



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN



ANLIS | Administración Nacional de
Laboratorios e Institutos de Salud

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN
ADMINISTRACION NACIONAL DE LABORATORIOS E
INSTITUTOS DE SALUD “Dr. Carlos G. Malbrán”

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (4ta. Cohorte)

“Detección y tipificación del Virus
Papiloma Humano en el marco del tamizaje
viroológico para la detección de lesiones del
cuello uterino en Asunción, Paraguay”

Maestrando: Bioquímica María Liz Bobadilla Frizzola

Directora de Tesis: Dra. María Alejandra Picconi

BUENOS AIRES – ARGENTINA

2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera y por brindarme una vida llena de aprendizajes, oportunidades, experiencias y sobre todo de felicidad.

A mis padres por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de formarme en el transcurso de mi vida.

A Rubén, mi esposo, por su amor y paciencia inagotables y por motivarme a crecer profesionalmente. A mis hijos Cecilia y Fernando por llenar mi vida de alegrías y amor. No olvidaré a mis pequeños pidiendo en sus oraciones de la mañana “y niñito Jesús te pedimos que mami termine la tesis”, entendiendo lo importante que esta culminación era para mí.

A las autoridades del Laboratorio Central de Salud Pública por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias a mis compañeros del Departamento de Inmunología, por el acompañamiento y apoyo incondicional; y un reconocimiento muy especial a la Dra. Verónica Villagra, Jefe del Departamento, por la confianza en mi trabajo y el ánimo infundido constantemente para la elaboración de esta tesis.

A los integrantes de los Servicios de Patología Cervical del Hospital Materno-Infantil San Pablo, del Hospital Materno-Infantil de Trinidad y del Centro de Salud N°10, por su invaluable colaboración en la recolección de las muestras y en la búsqueda de archivo de las pacientes, demostrando así su gran interés en iniciar el trabajo conjunto para la implementación de la detección molecular del VPH en sus servicios.

A la Dra. Alejandra Picconi, mi directora de tesis, por haber aceptado guiarme en el desarrollo de este proyecto. Gracias por confiar en mí, por la paciencia y por ser un ejemplo a seguir, en cuanto a profesionalidad, tenacidad y superación. Gracias también por su trato humano, comprensión y apoyo no sólo en lo profesional, sino también en lo personal.

A los integrantes del Servicio de Virus Oncogénicos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires-Argentina, por la hospitalidad ofrecida durante mis estadías en el laboratorio; y especialmente a Jorge Basiletti que me brindó su tiempo y conocimientos para poder realizar las tipificaciones.

A la Dra. Margarita Samudio, por su orientación en el análisis de datos y por sus críticas constructivas que tanto valoro.

A mi amiga del alma, Mirian Helman, por haberme recibido en su casa durante mis estadías en Buenos Aires y por los momentos de distensión que compartimos.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, confianza y apoyo; algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mi vida.

¡GRACIAS A TODOS!

LISTA DE CONTENIDOS

Contenido	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1. BREVE RESEÑA HISTÓRICA	2
1.2. CARACTERISTICAS GENERALES DEL AGENTE VIRAL	3
1.2.1. Clasificación Taxonómica	3
1.2.2. Estructura del virus	5
1.2.3. Organización genómica	5
1.3. LA INFECCION POR EL VPH	15
1.3.1. Enfermedades asociadas a la infección por VPH	15
1.3.2. Historia natural de la infección por el VPH y el CCU	18
1.3.3. Factores asociados al CCU	20
1.4. EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCION POR VPH Y DEL CCU	22
1.5. DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR VPH	24
1.5.1. Examen citológico e histopatológico	24
1.5.2. Diagnóstico molecular	26
1.6. UTILIDAD DE LAS PRUEBAS MOLECULARES DE DETECCIÓN DEL VPH	30
1.6.1. Uso clínico	30
1.6.2. Aplicaciones en epidemiología y vigilancia virológica	31
1.7. PREVENCIÓN	32
1.7.1. Prevención primaria	32
1.7.2. Prevención secundaria	33
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GENERAL	36
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	36
3. MATERIALES Y METODOS	37
3.1. POBLACION DEL ESTUDIO	38
3.1.1. Criterios de inclusión	38
3.1.2. Criterios de exclusión	38
3.2. CENTROS PARTICIPANTES	38

LISTA DE CONTENIDOS

Contenido	Página
3.3. MUESTRAS CLINICAS	39
3.4. ESTUDIOS VIROLOGICOS	41
3.4.1. Detección del VPH mediante el Sistema Cobas 4800 HPV Test	42
3.4.2. Tipificación viral mediante PCR-RLB	44
3.5. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO	47
3.6. RECOLECCIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
3.7. ASUNTOS ESTADÍSTICOS	48
4. RESULTADOS	49
4.1. DETECCIÓN DE VPH-AR CON EL SISTEMA COBAS 4800 HPV TEST	50
4.2. TIPIFICACIÓN VIRAL POR PCR-RLB	53
4.3. CORRELACIÓN DE LOS DATOS VIROLÓGICOS CON LA CITOLOGÍA	55
4.4. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VPH-AR	57
5. DISCUSIÓN	59
6. CONCLUSIONES	70
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Clasificación de los VPH basada en la secuencia del gen de la proteína de la cápside L1.	4
Figura 2. Estructura del VPH.	6
Figura 3. Organización genómica del VPH-16.	7
Figura 4. Ciclo de vida del VPH.	11
Figura 5. Mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis cervical inducida por VPH.	13
Figura 6. Evolución de la nomenclatura cito-histológica de las lesiones de cérvix.	17
Figura 7. Historia natural de la infección por VPH y desarrollo de CCU.	19
Figura 8. Histopatología de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN).	26
Figura 9. Detección de VPH por Captura de Híbridos.	28
Figura 10. Procedimiento de toma de muestra mediante cepillado cervical.	40
Figura 11. Algoritmo de procesamiento de las muestras cervicales.	41
Figura 12. Sistema Cobas 4800 HPV Test.	42
Figura 13. Sistema de purificación de material genético del Cobas 4800 HPV Test.	43
Figura 14. Software del Cobas 4800 HPV Test.	44
Figura 15. Esquema del genoma del VPH.	45
Figura 16. Frecuencia por edad de la detección de VPH-AR.	52
Figura 17. Genotipificación de VPH por RLB.	53
Figura 18. Distribución de los genotipos virales en citologías normales y con lesiones.	56

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
Tabla 1. Clasificación de los VPH según potencial carcinogénico.	5
Tabla 2. Funciones de las proteínas del VPH.	8
Tabla 3. Nombre y Secuencia de Primers de consenso PGMY09/11biot.	46
Tabla 4. Frecuencia de VPH-AR.	50
Tabla 5. Frecuencia de la infección por VPH-16, VPH-18 y otros VPH-AR.	50
Tabla 6. Frecuencia de infecciones simples y múltiples en muestras positivas para VPH-AR.	51
Tabla 7. Frecuencia por edad de la detección de VPH-AR.	51
Tabla 8. Frecuencia por edad de la infección por VPH-16, VPH-18 y otros VPH-AR.	52
Tabla 9. Tipos de VPH identificados por PCR-RLB.	54
Tabla 10. Frecuencia de VPH-AR según diagnóstico citológico.	55
Tabla 11. Frecuencia de infecciones simples y múltiples según diagnóstico citológico.	55
Tabla 12. Tipos de VPH-AR detectados según diagnóstico citológico.	56
Tabla 13. Características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de las pacientes	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	Anticonceptivos orales
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
CCI	Carcinoma Cervical Invasivo
CCU	Cáncer de Cuello Uterino
CIN	Cervical Intraepithelial neoplasia
CRPV	Cottonail Rabbit Papillomavirus
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
EV	Epidermodisplasia verruciforme
HLA	Antígeno leucocitario de histocompatibilidad
IARC	International Agency of Research in Cancer
ITS	Infecciones de Transmisión Sexual
IVVA	Inspección visual con Ácido Acético
LCR	Long Control Region
LCSP	Laboratorio Central de Salud Pública
MSPyBS	Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ORF	Open Reading Frames
Pb	pares de bases
pRB	Retinoblastoma
RLB	Hibridación Reversa en Línea
RR	Riesgo Relativo
SIL	Squamous intraepithelial lesion
URR	Upstream Regulatory Region
VP	Virus del Papiloma
VPH	Virus Papiloma Humano
VPH-AR	Virus Papiloma Humano de Alto Riesgo Oncogénico
VPH-BR	Virus Papiloma Humano de Bajo Riesgo Oncogénico
VPH-pAR	Virus Papiloma Humano de probable riesgo oncogénico

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BREVE RESEÑA HISTÓRICA

Las verrugas y su carácter infeccioso se conocen desde la antigua Grecia, aunque hasta el siglo XIX las verrugas genitales se consideraban una forma de sífilis o gonorrea. La naturaleza viral de las verrugas humanas fue establecida en 1907 por Giuseppe Ciuffo y desde entonces se fueron identificando Virus del Papiloma (VP) en múltiples especies de vertebrados.

El género Papillomavirus fue descrito por primera vez en el año 1930 por Richard Shope, quien caracterizó la naturaleza transmisible de los papilomas cutáneos que afectaban a los conejos silvestres (SHOPE RE y col, 1933). Este VP, actualmente denominado CRPV (Cottonail Rabbit Papillomavirus), fue el primer virus oncogénico identificado.

En las décadas de los 50 y 60 se avanzó en el conocimiento sobre la diferenciación celular y la replicación viral. El desarrollo de la microscopía de inmunofluorescencia, y la mejora de la microscopía electrónica, permitió examinar la estructura de las partículas virales. El análisis de los papilomas producidos por el CRPV mostró que las partículas aparecían exclusivamente en el núcleo de queratinocitos diferenciados, en las capas superiores de las lesiones. La naturaleza crónica de los papilomas indicaba que el virus debía estar presente también en las capas basales, por lo que la ausencia de partículas virales en éstas llevó a inferir que el virus podía estar en una forma inmadura. Además, se dedujo que la replicación de los VPs estaba estrechamente ligada al proceso de diferenciación de las células epiteliales escamosas.

Desde los años 70 hasta el inicio de los años 90 se produjo el desarrollo de la genética viral y con ella la emergencia de los virus del papiloma humano (VPH) como virus de importancia médica. El desarrollo de las técnicas de clonaje molecular permitió superar parte de las limitaciones experimentales que presentaba el estudio de los VPs, lo que incentivó nuevamente el interés por estos virus. En esta época se clonó el genoma completo del virus del papiloma bovino tipo 1 (VPB1) (CHEN EY y col, 1982), y a continuación se clonaron los genomas del VPH tipo 1 (DANOS O y col, 1982) y del VPH tipo 6 (SCHWARZ E y col, 1983), identificándose las regiones reguladoras y las funciones de los diversos genes virales. Un avance digno de destacar, fue el reconocimiento de la existencia de diversos genotipos del VPH: unos que inducían verrugas cutáneas, otros que se asociaban con la epidermodisplasia verruciforme (EV) y otros responsables de verrugas genitales (GISSMAN L y col, 1980).

Los estudios llevados a cabo por Orth y colaboradores fueron los que mostraron que algunas lesiones de EV progresaban hacia carcinomas de células escamosas (ORTH G y col, 1978). El análisis de estos tumores reveló que la gran mayoría contenía dos genotipos, el VPH-5 o el VPH-8. Estos descubrimientos fueron los primeros que pusieron de manifiesto que el VPH estaba implicado en tumores en humanos. Las primeras evidencias de la relación entre los VPH genitales y el cáncer cervical fueron descritas por Zur Hausen en el año 1981. Los primeros tipos genitales aislados fueron los VPH-6 y 11 (DE VILLIERS EM y col, 1981), presentes en verrugas genitales. A continuación, se aislaron los tipos 16 (DURST M y col, 1983) y 18 (BOSHART M y col, 1984) los cuales se detectaban en la mayor parte de los cánceres de cuello uterino, implicándose así definitivamente a los VPHs en los cánceres humanos.

1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL AGENTE VIRAL

1.2.1. Clasificación Taxonómica

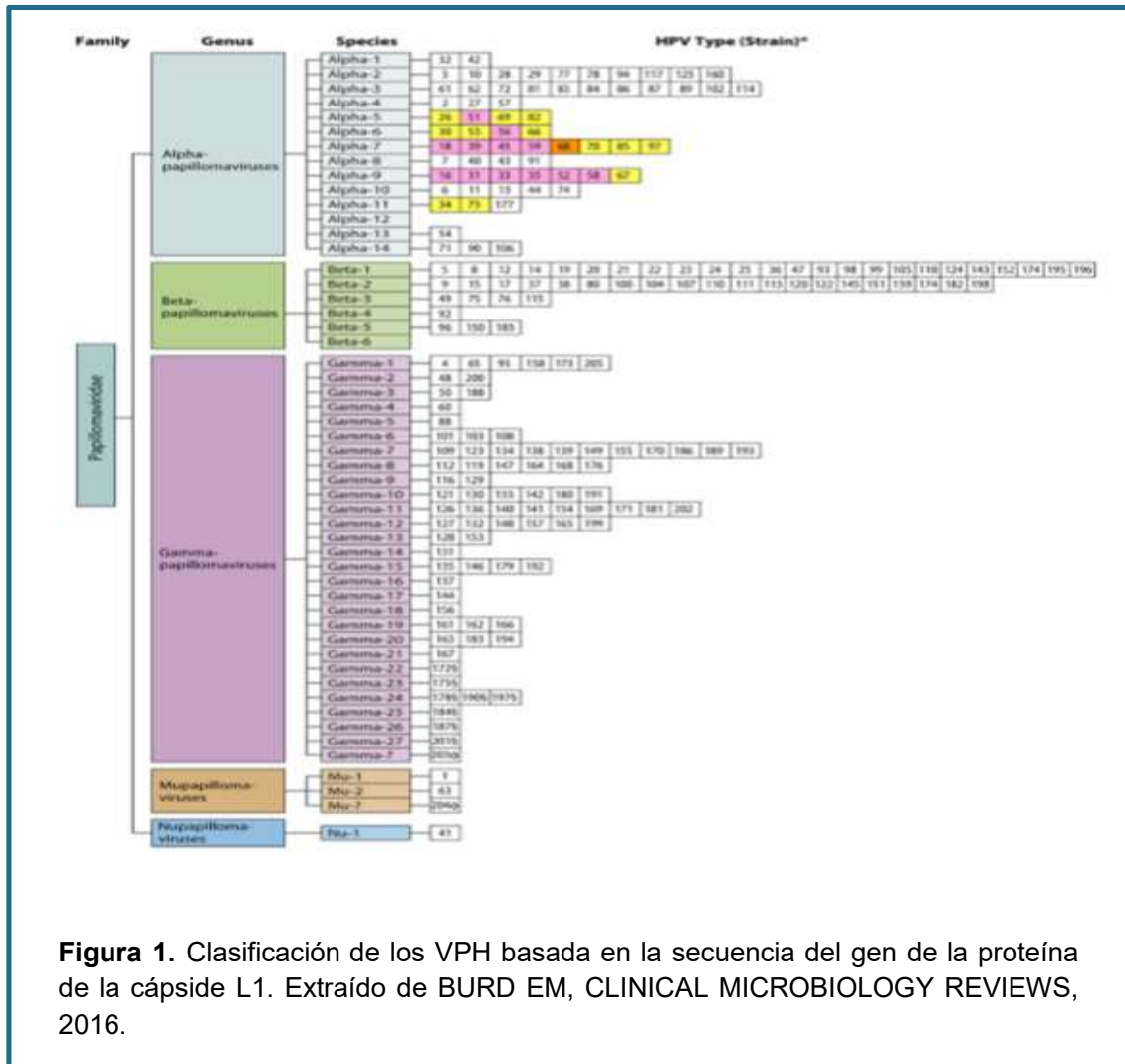
Históricamente, los Papillomavirus junto con los Polyomavirus, constituían la familia *Papovaviridae*, debido a que ambos son virus con genomas de ADN circular de doble cadena, y con cápside icosaédrica sin envoltura. Posteriormente, se encontró que estos grupos de virus tienen genomas de distinto tamaño, organizaciones genómicas completamente diferentes y poca similitud de secuencia, por lo que han sido reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus como familias separadas, *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae* (DE VILLIERS EM y col, 2004).

