día siguiente al ISP (estudio molecular). Las muestras moleculares fueron almacenadas a 4°C para conservar el DNA.

Para el PAP, se utilizó una espátula Ayre para la toma de células del cuello uterino, además de un espéculo de tamaño mediano. Se realizó el extendido en un portaobjetos de vidrio y se fijó con citospray. Luego se llevaron a la unidad de Anatomía Patológica y fueron teñidos con el protocolo de tinción de PAP. El screening de estas placas se realizó en un microscopio del mismo establecimiento. Cada PAP fue analizado por una técnica de “barrido” de izquierda a derecha, de arriba abajo, utilizando el objetivo 10x. Los detalles nucleares y citoplasmáticos fueron analizados con el objetivo 40x.

Para la muestra molecular, se utilizó una tórula de algodón que luego fue introducida en suero fisiológico para suspender la muestra y mantenerla, para que de esta manera el DNA se conserve de manera óptima. Se trasladaron las muestras al ISP donde se les realizó la técnica de de PCR-RLB para la tipificación del HPV y de esta forma confirmar o descartar la presencia del este.

## CAPITULO 6: RESULTADOS

Durante el periodo de estudio, se incluyeron 44 pacientes de sexo femenino, las cuales fueron contactadas de un estudio previo. Estas pacientes presentaron un PAP atípico H2 y fueron tratadas en la Unidad de Patología Cervical (UPC) del Hospital Barros Luco Trudeau durante el periodo de 2008 al 2011.

Del total de pacientes, 9 tuvieron pérdida de seguimiento por cambio de domicilio y desactualización de datos. 4 se negaron a participar en el estudio y 1 falleció. El resto de pacientes fueron citadas y acudieron a la toma de muestra. Para efectos de protección de la identidad de cada paciente, se les fue asignado un número del 1 al 30, el cual no condice con la ficha clínica que llevan en dicho establecimiento.

Las pacientes fueron clasificadas según la enfermedad por las cuales fueron tratadas. Esto se representa en la tabla 1:

Tabla 1: Patología	Número de pacientes	Porcentaje
HPV	4	13,33333333%
NIE 1	1	3,33333333%
NIE 1 + HPV	11	36,66666667%
NIE 2	1	3,33333333%
NIE 2 + HPV	2	6,66666667%
NIE 3	7	23,33333333%
NIE 3 + HPV	3	10%
Carcinoma In situ	1	3,33333333%
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>100%</b>

Fueron caracterizadas según el tratamiento que recibieron en la Unidad de Patología Cervical entre los años 2008 y 2009, esto se evidencia en la tabla 2:

Tabla 2: Tratamiento	Pacientes	Porcentaje
Cono	20	66,66666667%
Criocirugía	6	20%
Cono + criocirugía	1	3,33333333%
No corresponde tratamiento	3	10%
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>100%</b>

Los resultados de la toma de muestra del PAP fueron analizados en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Barros Luco Trudeau por el alumno tesista Alejandro Ponce y revisados nuevamente bajo la supervisión del Tecnólogo Médico Supervisor Sr. Orlando Quezada. Los resultados son mostrados en la tabla 3, donde se hace una comparación entre el resultado del último PAP que las pacientes se tomaron, y el resultado del PAP tomado en este estudio.

<b>Tabla 3: Paciente</b>	<b>Resultado PAP anterior</b>	<b>Resultado PAP estudio</b>
<b>1</b>	Negativo	Negativo
<b>2</b>	Negativo	Negativo
<b>3</b>	Negativo	Negativo
<b>4</b>	Negativo	Negativo
<b>5</b>	Negativo	Negativo
<b>6</b>	Negativo	Negativo
<b>7</b>	Negativo	Negativo
<b>8</b>	Negativo	Negativo
<b>9</b>	Negativo	Negativo
<b>10</b>	Negativo	Negativo
<b>11</b>	Negativo	Negativo
<b>12</b>	Negativo	Negativo
<b>13</b>	Negativo	Negativo
<b>14</b>	Negativo	Negativo
<b>15</b>	Negativo	Negativo
<b>16</b>	Negativo	Negativo
<b>17</b>	Negativo	Negativo
<b>18</b>	Negativo	Negativo
<b>19</b>	Negativo	Negativo
<b>20</b>	Negativo	Negativo
<b>21</b>	Negativo	Negativo
<b>22</b>	Negativo	Negativo
<b>23</b>	Negativo	Negativo
<b>24</b>	Negativo	Negativo
<b>25</b>	Negativo	Negativo
<b>26</b>	Negativo	Negativo
<b>27</b>	Negativo	Negativo
<b>28</b>	Negativo	Negativo
<b>29</b>	Negativo	Negativo
<b>30</b>	Negativo	Negativo