La familia *Papillomaviridae* comprende una serie de virus que han sido detectados en muchas especies animales, así como en humanos. Generalmente han sido descritos como específicos de hospedador; sin embargo, ha habido raros reportes de infecciones entre especies, como la detección de ADN de VPH asociado a lesiones escamosas en gatos (ANIS EA y col, 2010; O'NEIL SH y col, 2011).

La clasificación de los PVs se basa exclusivamente en la caracterización de un segmento de 291 pb de una región altamente conservada del gen L1 abarcada por los cebadores MY09 y MY11 (DE VILLIERS EM y col, 2004; BERNARD HU y col, 2010). Este es un gen bien conservado entre los miembros de la familia Papillomaviridae y codifica para la proteína mayoritaria de la cápside (L1).

Se trata de *género* al encontrarse menos de un 60% de homología, de *especie* entre 60 y 70%, de *tipo* entre 71 y 89%, de *subtipo* entre 90 y 98% y de *variante* cuando existe más de un 98% de homología en la secuencia del gen (BERNARD HU y col, 2005). Los tipos se asignan por números y los subtipos por letras.

Actualmente, la familia *Papillomaviridae* está dividida en 39 géneros. Los VPH están contenidos en cinco de estos géneros: *Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* y *Nu*; siendo el *Alfa* y el *Beta* los más importantes. (BURD EM, 2016; VAN DOORSLAER K, 2013; BERNARD HU y col, 2010; DE VILLIERS EM y col, 2004). Figura 1.



Los diferentes genotipos de VPH son tejido-específicos y producen diferentes tipos de lesiones; se distinguen los **virus cutáneos**, que infectan y se replican en células epiteliales escamosas de la piel produciendo las verrugas comunes; y los **virus mucosos** que infectan y se replican en mucosas, como conjuntiva, oral, esofágica y genital. El grupo mucosotrópicos han sido subgrupados según su potencial oncogénico.

Como se esquematiza en la Tabla 1, la IARC congregó a doce tipos de VPH en el Grupo 1 (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59), son carcinogénicos en humanos, evidenciado por su asociación con CCU y denominados como tipos de VPH de “alto riesgo oncogénico” (VPH-AR). Estos tipos de VPHs pertenecen a las especies filogenéticamente relacionadas alfa-5, 6, 7, 9 y 11. Otros fueron clasificados en el Grupo 2B de “probable riesgo oncogénico” (pAR), basados en su relación filogenética con los tipos del Grupo 1; a excepción del VPH-68 que fue asignado recientemente, al Grupo 2A. Finalmente, los VPH-6 y VPH-11 están en el Grupo 3, pertenecen a la especie alfa-10, son considerados no carcinogénicos en humanos y denominados de “bajo riesgo oncogénico” (BR-VPH) (SCHIFFMAN M y col, 2009; BOUVARD V y col, 2009; BERNARD HU, 2010).

1.2.2. Estructura del virus

El VPH es un virus de pequeño tamaño, mide aproximadamente 55 nm. Las partículas virales son proteínicas y no encapsuladas, siendo muy estables a condiciones adversas del medio externo. La cápside viral tiene una estructura icosaédrica compuesta por 72 capsómeros y material genético es de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble cadena de 7500 a 8000 pb de longitud, Figura 2.

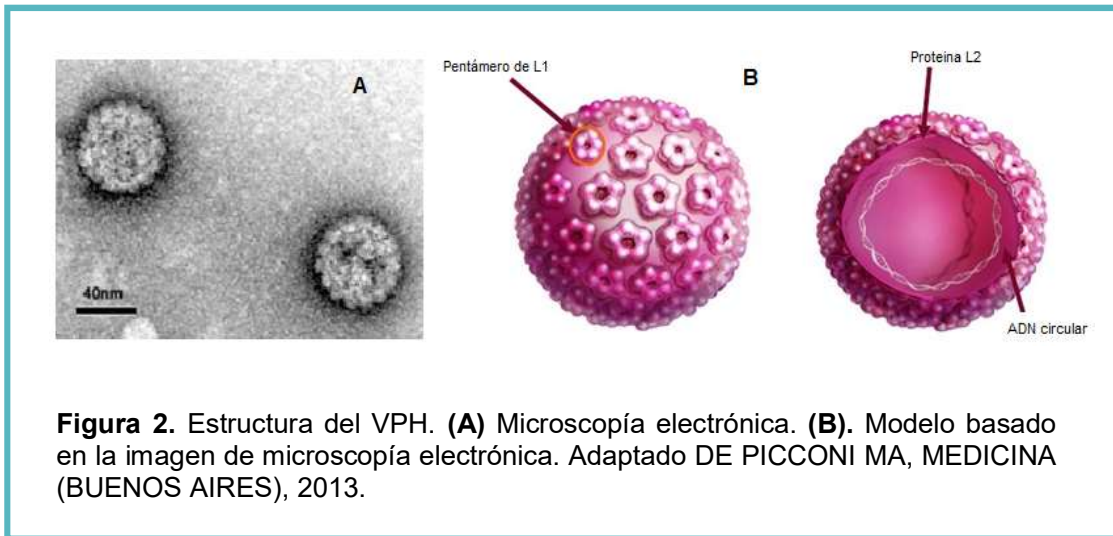
Tabla 1. Clasificación de los VPH según potencial carcinogénico.

Grupo	Tipos virales	Comentarios
1	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59	Carcinogénicos en humanos
2A	68	Probablemente carcinogénico
2B	26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85 y 97	Posiblemente carcinogénicos
3	6, 11	No carcinogénicos en humanos

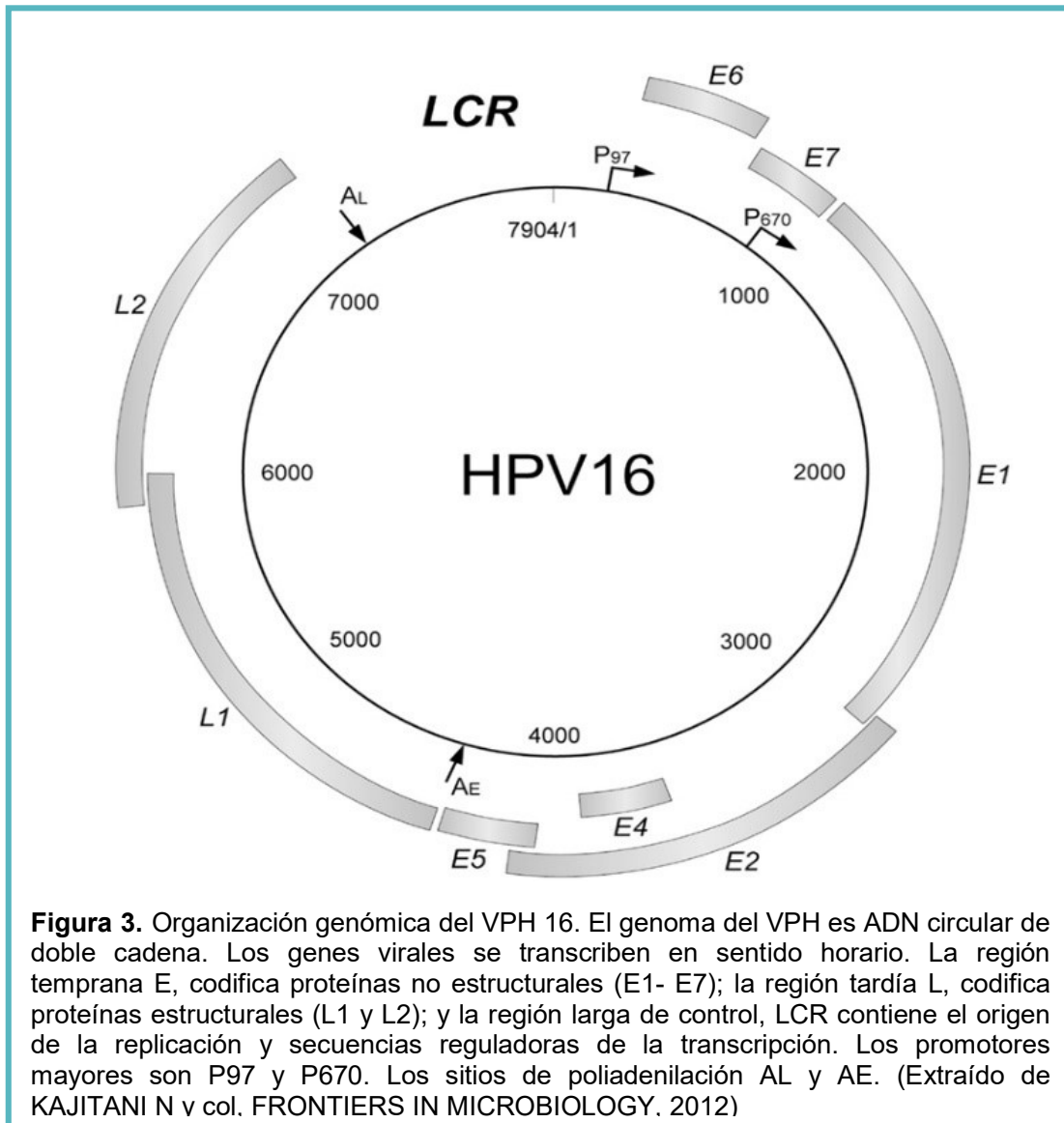
Adaptado de: BOUVARD V Y COL. WHO INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER MONOGRAPH WORKING GROUP A REVIEW OF HUMAN CARCINOGENS – PART B: BIOLOGICALS AGENTS. LANCET ONCOL, 2009.

1.2.3. Organización genómica

Una característica común en la organización genómica de los virus papiloma es que poseen entre nueve a diez marcos de lectura abiertos (ORFs, de sus siglas en inglés *Open Reading Frames*), localizados en una de las hebras del ADN que se van expresando secuencialmente. En la Figura 3 se representa el genoma del VPH-16, posee nueve diferentes ORFs y puede ser dividido en tres regiones:



- a) La **región temprana** (E, del inglés *Early*) contiene ocho ORFs para los genes tempranos que codifican para proteínas no estructurales (enzimas) involucradas en la regulación de las funciones virales.
- b) La **región tardía** (L, del inglés *Late*), tiene dos ORFs para los genes de proteínas estructurales de la cápside, por lo tanto, esenciales para la replicación viral productiva.
- c) La **región larga de control** (LCR, del inglés *Long Control Region*) o región de control río arriba (URR, de inglés *Upstream Regulatory Region*), contiene elementos necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y el ensamblaje de las partículas virales. En los VPH-AR, existen dos promotores principales, cuya expresión está regulada por la diferenciación celular. El promotor temprano controla la expresión en células no diferenciadas y dirige la iniciación de la transcripción viral corriente arriba del marco del ORF para E6, generándose transcritos policistrónicos para las proteínas E6, E7, E1, E2, E4 y E5. Este promotor se llama P97 en VPH-31 y es análogo al P97 en VPH-16 y P105 en VPH-18. Es regulado por factores de transcripción que se unen a secuencias de inicio de la LCR (WOOLDRIDGE T y col, 2008).



Con el promotor tardío, se expresan transcritos que codifican las proteínas E1, E4, E5, y las proteínas tardías L1 y L2. Estos transcritos se activan durante la diferenciación, iniciándose en diferentes regiones localizadas alrededor del nucleótido 742 en VPH31 (WOOLDRIDGE T y col, 2008). Se han identificado varios promotores secundarios en las regiones E6/E7 que son activados durante la diferenciación (KAJITANI N y col, 2012).

1.2.3.1. Funciones de las proteínas virales

Las funciones principales de las proteínas del virus se muestran de forma resumida en la Tabla 2.

Tabla 2: Funciones de las proteínas del VPH.

Proteína	Funciones
E1	Replicación del ADN viral y control de la transcripción
E2	Principal regulador de la transcripción de genes virales. Reprime a promotores encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7.
E4	Disrupción de la cito-queratina en células escamosas. Detiene el ciclo celular.
E5	Induce proliferación celular por interacción con receptores de factores de crecimiento. Inhibe la apoptosis y la migración de complejos de CMH a la superficie celular.
E6	Proliferación y transformación celular ligada a p53.
E7	Proliferación y transformación celular, activación de la transcripción, ligada al gen de la pRB (retinoblastoma).
L1	Proteína estructural mayor. Interactúa con receptores celulares.
L2	Proteína estructural menor. Facilita el ensamblaje de viriones.

Adaptado de KAJITANI N y col, FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, 2012.

1.2.3.2. Ciclo de vida

Estos virus poseen tropismo muy definido por células epiteliales escamosas y su ciclo de vida está estrechamente ligado al programa de diferenciación de la célula hospedadora infectada; por lo que la expresión de altos niveles de proteína virales y el

ensamblaje de los viriones ocurre exclusivamente en las capas superiores del epitelio. Este proceso que puede describirse en cinco fases:

a) Infección de la célula hospedadora

Las partículas virales acceden a la capa basal epitelial a través de heridas o abrasiones de piel o mucosas, aunque también se sospecha que pueden acceder a capas basales en la base de un folículo piloso y en particular en la zona de transformación del epitelio cervical que permite la exposición de células basales en activa proliferación. La mayoría de las investigaciones, coinciden en que los VPH se pueden unir al heparán-sulfato de la superficie celular por interacción con extremo carboxi-terminal de la proteína L1 (BOUSARGHIN L y col, 2003 (a); JOYCE JG y col, 1999).

Este proceso de infección celular es notablemente lento, ha sido demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* en células cultivadas, tomando entre 12-24 horas para el inicio de la transcripción. La exposición prolongada de determinantes antigénicos, mientras los viriones se encuentran sobre la membrana basal y superficie de las células, podría explicar en parte, la notable eficacia de las vacunas que inducen anticuerpos neutralizantes contra L1 y el dominio L2 expuesto durante la unión al receptor celular (SCHILLER J y col, 2010).

La internalización del virus se produce por endocitosis, la vía dependiente de catrina es utilizada por los VPH-16 y 18; y la mediada por caveolas, es utilizada por el VPH 31 (KIRCHHAUSEN T, 2000; BOUSARGHIN L y col, 2003 (b)). La cápside viral es degradada en el citoplasma celular, originándose capsómeros y monómeros que son transportados al núcleo con pequeños fragmentos de ADN viral a través de poros nucleares. Con ello, el genoma viral y las proteínas de la cápside participan en procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (MERLE E y col, 1999; NELSON LM y col, 2002).

b) Mantenimiento del genoma

El genoma del virus se establece como elemento extra-cromosómico (episoma) y el número de copias incrementa de 50-100 por célula infectada en los estratos basal y parabasal. El VPH utiliza la maquinaria replicativa de la célula huésped para la replicación y mantenimiento de su genoma.

Durante la división celular, una de las células hijas permanece en el estrato basal del epitelio, mientras que la otra inicia un proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio. El mantenimiento del genoma viral depende de los niveles de expresión de dos proteínas, E1 y E2. Estas se expresan a fin de mantener el ADN viral como un episoma

(WILSON VG y col, 2002) y facilitar la segregación correcta de genomas durante la división celular (YOU J y col, 2004).

c) Fase proliferativa

En el epitelio no infectado, las células basales migran a los estratos supra basales y salen del ciclo celular a fin de alcanzar una diferenciación completa (MADISON KC, 2003). Sin embargo, cuando las células infectadas entran al estatus de diferenciación, salen del ciclo celular e inician un aumento masivo de genes virales (aproximadamente 1000 copias por célula), con abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 y la expresión de genes tardíos, entrando en la etapa productiva del ciclo de vida del VPH (LONGWORTH M y col, 2004).

d) Amplificación genómica

El VPH produce solo las proteínas E1 y E2, que interfieren en la transcripción y la replicación del genoma viral, fuera de ello, es totalmente dependiente de la maquinaria celular. El problema para los virus es que las ADN-polimerasas celulares y los factores de replicación sólo se producen en células con mitosis activa. Es por ello que los virus codifican proteínas que reactivan la síntesis de ADN en células que se hallan fuera del ciclo celular, inhiben la apoptosis y retardan el programa de diferenciación de la célula infectada, creando un ambiente permisivo para la replicación del ADN viral (WENTZENSEN N y col, 2004).

Los oncogenes virales E6/E7 poseen funciones complementarias para la replicación viral, E7 promueve la replicación del ADN y el crecimiento celular; mientras que E6 inhibe la apoptosis, prolongando la supervivencia de las células.

e) Síntesis y liberación de partículas virales

El PV codifica dos proteínas estructurales que se expresan en las capas superiores del tejido infectado cuando la amplificación del genoma se ha completado (OZBUN MA y col, 1998). Las proteínas estructurales L2 y L1 se producen en células con mayor expresión de E4, permitiendo el ensamblaje de la cápside viral y empaquetamiento del genoma en las capas superiores del epitelio (DOORBAR J y col, 1997). El ensamblaje de los viriones tiene lugar en el núcleo, liberándose cuando se descaman las células muertas del epitelio del hospedador y continuando así el ciclo de vida del virus. Estos virus no producen lisis celular y son liberados al exterior cuando las células infectadas alcanzan la superficie del epitelio. La Figura 4 esquematiza el ciclo de vida del VPH, mostrando los eventos que fueron descritos en este apartado.

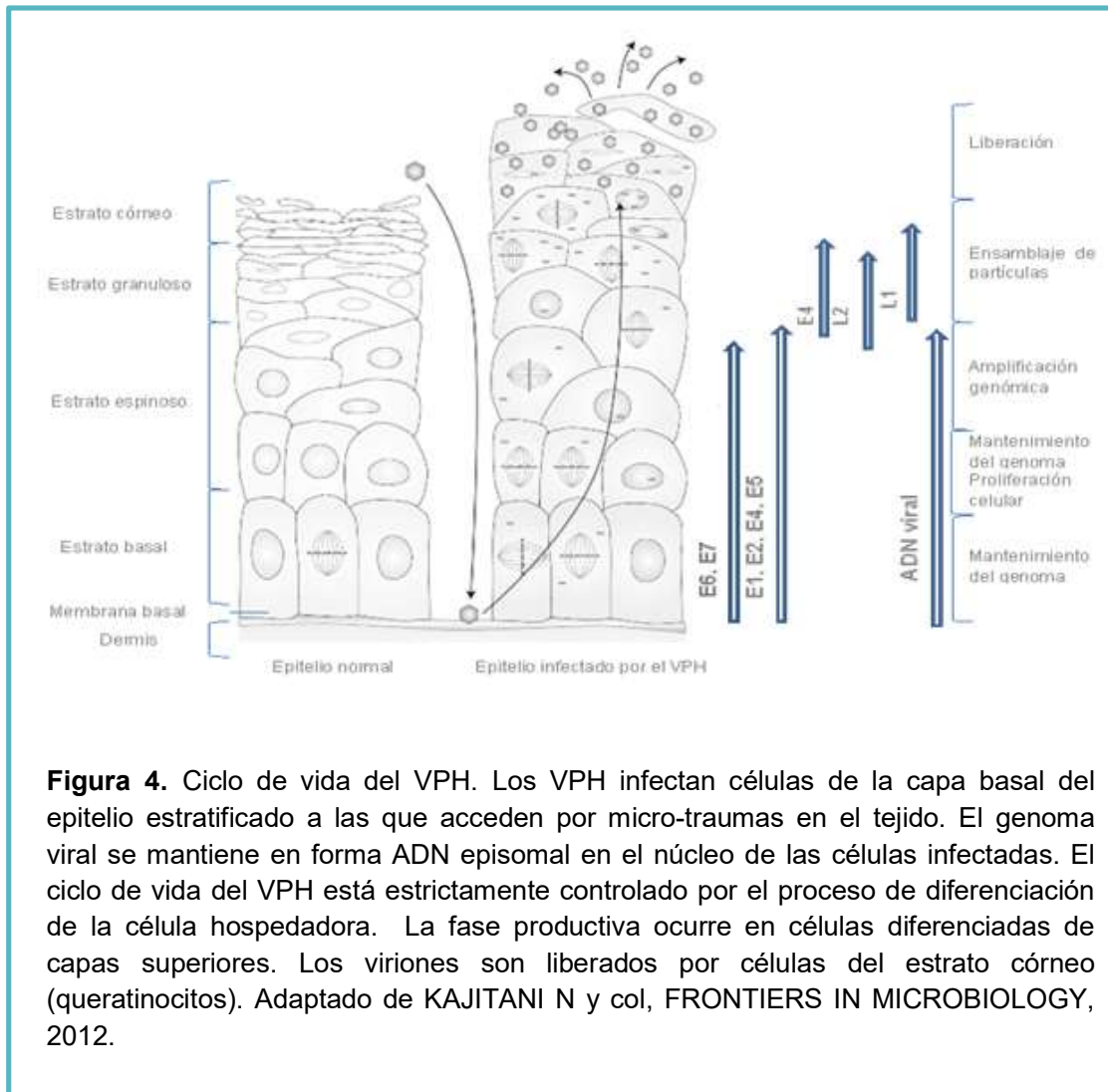


Figura 4. Ciclo de vida del VPH. Los VPH infectan células de la capa basal del epitelio estratificado a las que acceden por micro-traumas en el tejido. El genoma viral se mantiene en forma ADN episomal en el núcleo de las células infectadas. El ciclo de vida del VPH está estrictamente controlado por el proceso de diferenciación de la célula hospedadora. La fase productiva ocurre en células diferenciadas de capas superiores. Los viriones son liberados por células del estrato córneo (queratinocitos). Adaptado de KAJITANI N y col, FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, 2012.

1.2.3.3. Integración del genoma viral y expresión de oncoproteínas virales

La integración del genoma viral al genoma celular es considerada un evento clave en la carcinogénesis mediada por el VPH. Si bien la integración viral en los cromosomas es al azar, se ha identificado próxima a los denominados “sitios frágiles” (THORLAND E y col, 2003). En el genoma viral es más específica, la integración interrumpe la región E1/E2, llevando a la pérdida del gen de E2, que además de su función reguladora de la transcripción de genes tempranos, es también represor de la transcripción de los genes de E6 y E7. La pérdida de E2 lleva a la sobreexpresión de los genes transformantes E6 y E7 (DOORBAR J, 2006; HEBNER CM y col, 2006).

Se han descrito una compleja gama de interacciones entre productos de los oncogenes virales E6 y E7 con proteínas de la célula hospedadora (ZUR HAUSEN H, 2000(a)). Las mejor caracterizadas se producen con las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB (retinoblastoma), moléculas fundamentales en el control del ciclo celular.

El principal papel de la proteína E7 consiste en alterar el control del ciclo celular normal. Su expresión está asociada al aumento de la síntesis de ADN celular y de la proliferación celular; lo que resultan de su interacción con pRB. La E7 se une a pRB y promueve su degradación mediada por ubiquitina, lo que resulta en la activación del factor de transcripción E2F. El factor E2F activa la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de ADN; es decir, se produce la transición de la fase G1 a S del ciclo celular mediado por la pRB. En condiciones normales, la fase S no programada conduciría a la apoptosis mediada por p53; sin embargo, en las células infectadas por VPH, este proceso se bloquea por la proteína viral E6. Además, la degradación de la pRB también suprime otras de sus funciones, como la reparación del ADN y el mantenimiento de la integridad genómica (MÜNGER K y col, 2004).

La proteína E7 también altera el control del ciclo celular por su interacción con otras proteínas como desacetilasas de histonas, ciclinas e inhibidores de ciclinas dependientes de cinasas (CDK) como p21 (JONES DL y col, 1997) y p27 (ZERFASS-THOME K y col, 1996). Dado que estas proteínas son reguladores críticos de la detención del ciclo celular durante la diferenciación de los queratinocitos, su inhibición por E7 también pueden contribuir al mantenimiento de un medio celular competente para la replicación del genoma viral en células diferenciadas de capas superiores (CHENG S y col, 1995).

La proteína E6 es expresada tempranamente durante una infección por VPH, lo que le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, entre ellas inhibir el proceso de apoptosis, alterar la expresión de genes celulares e incrementar el tiempo de vida de la célula.

El blanco más conocido de E6 es la proteína supresora de tumores p53 y utiliza varios mecanismos para interferir con sus funciones. La proteína E6 se une a p53 a través de la proteína ligasa E6-AP (E6-Associated Protein) lo que conduce a la ubiquitinización de p53 y a su degradación en proteasomas (HUIBREGTSE JM y col, 1993). Por lo tanto, las células que expresan la proteína E6 mantienen niveles bajos de p53 y no responden cuando el ADN celular sufre algún daño, favoreciendo la acumulación de mutaciones en el genoma.

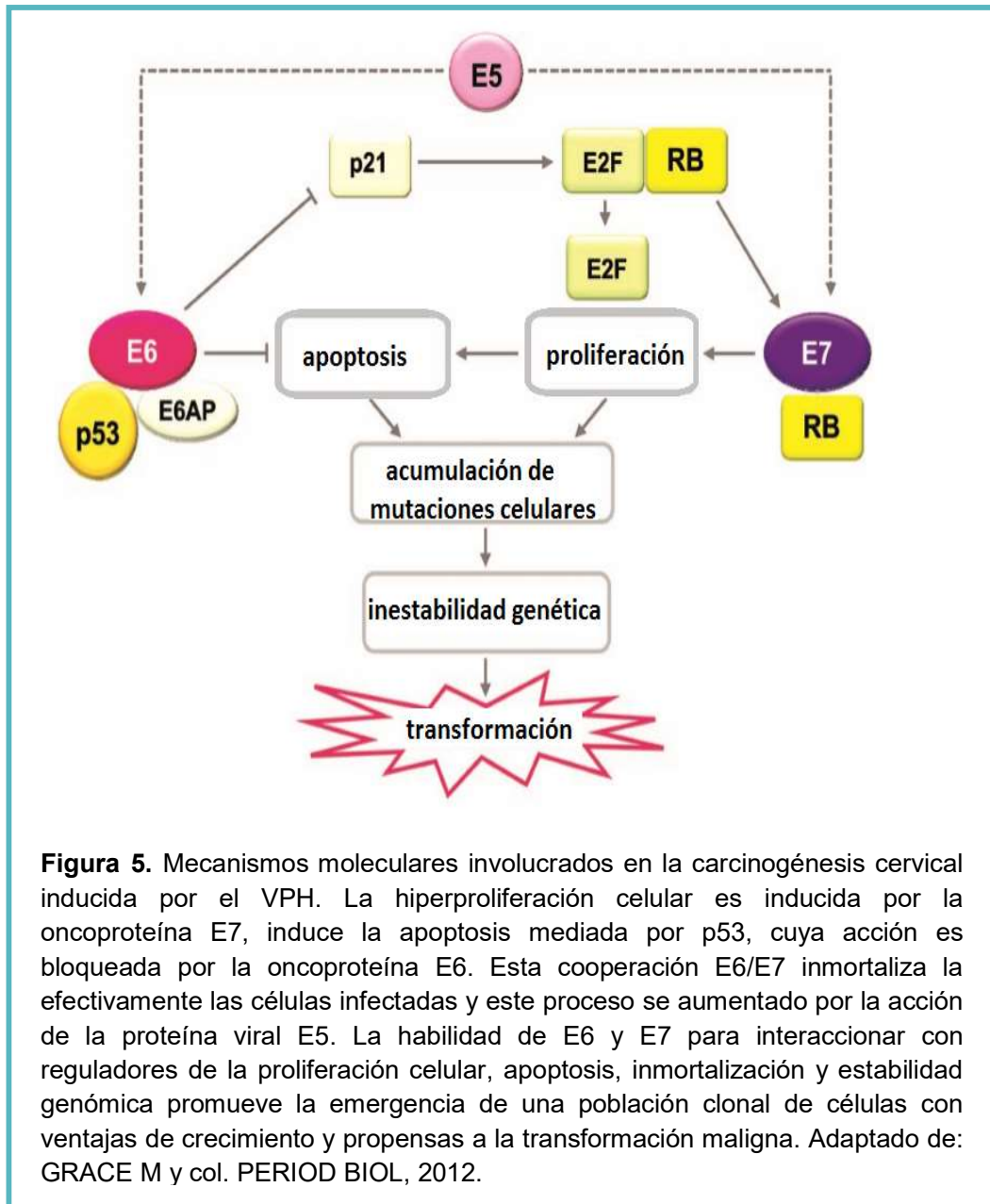


Figura 5. Mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis cervical inducida por el VPH. La hiperproliferación celular es inducida por la oncoproteína E7, induce la apoptosis mediada por p53, cuya acción es bloqueada por la oncoproteína E6. Esta cooperación E6/E7 inmortaliza las células infectadas y este proceso se ve aumentado por la acción de la proteína viral E5. La habilidad de E6 y E7 para interactuar con reguladores de la proliferación celular, apoptosis, inmortalización y estabilidad genómica promueve la emergencia de una población clonal de células con ventajas de crecimiento y propensas a la transformación maligna. Adaptado de: GRACE M y col. PERIOD BIOL, 2012.

. Por otro lado, E6 es capaz de inducir la expresión de la telomerasa hTERT (OH ST y col, 2001), enzima frecuentemente activa en procesos neoplásicos, importante para la replicación de secuencias de ADN en los extremos de los cromosomas (telómeros) que aportan estabilidad a los cromosomas eucarióticos. En células normales la telomerasa está inactiva, los telómeros se acortan en sucesivos pasajes, llevando a la inestabilidad genética, lo que detiene el crecimiento y progresan hacia la senescencia o la muerte celular (CONG YS y col, 2002). La combinación de la reactivación de la actividad de

hTERT con la inactivación de pRB, ha sido propuesta como el paso esencial en el proceso de immortalización celular (KIYONO T y col, 1998).