Los resultados del PAP fueron además clasificados según: Presencia de células metaplásicas y/o células endocervicales. Presencia de disqueratocitos, coilocitos y/o binucleaciones. Estos tres últimos parámetros se definen con ausencia de este tipo de células, baja cantidad, mediana cantidad, alta cantidad, según corresponda. Los resultados se aprecian en la tabla 4.

Tabla 4:

Paciente	Diagnóstico	Metaplásica	Endocervical	Disqueratocito	Coilocito	Binucleacion
1	IG7	0	0	0	0	0
2	IG7	0	0	0	0	0
3	IG7	0	0	0	0	0
4	IG8	++	+	0	0	0
5	IG8	+++	0	0	0	0
6	IG7	0	0	0	0	0
7	IG8	+	0	0	0	0
8	IG7	0	0	0	0	0
9	IG8	+	0	0	0	0
10	IG7	0	0	0	0	0
11	IG7	0	0	0	0	0
12	IG8	++	0	0	0	0
13	IG7	0	0	0	0	0
14	IG7	0	0	0	0	0
15	IG7	0	0	0	0	0
16	IG8	+	0	0	0	0
17	IG8	+	0	0	0	0
18	IG8	++	0	0	0	0
19	IG7	0	0	0	0	0
20	IG7	0	0	0	0	0
21	IG8	+	0	0	0	0
22	IG8	+	0	0	0	0
23	IG8	+	+	0	0	0
24	IG8	+	0	0	0	0
25	IG7	0	0	0	0	0
26	IG7	0	0	0	0	0
27	IG8	+	0	0	0	0
28	IG8	+	0	0	0	0
29	IG7	0	0	0	0	0
30	IG8	++	0	0	0	0

Códigos:

IG7	: Negativo para células neoplásicas malignas, no se observan células endocervicales ni metaplásicas	+	:	Baja presencia
IG8	: Negativo para células neoplásicas malignas, muestra satisfactoria	++	:	Moderada presencia
0	: Ausencia	+++	:	Alta presencia

Las muestras para PCR fueron analizadas en el Instituto de Salud Pública. Se utilizó el PCR-RLB. Los resultados del PCR se presentan en la tabla 5.

<b>Tabla 5: Paciente</b>	<b>Resultado PCR</b>	<b>Alto Riesgo</b>		<b>Bajo Riesgo</b>
<b>1</b>	Positivo	HPV 15	HPV 51	
<b>2</b>	Negativo			
<b>3</b>	Negativo			
<b>4</b>	Negativo			
<b>5</b>	Negativo			
<b>6</b>	Negativo			
<b>7</b>	Negativo			
<b>8</b>	Negativo			
<b>9</b>	Negativo			
<b>10</b>	Negativo			
<b>11</b>	Negativo			
<b>12</b>	Negativo			
<b>13</b>	Negativo			
<b>14</b>	Negativo			
<b>15</b>	Negativo			
<b>16</b>	Negativo			
<b>17</b>	Negativo			
<b>18</b>	Negativo			
<b>19</b>	Negativo			
<b>20</b>	Negativo			
<b>21</b>	Negativo			
<b>22</b>	Negativo			
<b>23</b>	Negativo			
<b>24</b>	Negativo			
<b>25</b>	Negativo			
<b>26</b>	Negativo			
<b>27</b>	Negativo			
<b>28</b>	Negativo			
<b>29</b>	Negativo			
<b>30</b>	Negativo			

Por último se grafica en la tabla 6 la cantidad total de pacientes negativas versus la cantidad de pacientes positivas de este estudio:

Tabla 6: Número de pacientes	Positivo	Negativo	Porcentaje
30	1	29	Positivo: 3,33333%
			Negativo: 96,666667%

## CAPITULO 7: DISCUSIÓN

La clasificación Bethesda incluye dos tipos de PAP atípico escamoso: i) PAP atípico o de significado indeterminado (ASCUS) y ii) PAP atípico de células escamosas que no puede descartar una lesión de alto grado (ASC-H). Cada uno de ellas tiene riesgos de progresar en una lesión de mayor severidad (NIE 2, NIE 3) la cual se confirma con biopsia. En el caso de los PAP ASCUS la evolución a una lesión más severa es de un 5-17% de los casos, mientras que en los ASC-H aumenta radicalmente de un 24-94% de los casos<sup>(17)</sup>. A pesar de que el riesgo de que un cáncer invasor en un PAP atípico pueda pasarse por alto es muy bajo (0,1-0,2%) hay que poner especial énfasis en este tipo de citología.

En Chile el método más utilizado para la pesquisa para este tipo de patologías es el PAP. En países más avanzados se utilizan dos métodos moleculares: la técnica de reacción con polimerasa en cadena (PCR) y la captura híbrida II (HCII).

Con respecto a la sensibilidad y especificidad de estos métodos de tamizaje, encontramos resultados variables. Para la citología convencional, basados en un estudio observacional de un meta-análisis, se reportó una sensibilidad del 62% y una especificidad de un 95%<sup>(19)</sup>, para neoplasias intraepiteliares de alto grado o más. Sin embargo, otros estudios con una mayor población de mujeres en análisis

(superior a 2000 mujeres), la sensibilidad varía de un 44% a un 86% y la especificidad de un 62% a un 98%<sup>(20)</sup>.

Para la tipificación del HPV con las dos técnicas moleculares, basados en un meta-análisis de 15 estudios de HCII y 6 estudios de PCR, se estima que estas técnicas son más sensibles pero menos específicas, obteniendo una sensibilidad de 90% y 81% mientras que se obtiene una especificidad de un 87% a un 95% respectivamente<sup>(19)</sup>.

En Chile, el costo de realizar estas técnicas moleculares es muy superior a la citología convencional. Algunos autores, plantean el realizar una prueba de HCII en primera instancia, dado que ella es más sensible (pero menos específica que PAP convencional), y luego citología convencional solo para los casos positivos. Esto permitiría realizar la prueba con un mayor intervalo en el tiempo (varios años, en caso de algunos casos negativos para HVP) y se ha estimado que con este método, solo 6-10% necesitaría de una citología convencional. Se necesitan más estudios para confirmar que estas medidas a nivel de salud pública permitirían una reducción en la tasa de morbilidad y mortalidad por esta patología y además se precisan estudios de costo efectividad actualizados para cada escenario

Los tratamientos para las neoplasias intraepiteliales pueden ser de tipo ablativo (criocirugía) o escisionales (cono)<sup>(21)</sup>. Para este estudio, las pacientes fueron sometidas a uno de los dos tratamientos, dependiendo del grado de lesión. Las pacientes que fueron sometidas a criocirugía tuvieron que cumplir con una serie de requisitos tales como: i) Presentar una colposcopia satisfactoria (con la zona de transformación claramente visible); ii) Carente de signos de una lesión invasora o microinvasora; iii) No presentar lesiones de compromiso glandular; iv) Poseer una correcta correlación entre histología y citología. Las pacientes que fueron sometidas a tratamientos escisionales, carecen de alguno de estos 4 requisitos. Dependiendo del caso, el cono se obtuvo con bisturí, con láser, y una escisión con asa en la zona de transformación<sup>(22)</sup>.

Según estudios, tanto aleatorios como no aleatorios se concluye que no es fácil hacer una comparación entre tratamientos. La gran mayoría de los tratamientos quirúrgicos alcanzan un 90% de éxito en erradicar la lesión, sin existir una diferencia muy notoria entre ambos casos. Sin embargo la crioterapia es un tratamiento más económico y eficiente que el cono, para las lesiones de bajo grado que requieran de algún tratamiento. Nuestro estudio corrobora los altos porcentajes de éxito en la radicación de las lesiones, logrando un 96,6% de casos negativos luego del tratamiento<sup>(21)</sup>.