Aunque E6 y E7 proporcionan las actividades de transformación primaria de los virus VPH-AR, la proteína E5 puede aumentar sus funciones y contribuir a la progresión del tumor (DI MAIO D y col, 2001). Se ha observado que E5 regula la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como el del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Los queratinocitos que expresan E5 incrementan la producción de EGFR, explicando el papel de E5 en proliferación celular (LEECHANACHAI P y col, 1992). Se ha encontrado también que E5 se une a la ATPasa vacuolar inhibiendo la maduración de los endosomas (STRAIGHT SW y col, 1995) y que E5 reduce los niveles en la superficie celular de proteínas del CMH de Clase I (ASHARAFI GH y col, 2006), lo que podría afectar la presentación antigénica y así disminuir el reconocimiento inmune del virus.

1.2.3.4. Respuesta inmune a la infección por VPH

La duración prolongada de la infección por VPH parece estar asociada con los mecanismos de evasión del virus hacia la inmunidad innata. De hecho, son virus muy poco inmunógenos debido a varias características estructurales y fisiológicas, tales como: es un virus ADN sin ARN intermedio; en la primera fase de la infección el VPH no produce nucleoproteínas que sean presentadas por las células infectadas; la mayoría de proteínas VPH son expresadas a muy bajo nivel en el epitelio basal que constituye la zona más accesible al sistema inmune del huésped; sólo infecta células epiteliales sin inducir lisis celular que es el mayor activador de la inmunidad innata o adaptativa; y la presentación antigénica sistémica es limitada (STANLEY M. 2006).

A pesar de los esfuerzos del virus para evadir las defensas del hospedador, la mayoría de las infecciones por VPH se resuelven con el tiempo. Las verrugas anogenitales y las L-SIL son eliminadas como resultado de una respuesta inmune mediada por células (COLEMAN N y col, 1994) dirigida contra proteínas tempranas del VPH, particularmente E2 y E6 (DE JONG A y col, 2002; WELTERS MJ y col, 2003).

La respuesta inmune celular contra el VPH es seguida de cerca por la seroconversión y la producción de anticuerpos, específicamente hacia la proteína L1 de la cápside viral (CARTER JJ y col, 2000). Los títulos de anticuerpos que siguen a la infección natural por VPH son bajos, y se ha encontrado que para los VPH-6, 11, 16 y 18, los tiempos promedio de seroconversión exceden los seis meses; parece que entre un 30-50 % de individuos con infección genital persistente por VPH nunca adquieren anticuerpos, lo cual puede asociarse a un estado de progresión de la enfermedad (CARTER JJ y col,

2001). En el CCU, la seropositividad para los VPH-AR está generalmente reportada entre 30-50% de las pacientes (JOCHMUS-KUDIELKA I y col, 1989).

Las respuestas frente a proteínas tempranas son variables y podrían estar relacionadas con el estado de la infección. Dado que en las células cancerosas se producen las proteínas E6 y E7 en grandes cantidades, la presencia de anticuerpos contra E6 y E7 se asocia con progresión maligna de la enfermedad y detectan en pacientes con CCU. Estudios que emplearon proteínas recombinantes como antígenos virales, han mostrado que el 50-60% de pacientes con CCU presentan anticuerpos contra E6 y E7 (MESCHEDE W y col, 1998).

1.3. LA INFECCIÓN POR EL VPH

1.3.1. Enfermedades asociadas a la infección por VPH

Son virus epidermotropos, con afinidad por cualquier epitelio escamoso, asociados con un amplio espectro de lesiones proliferativas en piel y mucosas (FAVRE M y col, 1997). Entre las principales lesiones inducidas y/o asociadas al VPH pueden mencionarse las siguientes:

a) Condiloma acuminado. La manifestación morfológica más común de la infección por VPH son las verrugas genitales o condilomas acuminados (condyloma acuminatum); pueden ser únicos o múltiples, visibles a simple vista y se caracterizan por pápulas exofíticas de color variable, blanco, rosa o marrón. Su tamaño es pequeño, aproximadamente 1 mm², aunque pueden fusionarse alcanzando grandes dimensiones en embarazadas o pacientes inmunocomprometidos. Con frecuencia se observan en cuello uterino, vagina, vulva y pene; y ocasionalmente, en escroto, ingle y perineo (AVENDAÑO y col, 2011). Estas lesiones se asocian preferentemente a VPH de tipo 6 y 11, aunque se han detectado otros tipos de bajo riesgo como VPH-42 y 81 (CLIFFORD GM y col, 2005 (a)). En cuello uterino, es común la observación colposcópica de lesiones condilomatosas con papilomatosis menos evidente (condiloma plano), en las que se han identificado varios tipos virales distintos, incluyendo VPH-AR.

El riesgo de malignización de estas lesiones es mínimo. En general son autolimitadas, con alto porcentaje de regresión espontánea o por tratamiento, aunque algunas lesiones pueden persistir durante años, e incluso recurrir tras el tratamiento de las mismas (VON KROGH G, 2001).

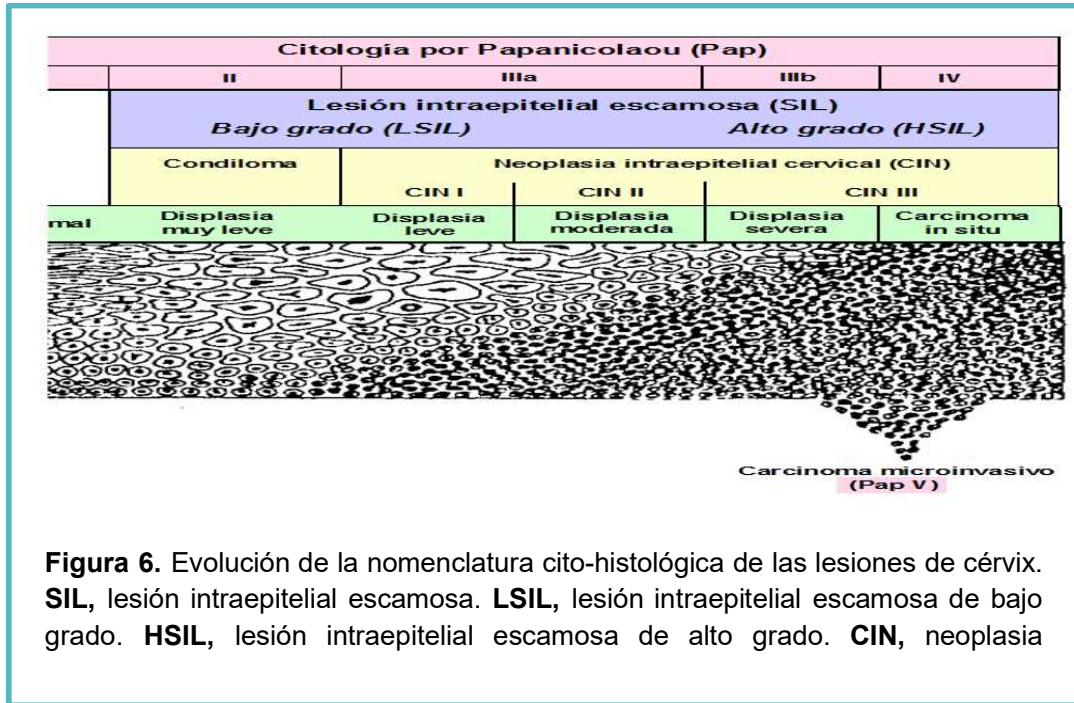
Cuando los condilomas extensos muestran aspectos histológicos de invasión destructiva local sin metástasis, suelen denominarse tumores de Buschke-Lowenstein, carcinomas verrucosos o condilomas gigantes. Se encuentran generalmente en el pene o zona perianal y están asociados usualmente a los tipos 6 y 11 (ARMSTRONG N y col, 2009).

b) Lesiones intraepiteliales. Constituyen en su gran mayoría infecciones subclínicas, cuyo diagnóstico puede llevarse a cabo mediante la citología o biopsia cervical. Incluyen a aquellas lesiones con alteraciones en la proliferación, maduración y diferenciación celular con atipias de distinta jerarquía. La graduación en la clasificación avanza a medida que las alteraciones morfológicas propias del espectro neoplásico se hacen más intensas y comprometen una mayor altura del epitelio. Exceptuando la clasificación Papanicolaou, por ser exclusivamente citológica, la nomenclatura de los hallazgos citológicos ha ido siempre estrechamente ligada a la histológica y existe una clara correlación entre ellas.

En 1949 Papanicolaou introdujo el término “*displasias*” para referirse a cambios epiteliales menos severos que el carcinoma *in situ* (VILOS GA y col, 1998). En 1973, Richart propuso la denominación de “*neoplasia intraepitelial cervical*” (CIN, del inglés *cervical intraepithelial neoplasia*) distinguiéndose tres grados de la severidad de las lesiones: CIN I, CIN II y CIN III (RICHART RM, 1973). En 1988 se impuso el sistema Bethesda, en el que se sustituye el término neoplasia intraepitelial por el de “*lesión intraepitelial escamosa*” (SIL, del inglés *squamous intraepithelial lesion*) y se establecen las categorías: “*lesión intraepitelial escamosa de bajo grado*” (LSIL, del inglés *low grade squamous intraepithelial lesion*) y “*lesión intraepitelial escamosa de alto grado*” (HSIL, del inglés *high grade squamous intraepithelial lesion*). Además, ASC-US (del inglés *atypical squamous cells of undetermined significance*) para referirse a alteraciones indeterminadas que no permiten descartar totalmente la presencia de una lesión intraepitelial pero tampoco son suficientes para diagnosticarla. Este sistema fue modificado y revisado en el 2001 (SOLOMON D y col, 2002). La Figura 6 muestra las equivalencias entre las diferentes clasificaciones.

Las LSIL corresponden a infecciones víricas, en general autolimitadas y muy raramente evolucionan a carcinoma. Incluyen las alteraciones patológicas de coilocitosis y CIN I. Los núcleos celulares se ven aumentados de tamaño, con hipercromasía, cromatina

compactada y contornos nucleares irregulares. No se suelen observar nucléolos. Es común la bi y multinucleación. Además, se observa un halo perinuclear amplio que da a la célula una apariencia de vacío (coilocitosis).



Las HSIL equivalen a verdaderos cambios premalignos generados por infecciones persistentes de VPH-AR no eliminadas por el sistema inmune. Se corresponden con CIN II (displasia moderada) y CIN III (displasia severa y carcinoma *in situ*). Se observan células escamosas parabasales o metaplásicas inmaduras, muestran una relación núcleo/citoplasma elevada debido al agrandamiento nuclear y la disminución del citoplasma. Los núcleos ocupan más del 50% de la célula, son hiper cromáticos con cromatina densa y membranas nucleares irregulares. Se observa anisonucleosis, pero los nucléolos son infrecuentes. El citoplasma es cianofílico.

c) Cáncer de cuello uterino. El carcinoma invasor es el estadio más avanzado cuando las células neoplásicas invaden el estroma mediante la ruptura de la membrana basal; se subclasifica de acuerdo al grado de invasión y la distribución y el compromiso neoplásico de los vasos subepiteliales. La mayoría de los CCU se desarrollan en la zona de transformación, en la cual hay una transición del epitelio escamoso estratificado del ectocérvix al epitelio cilíndrico glandular del canal endocervical. El 80-90% de los CCU son carcinomas de células escamosas y sólo el 10-20% son adenocarcinomas (CUBIE HA y col, 2013).

d) Neoplasias extracervicales. Los VPH también se vinculan con el desarrollo de neoplasias en otras localizaciones anatómicas. Meta-análisis recientes reportan que el 40,4% de los carcinomas de vulva y el 69,9% de los carcinomas de vagina son debidos al VPH. También se ha detectado el VPH en el 84,3% de los casos de cáncer anal en ambos sexos (DE VUYST H y col, 2009) y en el 22% de los casos de cáncer de cabeza y cuello (DAYYANI F y col, 2010). El 50% de los casos de cáncer de pene se ha atribuido a VPH-16 y 18, específicamente (MIRALLES-GURI C y col, 2009). Sin embargo, la incidencia de todos los cánceres extracervicales asociados al VPH es de sólo el 12% del total de los cánceres asociados a este virus. (KOUTSKY L, 1997).

1.3.2. Historia natural de la infección por VPH y el CCU

Las principales fases implicadas en el desarrollo del CCU son: la transmisión e infección por tipos carcinogénicos de VPH, establecimiento de la persistencia viral, la progresión a lesiones pre-neoplásicas y finalmente, el desarrollo de cáncer invasor (WOODMAN C BJ y col, 2007). También puede ocurrir la eliminación viral y, en menor frecuencia, la regresión de las lesiones pre-neoplásicas a la normalidad. En la Figura 7 se esquematiza el modelo causal actualmente aceptado, basado en evidencias epidemiológicas y laboratoriales.

El VPH es la infección de transmisión sexual más frecuente. Se sabe que su prevalencia en varones y mujeres jóvenes sexualmente activos es muy elevada, más del 70% tendrán contacto con el virus en algún momento de la vida. La infección por VPH frecuentemente aparece después de la iniciación sexual (CASTLE PE y col, 2005). Para la transmisión e infección por VPH debe haber contacto piel a piel, piel a mucosa o mucosa a mucosa. La probabilidad de infección durante el acto sexual es alta. Durante el acto sexual no es necesaria la penetración para la transmisión del virus. Una infección por VPH originada en el introito puede ser transferida al cuello uterino (BURCHELL AN y col, 2006).

En la mayoría de los casos, las infecciones son asintomáticas y transitorias. Un tercio de las mujeres VPH positivas, desarrollan anomalías citológicas como ASC-US o LSIL que pueden ser detectadas en una prueba de Papanicolaou (KOVACIC MB y col, 2006). Estas anomalías citológicas leves representan el efecto citopático causado por la replicación viral activa y en general, tienen una fuerte tendencia a la regresión y una muy baja a la progresión (MOSCICKI AB y col, 2004; CASTLE PE y col, 2005).