Según el criterio de selección para tratamiento, en el presente estudio 20 de las 30 pacientes fueron sometidas a un tratamiento escisional (cono) lo que equivale al 66,6% del total de la muestra, mientras que 6 pacientes (20% del total de la muestra) fueron sometidas a un tratamiento ablativo (criocirugía). Esto debido a los criterios mencionados previamente, lo que hace más probable la elección de un cono frente a una criocirugía.

En los casos de pacientes que no recibieron tratamiento puesto que no correspondía (3 pacientes) es debido a que su diagnóstico fue Infección por Virus HPV. Estudios indican que las pacientes que solamente presentan infección por virus HPV (sin esta haber avanzado a NIE II o III) tienen entre un 90-95% de regresar espontáneamente a su estado normal<sup>(18)</sup>, es por eso que estas pacientes no reciben ni un tratamiento, dado que ambos tipos de tratamiento son de carácter invasivo para la paciente.

Según las guías clínicas del Ministerio de Salud, las pacientes con Neoplasias Intraepiteliales grado I (NIE I) con antecedentes previos de citología de bajo grado o atípico inespecífico, con una histología de NIE I evidenciada en una colposcopia, se un seguimiento con control PAP a 6 meses o con tipificación viral para HPV a 12 meses. En caso de que los controles con tipificación viral sea negativo para HPV de alto riesgo, se vuelve a controles rutinarios en el nivel primario.

Si la lesión persiste en un periodo de 2 años, se pueden seguir dos conductas: continuar el seguimiento controlando la lesión o realizar un tratamiento (escisional o ablativo).

Las lesiones intraepiteliales de alto grado (NIE II, NIE III, Carcinoma in situ (Ca in situ)) se determinan con una colposcopia, siendo esta generalmente satisfactoria para determinar el tratamiento a seguir. La gran mayoría de las pacientes de este estudio presentaron una colposcopia satisfactoria (25 pacientes) y solo en 5 casos se presentó una colposcopia insatisfactoria (no concluyente). A pesar de que existen resultados que no son concluyentes, las guías clínicas sugieren completar el estudio con una biopsia debido que estudios revelan que hasta un 7% de pacientes con NIE II o NIE III y colposcopia insatisfactoria, presentan un carcinoma invasor oculto, que solo puede ser detectado con un procedimiento escisional.

Los estudios moleculares recientes demuestran que entre el 32.6-57.1% de los PAP con ASCUS corresponden a infecciones de HPV de alto riesgo. Las mujeres con resultados ASCUS y HPV-16 positivas tienen un 31,5% y 20,0% de riesgo de desarrollar NIE 2 y NIE 3, respectivamente. Es decir, 1 de cada 7 mujeres con un PAP ASCUS y HPV de alto riesgo positivo progresa a NIE 2 o más; en cambio 1 de cada 125 con resultado ASCUS y HPV de alto riesgo negativo puede progresar a NIE 2 o más. Adicionalmente se ha demostrado que el 6,7% de las mujeres con PAP normal o negativo están efectivamente infectadas con HPV de alto riesgo 16 o 18. De estas mujeres, el 10% pueden desarrollar NIE 3 en menos de dos años (15 meses promedio). Estos resultados señalan la utilidad de introducir el diagnóstico molecular y genotipificación de HPV de alto riesgo en el diseño de los programas de control de CaCu(23).

Nuestro estudio presentó 1 caso positivo para HPV. Esta paciente ingresó al sistema por un PAP atípico H2. Su colposcopia mostró una NIE, su biopsia una NIE 1 y el tratamiento que recibió fue escisional, el cual confirmó una NIE 3. Su primer control resultó Negativo para células neoplásicas, tanto en su PAP como en su Colposcopia. Esta paciente continuó con su seguimiento durante 2 años, dando

como resultado negativo en todos sus controles. Por lo que el año 2012 fue dada de alta. El año 2013 ésta paciente no se realizó su PAP anual, por lo que el PAP que se le realizó el año 2014 fue el primero luego de su alta médica. El PAP de esta paciente dio como resultado: “Negativo para células neoplásicas, no se observan células endocervicales ni metaplásicas (IG7)” sin embargo su exámen de PCR dio como resultado Positivo para Virus Papiloma Humano, con tipificación HPV-16 y HPV-51. Estos dos tipos de HPV se encuentran dentro de los 5 tipos de HPV más prevalentes sin necesidad de presentar anormalidades citológicas, teniendo un 2,3% de prevalencia y un 1,6% de prevalencia respectivamente (HPV-31 (2.1%), HPV-53 (1.5%), and HPV-59 (1.4%)), así también en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, el HPV-16 y el HPV-51 se encuentran también definidos dentro de los tipos más prevalentes con un 34,9% y un 11,9% respectivamente (HPV-31 23,9%; HPV-39 y HPV-52, ambos 12,8%)<sup>(13)</sup>. El HPV-51 es considerado un tipo de alto riesgo con una baja prevalencia (0%-2,3%) en lesiones intraepiteliales<sup>(14)</sup>. Basados en los antecedentes de la paciente, definimos que ella presenta una reinfección producto de una nueva exposición al contagio del virus.

## CAPITULO 8: CONCLUSIÓN

- De las pacientes que se presentan en este trabajo, se concluye que 16 pacientes (53,32%) tuvieron una lesión intraepitelial de bajo grado (NIE 1, infección por HPV). Mientras que 14 de los pacientes (43.32%) presentaron una lesión intraepitelial de alto grado (NIE 2, NIE 3, CaCu)
- Del total de pacientes, 20 recibieron un tratamiento ablativo (66,66%). 6 de las pacientes recibieron un tratamiento escisional (20%). 1 paciente recibió ambos tratamientos (3,33%) y 3 pacientes no recibieron ni un tratamiento, dado que este no correspondía por el tipo de infección que presentaron (10%).
- 29 pacientes (96,6%) de este estudio tuvieron un resultado Negativo para Virus Papiloma Humano. Mientras que una paciente (3,33%) marcó positiva para Virus Papiloma Humano, con una tipificación de HPV-16 y HPV-51. Se concluye que esta paciente tuvo una reinfección.
- La técnica de PCR-RLB entrega importante información con respecto a la presencia del virus HPV en el organismo de la paciente. Pudiendo incluso llegar a transformarse en un “Gold Estándar” en Chile.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010
2. Departamento de Estadísticas e Información de Salud – DEIS. Unidad de Cáncer. Programa Nacional de Cáncer Cervicouterino. Santiago, Chile. Ministerio de Saludo. 2010
3. Prevalence of human papillomavirus virus and risk factors in men: a systematic review. Jaiberth Cardona-Arias, Jenniffer Puerta-Suárez, Jenniffer Flórez-Duque. 2011
4. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with verrucal cáncer. N Engl Med 2003, 248: 518-527
5. Belnap DM, Olson NH, Cladel NM, Newcomb WW, Brown JC, Kreider JW, Christensen ND, Baker TS. Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. 1996 Jun 7;259(2):249-63.
6. Pfister H, Gissman L, zur Hausen H. Partial characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV). Virology 1977; 83: 131-137
7. Crawford LV, Crawford EM. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. Virology 1963; 21; 258-263.
8. Drs. René Rivera Z., Jorge Aguilera T., Srta. Angélica Larraín H epidemiología del virus papiloma humano (hpv). Rev chil obstet ginecol 2002; 67(6): 501-506
9. Bergeron C. The 2001 Bethesda System. Salud Publica Mex 2003; 45 suppl 3:S340-S344.
10. Fazel N, Wilczynski S, Lowe L. Clinical, histopathologic and molecular aspects of cutaneous human papillomavirus infections. Dermatol Clin 2007; 17: 521-36.