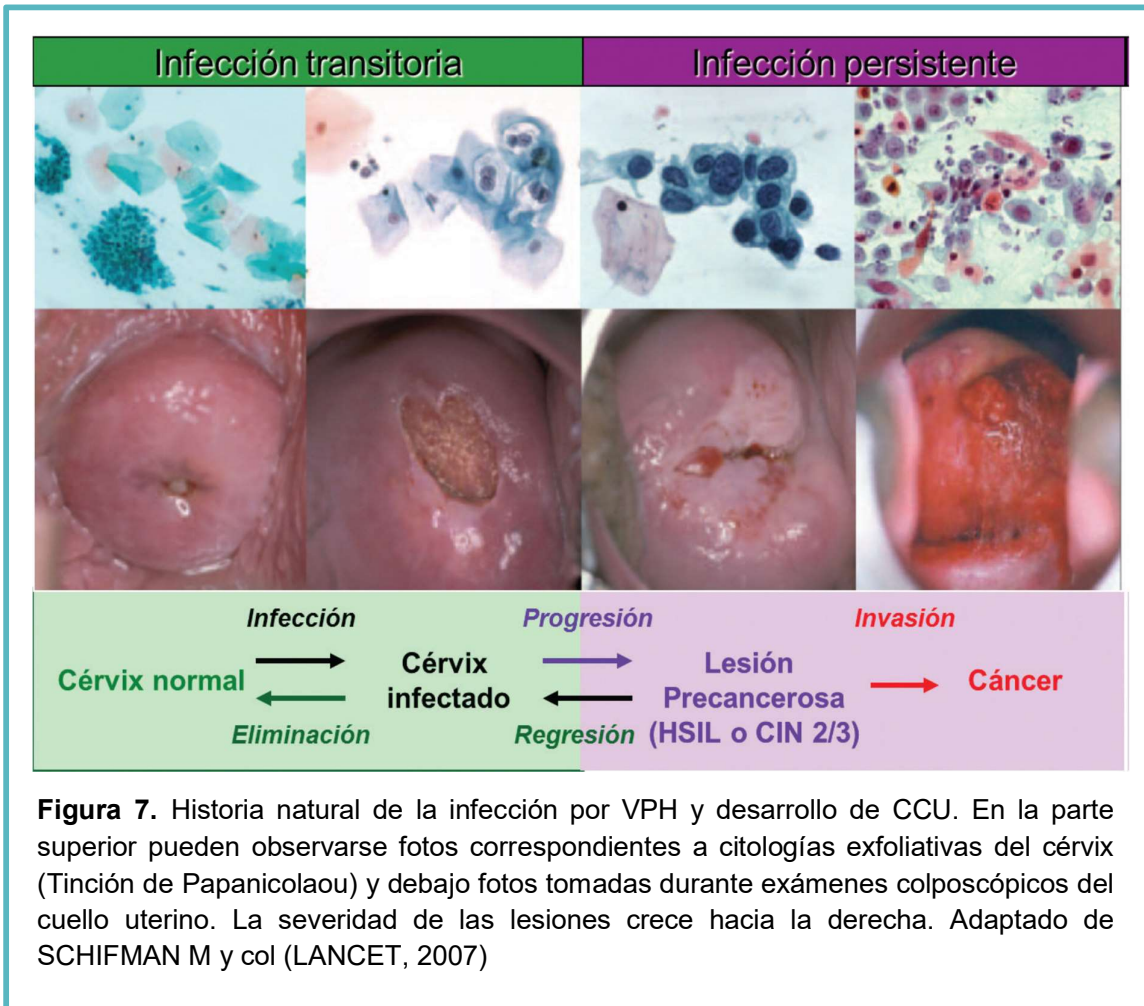


Figura 7. Historia natural de la infección por VPH y desarrollo de CCU. En la parte superior pueden observarse fotos correspondientes a citologías exfoliativas del cérvix (Tinción de Papanicolaou) y debajo fotos tomadas durante exámenes colposcópicos del cuello uterino. La severidad de las lesiones crece hacia la derecha. Adaptado de SCHIFMAN M y col (LANCET, 2007)

Se estima que el 70% de las infecciones se resuelven espontáneamente al año y más del 90% a los dos años, como resultado de la inmunidad mediada por células (VELDHUIJZEN N y col, 2010). Sin embargo, en algunas mujeres se observa una infección persistente por VPH-AR, asociada al desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y su avance a carcinoma cervical invasivo (CCI), proceso que puede tomar de 1-10 años (KOSHIOL J y col, 2008).

Se entiende como persistente una infección por VPH cuando es posible detectar el mismo tipo viral en dos o más ocasiones en un periodo de 1-2 años (HO GY y col, 1998; WOODMAN CB y col, 2001; RICHARDSON H y col, 2003). Las infecciones por tipos del VPH-AR parecen persistir durante más tiempo que las producidas por VPH-AR. Entre los tipos de alto riesgo, existe suficiente evidencia que el VPH-16 puede persistir durante más tiempo que los otros tipos (TROTTIER H y col, 2006).

Las infecciones por VPH-AR persistentes generan alteraciones citológicas englobadas en las LSIL o CIN I. En menor proporción, estas lesiones pueden progresar a HSIL o CIN II/CIN III y a CCI. En una revisión de la infección por el VPH se muestra que las lesiones CIN I remiten en el 60% casos, persisten en el 30%, progresan a CIN III en el 10% y al CCI en el 1%. (OSTÖR AG, 1993).

El ASCUS y las L-SIL son lesiones mayormente producidas por infecciones transitorias de VPH-BR y VPH-AR, sin predominio marcado de uno u otro tipo en particular. Las H-SIL son generadas por infecciones persistentes de tipos de VPH-AR que no pudieron ser controlados por el sistema inmune, y tienen riesgo de progresar a carcinoma in situ y cáncer invasor. Las fases del desarrollo de la enfermedad han sido bien establecidas; sin embargo, aunque muchas mujeres contraen infección por el VPH, la mayoría de éstas no progresan a CCU. Por lo tanto, es probable que otros cofactores intervengan en la patogénesis de la infección.

1.3.3. Factores asociados al CCU

La IARC ha establecido que existen evidencias suficientes para considerar que los VPH-AR, particularmente los tipos 16 y 18, son carcinogénicos en humanos, afirmación sustentada en hallazgos epidemiológicos y experimentales. Sin embargo, debido a que la infección por VPH oncogénicos es una condición necesaria pero no una causa suficiente de CCU, se ha supuesto que otros factores, en conjunción con el VPH, modulan el riesgo de transición de la infección cervical por VPH cervical a la malignidad (WALBOOMERS JM y col, 1999; BOSCH FX y col, 2002; MUÑOZ N y col, 2006).

1.3.3.1. Factores relacionados con el virus

El genotipo viral es el factor de riesgo más importante de persistencia viral y de progresión hacia una lesión preneoplásica, siendo los VPH-16 y 18 los que presentan mayor riesgo de progresar (BOSCH FX y col, 2002) y son los más frecuentemente encontrados en HSIL y CCU (CLIFFORD GM y col, 2003; CIAPPONI A y col, 2011). Ciertas variantes del VPH-16 y de VPH-18 pueden relacionarse con mayor riesgo de infección persistente, de HSIL, y de CCU (MOLANO M y col, 2007; XI LF y col, 2007).

1.3.3.2. Factores relacionados con la infección por VPH

Estos están relacionados con el comportamiento sexual, como la edad de inicio de las relaciones sexuales, el alto número de parejas sexuales o el contacto sexual con individuos de alto riesgo (CASTELLSAGUE X y col, 2008).

La adquisición de la infección por VPH comienza con el inicio de las relaciones sexuales. El inicio temprano de las relaciones implica la aparición de múltiples compañeros sexuales, con el consiguiente riesgo dado por este hecho. El riesgo de lesión intraepitelial cuando el primer coito se tiene a los 17 años o menos es 2,4 veces mayor que cuando este se tiene a los 21 años (BOSCH X y col, 1995). Mecanismos biológicos, entre ellos la inmadurez del cuello uterino, la producción inadecuada de moco cervical protectorio y el aumento de la ectopia cervical, pueden hacer que adolescentes y mujeres más jóvenes sean más susceptibles a infección por VPH (BURCHELL A y col, 2006).

Existe una relación directamente proporcional entre el riesgo de lesión intraepitelial y el número de parejas sexuales. Resultados del proyecto Guanacaste mostraron un aumento de la frecuencia de detección de VPH, y en particular de VPH-16, con el aumento del número de parejas sexuales (HERRERO R y col, 2005).

1.3.3.3. Co-Factores relacionados al desarrollo del CCU

Tabaquismo. El efecto del tabaco en la infección por VPH y el desarrollo del CCU ha sido controvertido. Sin embargo, actualmente, el hábito de fumar ha sido asociado de manera independiente al riesgo aumentado de desarrollar CCU (MUÑOZ N y col, 2006; PLUMMER M y col, 2003). Un estudio reciente realizado a nivel mundial encontró que el consumo de tabaco estaba asociado significativamente a un riesgo mayor al desarrollo del carcinoma de células escamosas (RR: 1.50) pero no al adenocarcinoma (RR: 0,86) comparado con mujeres no fumadoras (BERAL V y col, 2007). Se ha documentado también que existe relación entre la disminución del tamaño y gravedad de las lesiones intraepiteliales y la reducción o abandono del hábito de fumar (SZAREWSKI A y col, 1996). El tabaco tiene un efecto carcinogénico directo y además tiene un efecto inmunosupresor local en el cuello uterino, contribuyendo a la persistencia de la infección (THUN MJ y col, 2000).

Uso de anticonceptivos hormonales. La asociación del CCU con el uso prolongado de anticonceptivos hormonales sigue siendo motivo de discusión. Diversos estudios epidemiológicos y biomédicos, que se iniciaron hace más de 15 años, apoyan la hipótesis de las hormonas esteroides como facilitadoras de la replicación y persistencia del VPH-AR (BERTRAM C y col, 2004; McFARLNAE N y col, 2008). Un reciente meta-análisis evaluó la asociación entre el desarrollo del CCU y uso de anticonceptivos orales (ACO), duración del uso y número de años posteriores a la suspensión de su uso. Se observó que entre las que consumían ACO, el riesgo de CCU aumentaba con la duración del uso (cinco o más años) comparado con las nunca lo utilizaron. Se vio, además, que el riesgo

declinaba una vez que las mujeres dejaban de consumir y que después de diez años el riesgo era similar a las que nunca lo habían utilizado (BERAL V y col, 2007).

Co-infección con otras agentes de transmisión sexual. Se ha demostrado alguna asociación del CCU con agentes como *Chlamydia trachomatis* (CT) y el virus de *Herpes simplex 2* (VHS-2). Es posible que el riesgo aumentado de cáncer relacionado a infecciones previas con CT o VHS-2 se deba a la respuesta inflamatoria generada por estos agentes, asociada a la generación de radicales libres y el desarrollo de inestabilidad genética (CASTLE PE y col, 2003).

Multiparidad. Se ha encontrado relación directa entre el elevado número de embarazos a término y el riesgo de CCU (CASTELLSAGUE X y col, 2003). Mujeres con siete o más embarazos a término presentan mayor riesgo de desarrollar CCU que aquellas con uno o dos. Además, la edad temprana del primer embarazo (17 vs 25 años) también está asociada a mayor riesgo de HSIL, carcinoma *in situ* e invasor. (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER, 2006).

1.3.3.4. Factores relacionados con la inmunología del hospedador

Se demostró asociación entre persistencia viral y respuesta disminuida a estimulación de linfocitos en mayores de 45 años, sugiriendo la posibilidad de alteraciones inmunológicas como explicación del segundo pico de prevalencia (GARCIA-PIÑERES A J y col, 2006).

Se ha demostrado que los polimorfismos del complejo mayor de histocompatibilidad HLA (del inglés, *Human Leukocyte Antigen*) podrían influenciar el curso de la historia natural de una infección por VPH, pudiendo ser uno de los determinantes de la regresión, persistencia o progresión de las lesiones cervicales. Datos publicados sugieren que ciertos haplotipos de HLA se encuentran más frecuentemente en pacientes con lesiones severas por lo que se consideran “predisponentes”, mientras que otros detectados en mujeres infectadas que no desarrollaron lesiones serían haplotipos “protectivos” (HEMMINKI K y col, 1999; EIGUCHI K y col, 2008; STANLEY M y col, 2009).

Se ha encontrado que en mujeres VIH positivas el riesgo de infección por VPH-AR y BR sería de entre 1,8 - 2,7 veces superior que en mujeres inmunocompetentes (AHDIEH L y col, 2001). Así también, se sabe que la respuesta inmune es el principal mecanismo de resistencia contra el desarrollo lesiones preneoplásicas y su progresión a cáncer, por lo que mujeres con inmunosupresión secundaria por VIH o trasplantadas con tratamiento

inmunosupresor, tienen mayor riesgo de desarrollar carcinomas anogenitales asociados a VPH (PALEFSKY JM y col, 2003).

1.4. EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCION POR VPH Y DEL CCU

La infección genital por el VPH constituye una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes. La prevalencia de ADN de VPH en mujeres con citología normal a nivel mundial es aproximadamente del 10% (CLIFFORD GM, 2005 (b)). Las frecuencias más altas se encontraron en África y América Latina (20-30%), y la menor en el sur de Europa y el sudeste asiático (6-7%). Además, se estima que hasta un 80% de las mujeres padecen la infección activa por VPH en algún momento de su vida (BOSCH X y col, 2008).

La prevalencia es máxima en mujeres jóvenes alrededor de 25 años y disminuye en grupos de mediana edad. En numerosos estudios, se ha observado un aumento de la prevalencia en el grupo de mujeres de 45-50 años, a excepción de Asia (CASTELLSAGUÉ X y col, 2007; DE SANJOSE S y col, 2007).

Los tipos de VPH más frecuentes en la población con citología normal son el VPH-16, en el 25,5% de las mujeres diagnosticadas, seguido del tipo VPH-18 (7,5%) y el VPH-31 (6,1%) (BOSCH X y col, 2007). En las LSIL están implicados tipos heterogéneos de VPH-AR y BR, el más frecuente es VPH-16, seguido por VPH-31, 51 y 53 (CLIFFORD GM y col, 2005). En las HSIL, el espectro de tipos virales es más restringido, con predominio de VPH-AR, en especial VPH-16 y VPH-18 (CLIFFORD GM y col, 2003).

El CCU es el tercer tipo de cáncer más común que afecta a las mujeres en el mundo y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en países en vías de desarrollo (GLOBOCAN, 2012). El 80-90% de los CCU son carcinomas de células escamosas y sólo el 10-20% son adenocarcinomas (CUBIE HA y col, 2013). Un estudio de la IARC mostró que más del 70% de los casos de CCI están asociados a los VPH-16 y 18 y otros relacionados filogenéticamente como el VPH-31, 35 y 52; mientras que los adenocarcinomas se asocian más con el VPH-18 y tipos relacionados como VPH-39, 45 y 59 (LI N y col, 2010).

A nivel mundial se estiman más de 528.000 casos nuevos y 266.000 muertes al año. La tasa de incidencia estandarizada por edad en América del Sur es 24,1 por 100.000 mujeres y en Paraguay la incidencia es muy superior a las observadas en otros países vecinos, siendo la tasa de incidencia 34,2 por 100.000 mujeres y la tasa de mortalidad es de 15,7 por 100.000 (GLOBOCAN, 2012).

1.5. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VPH

Las lesiones intraepiteliales escamosas del cuello del útero constituyen las precursoras del CCU, por lo que su detección precoz es sumamente importante en la terapéutica y pronóstico de las pacientes. El diagnóstico de las mismas puede ser realizado mediante varios tipos de exámenes, entre ellos destacamos:

1.5.1. Examen citológico e histopatológico

La citología exfoliativa constituye un método de detección de laboratorio, mientras que la colposcopia es un método de detección clínico; cada uno de ellos trata de aspectos diferentes de la lesión, en tanto que la colposcopia estima principalmente los cambios producidos en la trama vascular terminal de cérvix, que reflejan a su vez los cambios bioquímicos y metabólicos del tejido uterino. El manejo de la enfermedad requiere de un examen citológico adecuado y un examen colposcópico certero, con su confirmación histológica.

1.5.1.1. Citología

La citología mediante la tinción de Papanicolaou puede detectar alteraciones celulares indicativas de una infección por el VPH, pero debe tenerse en cuenta que no es un método diagnóstico sino de cribado de lesiones preneoplásicas.