11. Pahel G., Aulabaugh A., Short SA., Barnes JA., Painter GR., Ray P. and Phelps WC. 2005. Structural and functional characterization of the HPV1 6 E7 protein expressed in bacteria. *J.Biol.Chem.* 268(34)26018-26025
12. Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lorincz AT, Burk RD, et al. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. *J Clin Microbiol* 2001;35:2262-5.
13. Arbyn M, Benoy I, Simoens C, Bogers J, Beutels P, Depuydt C. Prevacination distribution of human papillomavirus types in women attending at cervical cancer screening in Belgium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:321–30
14. Incident HPV 51 Infection After Prophylactic Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-Like Particle Vaccine Gardasil/Silgard®. Philippe Halfon, Sophie Ravet, Hacène Khiri, Guillaume Penaranda and Carole Lefoll. *Clinical Medicine Insights: Case Reports* 2010;3 69–71.
15. Melo A, Montenegro S, Hooper T, Capurro I, Roa JC, Roa I. [Human papilloma virus (HPV) typing in pre-neoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervix in the IX region-Chile]. *Rev Med Chile* 2003; 131 (12): 1382-90
16. Genética Humana: Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la genética en el campo de la Biomedicina. Francisco Javier Novo Villaverde. “Técnicas básicas de genética molecular” pag. 40-44.
17. Sherman ME, Solomon D, Schiffman M. Qualification of ASCUS. A comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL Triage Study. *Am J Clin Pathol.* 2010;116:386-394.
18. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1336-1343.

19. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1336-1343.
20. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Preventive Strategies. (2003 : Lyon France), World Health Organization., International Agency for research on Cancer. Cervix cancer screening : views and opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Cancer-preventive Strategies, Lyon, 20-27 April 2004. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2005:302 s.
21. Martin-Hirsch P, Paraskevidis E, Kitchener H. Cirugía para la neoplasia intraepitelial cervical. *Cochrane Databases of Systematic Reviews.* 2008.
22. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197:340-345.
23. “Diagnóstico de laboratorio de infección con Virus Papiloma Humano”. Instituto de Salud Pública 2013. [www.ispch.cl](http://www.ispch.cl)

# ANEXO

**Derunciones por tumor maligno del cuello del utero (CIE-10: C53.-), según Región de residencia.  
Chile, 2000-2010.**

Región de residencia	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<b>Chile</b>	<b>683</b>	<b>674</b>	<b>632</b>	<b>677</b>	<b>676</b>	<b>677</b>	<b>669</b>	<b>638</b>	<b>636</b>	<b>646</b>	<b>578</b>
De Arica Y Parinacota	3	3	5	8	8	4	5	9	9	4	4
De Tarapacá	7	8	11	7	16	9	8	11	4	13	10
De Antofagasta	15	25	19	24	17	16	21	21	23	22	14
De Atacama	15	17	11	15	10	13	15	7	18	12	9
De Coquimbo	33	41	31	32	36	43	38	36	30	29	40
De Valparaíso	77	89	75	90	87	79	85	80	85	92	74
Metropolitana de Santiago	233	215	223	201	189	207	223	194	204	188	193
Del Libertador Gral. Bernardo O´Higgins	25	35	27	36	33	34	30	34	35	36	24
Del Maule	48	48	46	61	59	57	40	47	40	47	44
Del Biobío	117	86	81	94	108	109	96	101	95	93	80
De La Araucanía	48	52	41	48	49	39	48	40	39	49	43
De Los Ríos	20	15	16	14	11	17	15	12	15	12	8
De Los Lagos	30	25	32	34	39	38	36	35	31	32	26
De Aisén Del Gral. Carlos Ibáñez Del Car	6	9	6	5	5	3	1	3	4	8	4
De Magallanes y de La Antártica Chilena	6	6	8	8	9	9	8	8	4	9	5

Tasa de Mortalidad Observada<sup>1</sup>, según Región de residencia. Chile 2000-2010