Esta prueba detecta cambios inflamatorios, infecciosos o la presencia de células anormales y neoplásicas. El cambio citopático característico de la infección por HPV es la coilocitosis. Los coilocitos se encuentran en las capas superficiales e intermedias de la lesión y poseen un halo claro perinuclear. Los bordes de la célula están bien delimitados y acentuados por un material eosinófilo de condensación citoplásmica. El núcleo tiene un aspecto irregular, arrugado, siendo frecuente la binucleación, multinucleación, hiperchromasia y picnosis (FU YS y col, 1989). La prueba se desarrolla en células obtenidas de un raspado de la pared cervical, que son posteriormente colocadas en una laminilla, fijadas, teñidas y estudiadas al microscopio.

La citología convencional presenta algunos inconvenientes como: el proceso manual de extensión de las células en el portaobjeto hace imposible la estandarización, las células se distribuyen de manera desigual, hay superposiciones difíciles de interpretar debido a presencia de moco cervical, sangre o células inflamatorias.

La citología líquida, es una técnica alternativa en la que se transfiere todo el material celular a un medio fijador a base de etanol o metanol. Los disponibles son el ThinPrep (Cytic, Boxborough, MA) y el SurePath (Tripath Imaging, Burlington, NC), ambos sistemas han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration of EEUU) para el cribado primario. Con esta metodología se reducen los extendidos insatisfactorios, se incrementa la sensibilidad en la detección de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado y aparece la posibilidad de realizar pruebas complementarias como la detección del ADN del VPH (CAMPO P y col, 2011).

1.5.1.2. Colposcopia

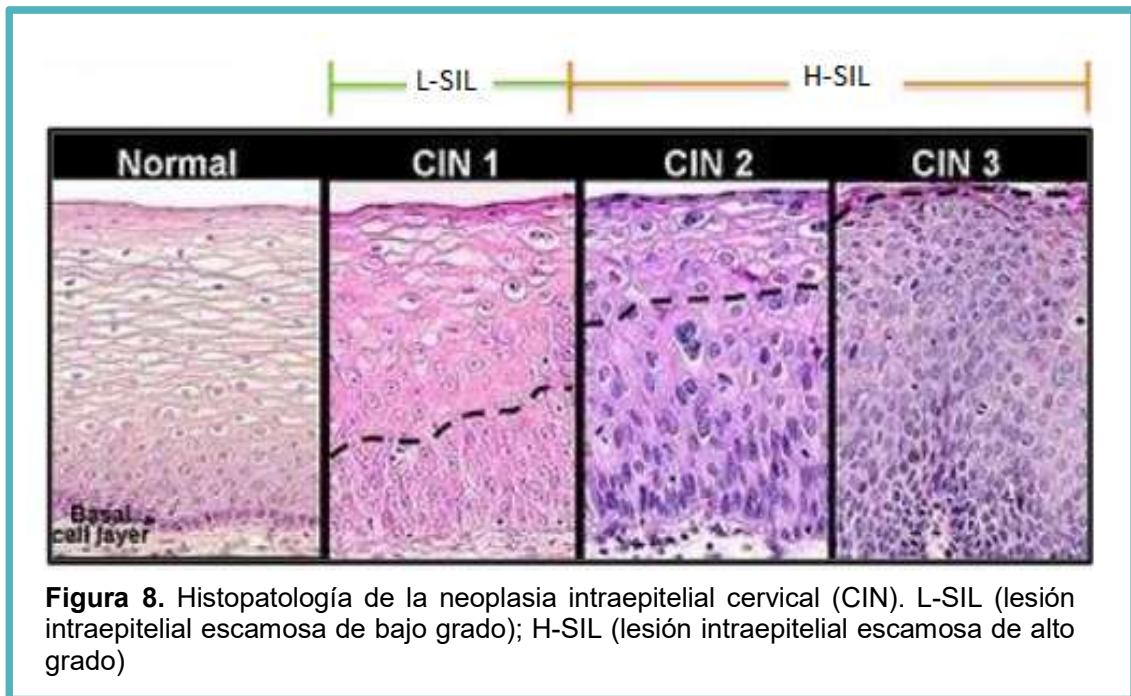
Consiste en un examen visual de la vagina y el cérvix, empleando un colposcopio. La colposcopia detecta las lesiones subclínicas como epitelios blancos, de morfología y extensión variables, que aparecen tras la aplicación de ácido acético al 5%. Ante cualquier evidencia clínica o sospecha citológica de infección por VPH o lesión intraepitelial en la mujer, debe hacerse un examen colposcópico de todo el tracto genital inferior.

La exploración colposcópica del área genital externa no es específica de la infección por el VPH y condiciona, con frecuencia, la observación de falsos positivos. Cualquier proceso de carácter inflamatorio que suceda en esta zona (candidiasis, lesiones eccematosas, etc.) puede ocasionar blanqueamientos por captación del ácido acético y confundir el diagnóstico. En cambio, es altamente sensible en el diagnóstico de las lesiones subclínicas vaginales y cervicales, aunque tiene una especificidad algo menor, al expresarse de igual forma ciertos epitelios anormales, acantósicos y parahiperqueratósicos; por lo que todo epitelio acetoblanco en estas localizaciones debe ser siempre biopsiado (MANUAL NACIONAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTO PARA LA PREVENCIÓN Y EL CONTROL DEL CÁNCER DE CUELLO UTERINO, 2010).

1.5.1.3. Histopatología

La presencia de coilocitos es indicador clave de infección por VPH; sin embargo, el grado de avance de la lesión debe ser determinado por un estudio histopatológico. El diagnóstico histopatológico se logra al estudiar al microscopio fragmentos de tejido cervical obtenidos a partir de una biopsia. Este estudio permite diferenciar los estratos del epitelio cervical, detectando así el nivel de infiltración de las células infectadas, así como áreas de invasión. El diagnóstico histopatológico es la prueba de oro para la detección y estadificación de las lesiones cervicales inducidas por VPH.

Las lesiones cervicales por el VPH pueden estar asociadas con displasia epitelial leve, moderada o severa; según los criterios de Richart se clasifican en CIN de grado I, II o III. Actualmente, se utiliza la terminología Bethesda (SOLOMON D y col, 2002) en el diagnóstico histológico, pero siempre acompañado del grado de Richart (RICHART RM, 1973). Los criterios utilizados son similares a los de la citología, pero una vez establecido el diagnóstico de CIN, la graduación de la lesión se realiza según la gravedad de la alteración madurativa, afectando al tercio inferior en los CIN I y todo el epitelio en los CIN III, como se presenta en la Figura 8.



1.5.2. Diagnóstico molecular

El diagnóstico de la infección por VPH estaba basado fundamentalmente en la evaluación morfológica de efectos citopáticos causados por el virus en muestras de citología cérvico-vaginal y de biopsias cervicales hasta el desarrollo de las técnicas de detección de ácidos nucleicos.

La detección de VPH representa actualmente es un valioso componente de las guías clínicas para el tamizaje, manejo y tratamiento del CCU y sus lesiones precursoras. Está disponible numerosas pruebas comerciales en una amplia variedad de formatos que pueden ser divididas en tres grupos según detecten: el ADN de VPH-AR, sin ninguna genotipificación individual; el ADN de los VPH-AR con genotipificación parcial tipos de alto riesgo clínicamente más importantes; y, el ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 de los

VPH-AR (PICCONI MA, 2013). Más recientemente se han desarrollado pruebas que detectan la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 en el epitelio cervical con el empleo de anticuerpos monoclonales (CUZICK J y col, 2012).

1.5.2.1. Ensayos que detectan ADN de VPH-AR

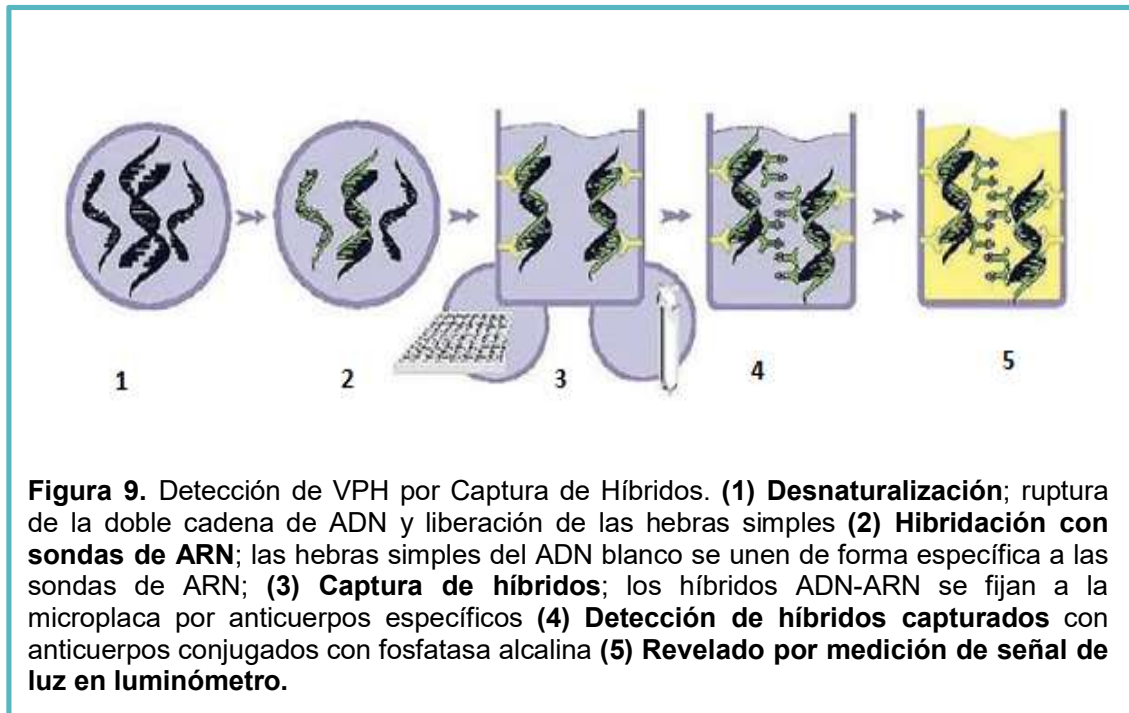
Constituyen un grupo de ensayos cualitativos y semicuantitativos que detectan en conjunto tipos virales considerados oncogénicos, empleando varias tecnologías, no permitiendo la distinción de un tipo o más tipos virales de manera individual. El uso de estas pruebas ha sido aceptado en el triaje de mujeres con citología ambigua o indeterminada; en el seguimiento post-tratamiento de neoplasias intraepiteliales de alto grado (CIN II o más); y, en el tamizaje primario (ARBYN M y col, 2006; CUZICK J y col, 2008; POLJAK M y col, 2010).

En este grupo, el método más utilizado se basa en un ensayo de captura de híbridos, el ***Digene Hybrid Capture 2 HPV DNA TEST (HC2)***, que fue desarrollado por Digene Corporation (Gaithersburg, MD, EEUU) y actualmente es comercializado por Qiagen (MD, EEUU). Es un método de amplificación de la señal, basado en la hibridación en solución del ADN de interés a sondas de ARN, el proceso se esquematiza en la Figura 9. Es posible la detección de 13 tipos de VPH-AR (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 tipos de VPH-BR (VPH-6, 11, 42, 43 y 44) y además de determinar si la muestra es positiva o negativa, permite una semicuantificación.

Este método posee múltiples ventajas como la reproducibilidad y la automatización, pero también algunas limitaciones, entre las que cabe destacar: (i) no permite la identificación de los tipos; (ii) se han descrito hibridaciones cruzadas entre las dos mezclas de sondas y con tipos no incluidos en las mismas; (iii) sensibilidad inferior a la de la PCR.

Con respecto a la reactividad cruzada de la sonda de VPH-AR observada en la HC2, con otros tipos de VPH no incluidos en ella, pero que representan riesgo de para el CCU, podría ser considerada una ventaja; sin embargo, reacciones cruzadas con VPH-BR dan falsos positivos y disminuye la especificidad de la prueba (CASTLE PE y col, 2002).

Una versión simplificada de la tecnología de HC2, es el ***CareHPV Test*** (QIAGEN; MD, EEUU): es un ensayo relativamente rápido, sencillo y accesible, puede ser usado en lugares con muy limitada infraestructura y el paciente puede contar con los resultados durante la misma visita.



A nivel mundial existen otros ensayos comerciales que han sido validados clínicamente, tales **Cervista HPV HP Test** (Hologic, EEUU) usa dos tipos de reacciones isotérmicas, una que se produce en la secuencia de ADN blanco y la otra que genera la señal fluorescente, detecta 12 tipos de VPH-AR (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), sin identificar individualmente los virus, introduce un control interno para validar la caldiad del ADN en la muestra, reduciendo falsos negativos y una menor reactividad cruzada con genotipos de bajo riesgo; y **EIA kit HPV GP HR** (Diassay, Holanda) permite detectar los VPH-AR (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), mediante una PCR con cebadores genéricos (GP5+/6+) y revelado por lectura de densidad óptica 29, 45. Es el segundo método más evaluado en ensayos clínicos, luego de HC2 (PICCONI MA, 2013).

1.5.2.2. Ensayos que detectan ADN de VPH-AR con genotipificación de los tipos más importantes

Constituyen el grupo de ensayos más recientes que permiten la detección de los genotipos de alto riesgo más frecuentes con la identificación individual de VPH-16 y 18; están basados en resultados de estudios clínicos que demostraron el potencial oncogénico notablemente superior de los tipos 16 y 18 comparados con otros VPH-AR y evidenciaron que la capacidad de distinguir estos dos tipos virales permiten identificar mujeres con

riesgo aumentado de desarrollar CIN III que precisan un control más intensivo en relación a las pacientes infectadas con otros VPH-AR (KHAN MJ y col, 2005).

Entre ellos cabe mencionar: **Cobas 4800 HPV Test** (Roche Molecular Systems Inc., EEUU) será descrita en detalle en el apartado de materiales y métodos por ser la metodología de cribado utilizada en este trabajo; **Cervista HPV 16/18 Test** (Hologic, EEUU), aprobada por la FDA en 2009, puede aplicarse como complemento de la técnica de Cervista HPV HR para mujeres que resultaron positivas; **Abbott RealTime High Risk HPV test** (Abbott Molecular, EEUU) se basa en una reacción de PCR en tiempo real que permite la detección conjunta de 14 tipos, 12 VPH-AR (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), más dos VPHpAR 66 y 68, con la genotipificación individual de VPH-16 y 18, de manera simultánea, se encuentra en evaluación para su aprobación en la FDA.

1.5.2.3. Ensayos que detectan ARNm de oncoproteínas E6 y E7 de VPH-AR

Existen diversas estrategias metodológicas para la detección de los ARNm de los VPH-AR, casi todas tienen como blanco a los transcritos de las oncoproteínas virales E6 y E7. A diferencia de las pruebas de detección de ADN que solo brindan información acerca de la presencia de la infección y eventualmente del tipo viral, la detección de los ARNm de E6 y E7 permite identificar los genotipos de VPH más frecuentes en el CCU y además es indicativa de la expresión de dichas proteínas virales, las cuales han sido directamente asociadas a la transformación maligna. Esto brinda al ensayo un mayor valor predictivo positivo que las pruebas de ADN en cuanto a la actividad carcinogénica viral (PICCONI MA, 2013). Varios estudios recientes han mostrado que estas pruebas pueden ser de utilidad clínica por su mayor especificidad para la detección de enfermedad cervical (CUSCHIERI K y col, 2008; BURGER EA y col, 2011).

En este grupo cabe mencionar al ensayo **APTIMA® HPV Assay** (Gen-Probe Inc., EEUU) único ensayo aprobado por la FDA, permite la detección de ARNm de los 12 tipos de VPH-AR según IARC-2009, más VPH 66 y 68, no discrimina ninguno de ellos. Está aprobada para el tamizaje en mujeres a partir de los 30 años, en combinación con la citología y se han realizado ensayos clínicos basados en esta indicación (MONSONEGO J y col, 2011; MONSONEGO J y col, 2012). Además, un reciente meta análisis mostró que para triaje, la prueba es igual de sensible, pero más específica que HC2 en la detección de lesiones precancerosas cervicales (RIJKAART DC y col, 2012).

También se pueden citar otras dos variantes comerciales de este mismo tipo de ensayo: **PreTect HPV-Proofer** (NorChip, Noruega) y **NucliSens EasyQ® HPV V1 test** (Biomérieux, Francia); involucran una reacción de PCR en tiempo real isotérmica y permite

la detección de los transcritos ARNm correspondientes a las oncoproteínas virales E6/E7 de los 5 tipos de VPH-AR más frecuentes en cáncer cervical a nivel mundial: VPH-16, 18, 31, 33 y 45.

Varios trabajos han indicado que estos sistemas presentan menor sensibilidad clínica que las pruebas basadas en ADN para la detección de lesiones de grado CIN II o mayor, pero tienen una especificidad clínica significativamente mayor (BURGER EA y col, 2011; BOULET GA y col, 2010; HOVLAND S y col, 2010). Se ha sugerido que la menor sensibilidad podría deberse, al menos en parte, a que detecta solo 5 tipos de VPH-AR (POLJAK M y col, 2012; BOULET GA y col, 2010).

1.6. UTILIDAD DE LAS PRUEBAS MOLECULARES DE DETECCIÓN DEL VPH

La selección del método se debe realizar teniendo en cuenta los objetivos que se persigan, ya sea para investigación epidemiológica o bien para uso clínico, en la patología cervical. Para realizar la mejor elección se deben distinguir dos conceptos importantes: **sensibilidad analítica**, que se refiere a la capacidad de los métodos para detectar cualquier infección independientemente de la presencia de lesiones, éstos son útiles para la detección altamente sensible y la genotipificación del VPH y son cruciales en la vigilancia del virus, permitiendo evaluar el impacto de la vacuna sobre la prevalencia de los tipos virales incluidos en la misma, identificación de posibles protecciones cruzadas o discriminación de infecciones múltiples; y la **sensibilidad clínica** que se refiere a métodos que detectan la presencia del VPH asociado a una enfermedad relevante y son las recomendadas para el diagnóstico y manejo clínico de la patología cervical (PICCONI MA, 2013).

1.6.1. Uso clínico

En la práctica clínica existen indicaciones consensuadas para el uso de estas pruebas en el diagnóstico y es importante que hayan sido validadas para tal fin. Dichas pruebas son de utilidad para:

- a) En casos de ASC-US; entidad con cambios atípicos en las células escamosas de cuello uterino en que resulta importante su esclarecimiento debido a que puede asociarse a una citología normal o a una lesión precancerosa.
- b) El seguimiento de mujeres con resultados citológicos anormales que resultaron negativas para colposcopia/biopsia, la detección del VPH puede identificar mujeres con mayor riesgo de desarrollar lesiones graves.

- c) Control post tratamiento de lesiones severas (H-SIL). Las mujeres sometidas a tratamiento por ablación o conización deben ser monitoreadas después del tratamiento. Datos actuales aseguran que las pruebas moleculares detectan enfermedad residual o recurrencia más rápidamente y con mayor sensibilidad que el seguimiento citológico.
- d) Tamizaje primario en mujeres a partir de los 30 años, para detectar lesiones precursoras de CCU, estas pruebas presentan numerosas ventajas frente al tamizaje citológico. Son pruebas sensibles, altamente reproducibles, objetivas y particularmente su rasgo más importante es su elevado valor predictivo negativo, que permite confiar con un alto grado de seguridad que la mujer no tiene VPH ni ninguna enfermedad asociada al mismo, permitiendo de esta manera ampliar el intervalo de tamizaje espaciando los controles al menos 5 años (PICCONI MA, 2013).

1.6.2. Aplicaciones en epidemiología y vigilancia virológica

Tanto para la investigación epidemiológica como para la vigilancia laboratorial, se requieren técnicas de suficiente sensibilidad y capacidad de discernimiento entre relativamente pequeñas diferencias de secuencias genómicas para lograr la identificación individual de los VPH.

Actualmente existen variados sistemas de genotipificación, comerciales y artesanales. Los primeros son costosos, lo que ha limitado mucho su uso; por otro lado, los sistemas artesanales exigen una rigurosa estandarización que permita conocer la sensibilidad con que se trabaja y establecer una adecuada reproducibilidad que asegure la calidad de los resultados obtenidos.

Estas técnicas debidamente validadas para el fin analítico, son de vital importancia también para evaluar el impacto de la vacunación a través de la vigilancia virológica y para la continuidad en los estudios de prevalencia de genotipos en las distintas poblaciones. Se recomienda que los laboratorios que hagan estos estudios cuenten con manuales de procedimientos y con la certificación internacional establecida por los controles de calidad de la Red Global de Laboratorios de HPV (WHO HPV LabNet) perteneciente a la OMS. Estos se basan en paneles con muestras que contienen infecciones simples y múltiples, con variado número de copias (5-500 copias), que abarcan alrededor de 40 tipos virales que infectan las mucosas (PICCONI MA, 2013).

1.7. PREVENCIÓN

El CCU es un problema de salud pública cuya incidencia puede ser disminuida con el desarrollo de sistemas o programas enfocados en dos aspectos: la prevención primaria con la aplicación de vacunas profilácticas y la prevención secundaria con la detección temprana de lesiones precursoras y cáncer.

1.7.1. Prevención primaria

Actualmente están disponibles dos vacunas para la profilaxis de las infecciones por VPH: una vacuna bivalente con proteínas antigénicas no infecciosas de VPH-16 y VPH-18 (Cervarix) y otra vacuna tetravalente, con cuatro proteínas antigénicas de VPH-16, VPH-18, VPH-11 y VPH-6 (Gardasil).

Resultados de ensayos clínicos desarrollados a nivel mundial demuestran que ambas vacunas ofrecen una eficacia cercana al 100% para la prevención de lesiones relacionadas al VPH-16 y 18 en mujeres no expuestas previamente al virus (SCHILLER JT y col, 2008; JOURA EA y col, 2007); una buena persistencia de anticuerpos durante siete años y un aceptable perfil de seguridad (GIULIANO AR y col, 2007; REISINGER KS y col, 2007).

Según las fichas técnicas, ambas vacunas están indicadas a partir de los 9 años para la prevención de lesiones genitales premalignas (cervicales, vulvares y vaginales) y CCU causados por ciertos tipos oncogénicos. La vacuna tetravalente presenta en su composición proteínas antigénicas de VPH-6 y VPH-11, por lo que previenen también las verrugas genitales.

Se han demostrado diferentes grados de protección cruzada para otros tipos de VPH oncogénicos no incluidos en las vacunas, lo que permite obtener una eficacia protectora global frente a lesiones preneoplásicas por VPH superior a la esperada. En base a estos hallazgos, en la ficha técnica de la vacuna bivalente aparece la indicación frente a los tipos 31, 33 y 45, y en la tetravalente la indicación incluye al tipo 31 (MALAGÓN T y col, 2012).

Las vacunas frente al HPV son preventivas, no son terapéuticas ni están indicadas para el tratamiento del CCU, ni displasias cervicales, vaginales, vulvares ni verrugas genitales.

En estudios de inmunogenicidad de estas vacunas, es consistente la observación de un mayor pico de anticuerpos en el séptimo mes del inicio de la vacunación

(REISINGER KS y col, 2007) seguido de un descenso paulatino de los niveles de anticuerpos que se estabiliza a los 24 meses y se mantienen constantes hasta el mes 60 (JOURA EA y col, 2008). Sin embargo, la duración de la protección no ha sido totalmente establecida, ni el momento ni la necesidad de dosis de recuerdo.

La aplicación en los varones es posible; se están realizando estudios de eficacia en los hombres. Un estudio que aplicó modelos matemáticos a registros posteriores a la introducción de la vacuna tetravalente en Europa, mostró que la vacunación en ambos sexos está asociada a un marcado beneficio en la reducción de la incidencia de cáncer relacionados al VPH y verrugas genitales (MARTY R y col, 2013).

Se han desarrollado nuevas generaciones de vacunas polivalentes contra VPH, que incluye protección contra nueve genotipos. Proporcionan protección adicional contra los VPH-31, 33, 45, 52 y 58, que están asociados a aproximadamente 20% de los CCU y no estaban cubiertos por las otras dos vacunas disponibles.

En Paraguay durante el año 2013, por recomendación del Comité Técnico Asesor de Inmunizaciones, se introdujo la vacuna tetravalente contra el VPH (Gardasil) y su aplicación está indicada a la cohorte de niñas de 10 años. Cada niña debe recibir en total tres dosis de la vacuna, siguiendo el esquema de aplicación 0, 1 y 6 meses.

En el marco de una infección inmunoprevenible, la OMS ha iniciado una Red Global de Laboratorios de HPV (WHO HPV LabNet) para armonizar a los laboratorios de virología a nivel mundial a fin de organizar una efectiva vigilancia virológica. Así se podrá diagramar una correcta política de implementación y tener herramientas para evaluar el impacto de la vacunación, incluyendo, entre otras cosas, la confirmación de la protección cruzada con otros genotipos no incluidos en la fórmula vacunal y el esclarecimiento del posible reemplazo de los genotipos de alto riesgo ahora más frecuentes, por otros tipos de alto riesgo de menor prevalencia no prevenibles por la vacunación (EKLUND C y col, 2012).

1.7.2. Prevención secundaria

Según estudios de la OMS, el tamizaje sigue siendo una herramienta esencial en la prevención del CCU. Las vacunas ofrecen un enfoque nuevo y prometedor para la prevención del CCU y otras patologías asociadas al VPH, pero no sustituyen el cribado rutinario del cuello de útero, ya que ninguna de las vacunas es efectiva al 100%, no proporciona protección frente a todos los tipos de VPH o frente a infecciones por VPH ya existentes; y además ha de tenerse en cuenta que existe una mayoría de mujeres adultas que no han sido beneficiadas por la inmunización.

En la mayoría de los países desarrollados el uso de la citología, aplicada en programas organizados de detección, ha logrado disminuir el porcentaje de muertes por CCU (ARBYN M y col, 2009; SASIENI P y col, 1999; HAKAMA M y col, 1988). Este no ha sido el caso de Latinoamérica, donde a pesar de la disponibilidad de la prueba de PAP, alrededor de 32.000 mujeres mueren cada año por esta neoplasia (FERLAY J y col, 2010). Esto podría deberse principalmente a la baja sensibilidad de la prueba, a la baja cobertura y al elevado porcentaje de mujeres con anomalías citológicas que no son evaluadas y/o tratadas adecuadamente (ALMONTE M y col, 2010).

En consecuencia, desde hace unos años, se ha venido evaluando pruebas de tamizaje alternativas como la detección del ADN del VPH y la inspección visual tras la aplicación de ácido acético (IVAA). Además, se han estado planteando estrategias que combinan diversas pruebas con esquemas de diagnóstico y tratamiento de lesiones detectadas que puedan hacerse en una o dos visitas al servicio de salud, asegurando así una mayor adherencia y costo-efectividad de los programas de tamizaje (ALMONTE M, 2010).

En Paraguay, el Programa Nacional de Prevención, Detección Precoz y Tratamiento del Cáncer de Cuello Uterino y Mama del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSP y BS), basado en estadísticas actualizadas, establece como prioridad el tamizaje de mujeres entre 25 y 49 años, sin excluir las mujeres de otras edades. El método de tamizaje para la detección precoz del CCU, sigue siendo la citología cervical o PAP.

Esta prueba puede ser realizada en cualquier establecimiento de salud dependiente del MSP y BS. La lectura de las muestras de PAP se realiza en servicios que cuentan con laboratorios de citodiagnóstico o en el Laboratorio Central de Citodiagnóstico.

El método confirmatorio para el diagnóstico de las lesiones precancerosas cervicouterinas es el examen histopatológico del tejido obtenido en la biopsia guiada por colposcopia. La biopsia del cérvix dirigida por colposcopia es realizada por médicos entrenados en patología cervical. Las mujeres con lesiones que requieren tratamiento son derivadas a centros de referencia especializados que cuentan con técnicas de tratamiento eficaces.

Actualmente, el MSP y BS dispone de pruebas de detección del ADN del VPH, que ha sido introducida en una primera etapa como un proyecto piloto en tres centros de salud de la capital y cuyos resultados de su implementación para el tamizaje primario se discuten en este trabajo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Investigar sobre los aspectos epidemiológicos de la infección genital por el virus papiloma humano (VPH), a través del estudio de los virus circulantes en mujeres de 25 a 64 años que consultan en distintos servicios de Patología Cervical dependientes del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social de Paraguay, de mayo a diciembre de 2013.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar la frecuencia de la infección por VPH y comparar la distribución de los genotipos virales encontrados en los distintos grupos etarios.

2.2.2 Discriminar genotipos posibles en infecciones múltiples.

2.2.3 Estudiar los posibles factores de riesgos asociados a la infección por el VPH en la población en estudio.

2.2.4 Correlacionar los datos virológicos con la información cito-histológica.

3.MATERIALES Y METODOS

3.1. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Este estudio observacional descriptivo de corte transversal, realizado en un contexto asistencial, en Servicios de Patología Cervical de los centros participantes donde acuden normalmente las pacientes para realizarse el PAP (método de tamizaje de rutina en el país) y aquellas pacientes que cumplían con criterios de selección preestablecidos, fueron invitadas a realizarse la prueba de VPH.

3.1.1 Criterios de inclusión

- Sexualmente activas, con edades comprendidas entre 25 y 64 años.
- Con citologías previas normales o ausencia de controles anteriores en el contexto del tamizaje de rutina.
- Que no hayan sido sometidas a histerectomía total.
- Que hayan firmado el consentimiento informado.

3.1.2 Criterios de exclusión

- Menores de 25 años y mayores de 64 años.
- Que tengan resultado anterior de PAP anormal (Clasificación de Bethesda).
- Que hayan recibido la vacuna contra el VPH.
- Que viven con VIH/SIDA o que hayan recibido quimioterapia, radioterapia y/o tratamiento inmunosupresor.
- Embarazadas.

3.2. CENTROS PARTICIPANTES

3.2.1. Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP):

Con la resolución del MSPyBS N° 779/2013 se estableció como Laboratorio de Referencia Nacional para el estudio del VPH al LCSP, en cuyo marco implementó el sistema COBAS 4800 HPV TEST para la detección del DNA del virus del VPH y se inició un proyecto piloto con consultorios ginecológicos de tres servicios de salud de la Capital.

3.2.2. Consultorios de Patología Cervical

Fueron seleccionados tres consultorios externos de ginecología de los Servicios de Patología Cervical: del Hospital Materno-Infantil San Pablo, del Hospital Materno-Infantil de Trinidad y del Centro de Salud N° 10; todos ubicados en la ciudad de Asunción

(Paraguay). En todos ellos, las pacientes acuden de manera ordinaria para el estudio de PAP y son sometidas a un examen ginecológico completo inclusive con colposcopia.