Región de residencia	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<b>Chile</b>	<b>8,78</b>	<b>8,57</b>	<b>7,95</b>	<b>8,42</b>	<b>8,32</b>	<b>8,24</b>	<b>8,06</b>	<b>7,61</b>	<b>7,51</b>	<b>7,56</b>	<b>6,70</b>
De Arica Y Parinacota	3,11	3,11	5,18	8,29	8,29	4,14	5,19	9,38	9,40	4,19	4,20
De Tarapacá	5,92	6,58	8,82	5,47	12,19	6,69	5,80	7,79	2,77	8,79	6,61
De Antofagasta	6,18	10,17	7,62	9,50	6,64	6,17	7,99	7,90	8,54	8,07	5,08
De Atacama	11,75	13,21	8,49	11,49	7,60	9,81	11,24	5,21	13,29	8,80	6,55
De Coquimbo	10,61	12,97	9,65	9,80	10,85	12,76	11,11	10,37	8,51	8,11	11,02
De Valparaíso	9,69	11,06	9,20	10,91	10,42	9,35	9,95	9,26	9,73	10,42	8,29
Metropolitana de Santiago	7,36	6,72	6,89	6,14	5,70	6,18	6,59	5,67	5,90	5,39	5,47
Del Libertador Gral. Bernardo O'Higgins	6,33	8,77	6,69	8,83	8,01	8,16	7,13	8,00	8,15	8,30	5,48
Del Maule	10,39	10,29	9,77	12,83	12,30	11,77	8,19	9,54	8,05	9,37	8,70
Del Biobío	12,18	8,89	8,30	9,56	10,91	10,93	9,56	9,98	9,33	9,07	7,75
De La Araucanía	10,77	11,55	9,02	10,46	10,57	8,33	10,16	8,39	8,11	10,10	8,78
De Los Ríos	11,07	8,26	8,76	7,62	5,95	9,15	8,03	6,40	7,96	6,34	4,21
De Los Lagos	8,29	6,81	8,60	9,02	10,22	9,83	9,19	8,83	7,72	7,87	6,32
De Aisén Del Gral. Carlos Ibáñez Del Campo	13,54	20,07	13,22	10,89	10,77	6,39	2,10	6,24	8,23	16,28	8,05
De Magallanes y de La Antártica Chilena	8,23	8,21	10,91	10,88	12,20	12,17	10,78	10,74	5,35	12,00	6,65

Tasa de Mortalidad Ajustada<sup>2</sup>, según Region de residencia. Chile 2000-2010

Región de residencia	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<b>Chile</b>	<b>9,33</b>	<b>8,91</b>	<b>8,11</b>	<b>8,43</b>	<b>8,19</b>	<b>7,98</b>	<b>7,64</b>	<b>7,10</b>	<b>6,85</b>	<b>6,78</b>	<b>5,82</b>
De Arica Y Pari	3,83	3,26	5,46	8,89	8,40	4,14	5,03	8,70	8,16	3,75	3,46
De Tarapacá	7,57	8,48	11,82	6,21	14,58	8,41	6,29	8,39	3,08	9,01	6,81
De Antofagasta	8,34	12,58	9,16	11,30	7,78	7,00	8,96	8,51	9,35	8,85	5,37
De Atacama	0,00	15,89	9,72	13,61	8,17	10,74	11,92	5,21	13,81	9,09	6,65
De Coquimbo	11,54	13,76	10,03	10,00	10,86	12,47	10,78	10,09	7,81	7,22	9,67
De Valparaíso	9,31	10,36	8,41	9,71	9,43	8,13	8,52	8,08	8,34	8,93	6,54
Metropolitana	7,69	6,86	6,93	6,03	5,49	5,88	6,15	5,21	5,28	4,73	4,71
Del Libertador	6,92	9,31	7,04	9,05	8,06	8,14	6,98	7,57	7,57	7,58	4,94
Del Maule	11,34	10,87	10,10	13,25	12,32	11,70	7,90	9,03	7,49	8,61	7,71
Del Biobío	13,22	9,45	8,64	9,75	10,93	10,81	9,18	9,29	8,53	8,22	6,84
De La Araucanía	11,46	12,09	9,38	10,47	10,30	8,16	9,66	7,86	7,56	9,14	7,49
De Los Ríos	11,59	8,39	8,94	7,47	5,75	9,07	7,42	6,00	7,13	5,76	3,67
De Los Lagos	9,08	7,32	9,13	9,51	10,57	10,00	9,11	8,64	7,50	7,55	5,76
De Aisén Del C	20,31	23,50	16,11	13,08	13,12	7,48	2,51	6,73	9,05	17,42	8,03
De Magallanes	8,52	8,62	11,02	10,72	12,00	12,02	10,28	9,96	4,95	10,91	5,68

1 Tasa por 100 mil mujeres

2 Tasa por 100 mil mujeres, ajustada a la población de Chile 2002.