3.2.3. Servicio de Virus Oncogénicos:

Este servicio del Instituto de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” de Buenos Aires Argentina es el Laboratorio de Referencia de la Red Argentina de Laboratorios de VPH. Además, es el Laboratorio de Referencia Regional formando parte de la Red Mundial de Laboratorios de VPH de la Organización Mundial de la Salud (WHO HPV LabNet). Esta red se ha establecido mediante la selección de laboratorios de todo el mundo a fin de apoyar la introducción de las vacunas contra el VPH y la vigilancia de la enfermedad/infección por este virus. Actualmente, esta red cuenta con dos laboratorios de referencias mundiales en Suecia y EE UU y ocho laboratorios de referencias regionales en Australia, Argentina, India, Japón, Sudáfrica, Suiza, Tailandia y Túnez. Esta red fue conformada por una iniciativa de la OMS para estandarización de las metodologías de detección de VPH a fin de lograr resultados internacionales sean comparables y el establecimiento de paneles periódicos de evaluación de la calidad en los laboratorios de VPH.

3.3. MUESTRAS CLÍNICAS

Durante la consulta, se recolectaron células exfoliadas en viales de citología líquida para la detección del ADN del VPH, se preparó el frotis de Papanicolaou y se realizó la colposcopia.

3.3.1. Recolección de células cérvico-vaginales para detección de ADN del VPH

A las pacientes se les solicitaba un periodo de abstinencia sexual de 24 horas y evitar la aplicación de cualquier tipo de óvulo o pomada vaginal en las 72 horas previas a la toma de muestra. Para dicho procedimiento, se siguieron las instrucciones del fabricante (Cobas PCR Cell Collection Media; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Brevemente, las pacientes se colocaron en posición ginecológica, se introdujo el espéculo de Graves, se visualizó el cuello uterino y se procedió a la toma de la muestra de la siguiente forma:

- Se eliminó el exceso de moco del orificio cervical y ectocérvix circundante utilizando un hisopo de algodón y se desechó el hisopo.

- Se insertó un cepillo citológico (citobrush) en el orificio cervical hasta que las cerdas externas más largas del cepillo toquen el ectocérvix (profundidad de 1-1,5 cm), cuidando de no introducirlo totalmente en el canal cervical.
- Se hizo girar el cepillo suavemente unas tres a cuatro veces en sentido antihorario para recolectar las células cérvico-vaginales exfoliadas.
- Finalmente, el cepillo fue sumergido y escurrido dentro del vial que contiene el medio de recolección provisto por el fabricante. Ver Figura 10.



3.3.2. Frotis de Papanicolaou

Luego de la toma de muestra para la detección del ADN del VPH, se preparó el frotis de Papanicolaou. Para ello, se toma de forma rutinaria material de 3 sitios diferentes (paredes vaginales, exocérvix, endocérvix) y se depositan en un mismo portaobjetos, de la siguiente manera:

- Con un extremo de la espátula de Ayre se tomó una primera muestra las paredes laterales de la vagina en toda su extensión (los tres tercios) y el material recogido se colocó en un extremo de la lámina portaobjetos, dejando resbalar la espátula en un solo trazo en forma vertical, cuidando que la capa sea lo más uniforme posible.
- Con el otro lado de la espátula se procedió a tomar la muestra exocervical raspando en la circunferencia del cuello con énfasis en la zona de transformación o de transición (unión escamo-columnar) y el material obtenido se colocó en la placa portaobjetos por extendido vertical o de rotación, procurando que no quede

la muestra muy gruesa ni muy delgada, pero cuidando de depositar suficiente material en la placa.

- Finalmente, con el citocepillo se tomó la muestra endocervical, introduciéndolo en el canal y rotándolo suavemente. Este material se extiende en el otro extremo de la lámina porta objetos girando el citocepillo sobre la misma, procurando un extendido uniforme.
- Después de obtenido el frotis, la lámina debe se colocó inmediatamente en un frasco de boca ancha que contiene el líquido fijador para su posterior coloración.

3.4. ESTUDIOS VIROLÓGICOS

Todas las muestras fueron procesadas para el estudio de ADN del VPH mediante el sistema Cobas 4800 HPV Test, con la que se detecta individualmente el VPH 16, el VPH 18 y un pool de otros 12 genotipos de VPH-AR. Posteriormente, las positivas para otros VPH-AR fueron procesadas por PCR-RLB, inclusive las que presentaron coinfecciones con VPH-16 o VPH-18. Ver Figura 11.

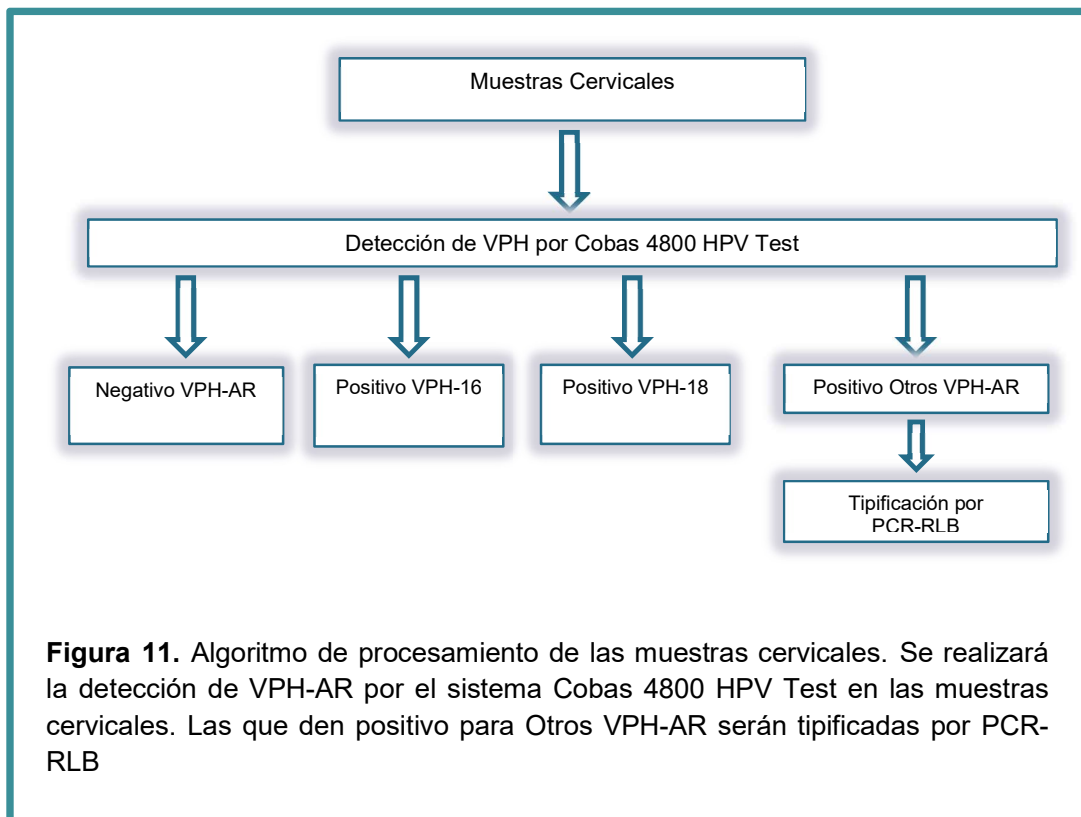
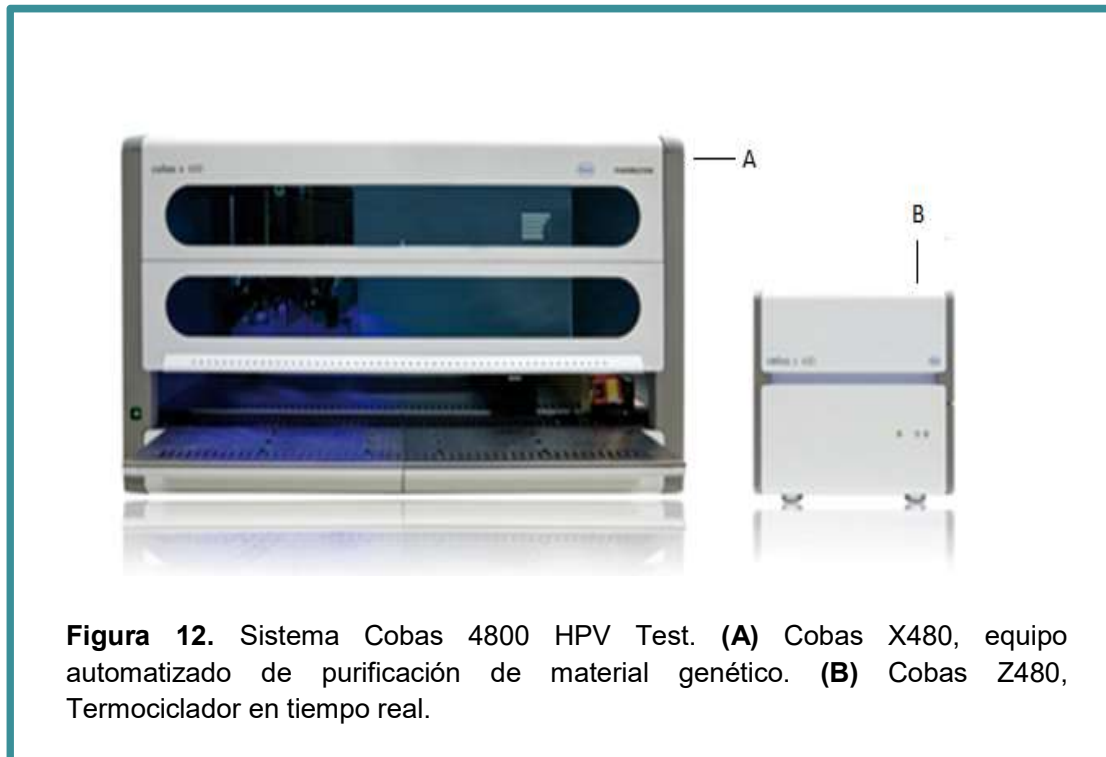


Figura 11. Algoritmo de procesamiento de las muestras cervicales. Se realizará la detección de VPH-AR por el sistema Cobas 4800 HPV Test en las muestras cervicales. Las que den positivo para Otros VPH-AR serán tipificadas por PCR-RLB

3.4.1. Detección del VPH mediante el sistema HPV Cobas 4800.

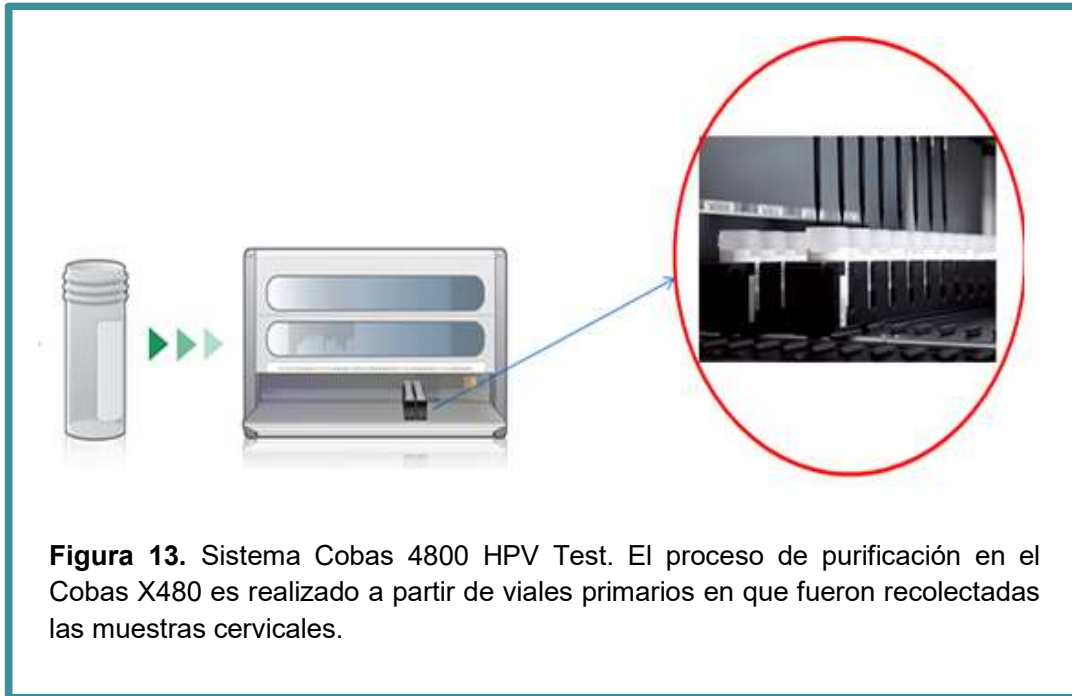
El **Cobas 4800** presenta un formato automatizado, compuesto por el **cobas X 480** para la purificación de ácidos nucleicos; el **cobas Z 480** para la amplificación del material genético viral por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica el fragmento del gen viral L1 y el software para el análisis de los resultados obtenidos, Figura 12.



La extracción del material genético es llevada a cabo en el cobas x 480 a partir de las muestras cervicales recogidas en viales para citología líquida, sin necesidad de ningún tratamiento previo. Tanto el ADN celular y como del VPH, son liberados mediante la lisis de una alícuota de la muestra bajo condiciones desnaturalizantes a elevadas temperaturas en presencia de la proteinasa K, agentes caotrópicos y detergentes. El aislamiento y la purificación de los ácidos nucleicos liberados ocurren mediante partículas magnéticas, seguido de la elución con buffer con bajo contenido de sales. Figura 13.

La reacción de amplificación y la detección ocurre en el cobas Z 480. Este sistema, es una variante mejorada de la PCR convencional que permite un proceso de amplificación génica y detección simultánea del ADN amplificado en “tiempo real”. La secuencia amplificada es un fragmento de 200 pb de la región L1 del VPH, que se logra mediante primers específicos para los 14 genotipos. El monitoreo de la amplificación del

ADN blanco se logra mediante una química que usa sondas fluorescentes TaqMan®, empleando instrumentación especialmente diseñada para la lectura.



De esta manera, los resultados aparecen diferenciados en cuatro canales: otros VPH-AR no 16 y no 18, VPH 16, VPH 18 y beta-globina. La amplificación del gen de la beta-globina constituye un control interno de la calidad de la muestra y de los procesos de extracción y amplificación. La liberación de la sonda durante la amplificación genera un incremento de la fluorescencia, que al ser graficada se presenta como una curva sigmoidea. El fabricante ha desarrollado un algoritmo apropiado para establecer la curva esperada que es utilizada para establecer el ciclo umbral (CT) para la determinación de la presencia de VPH o beta-globina. Figura 14.

Por esta metodología pueden obtenerse las siguientes categorías de resultados: a) positivos para VPH-16; b) positivos para VPH-18; c) positivos para otros virus de alto riesgo (Otros VPH-AR); d) combinación de los anteriores resultados; y e) negativos para la detección de cualquier virus de alto riesgo denominados como VPH-AR negativos.

3.4.2. Tipificación viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers de consenso PGMY09/11 e hibridación reversa en línea (RLB) (PCR-RLB, CHUV)

Sobre las muestras que resultaron positivas para Otros VPH-AR por el sistema COBAS 4800 HPV Test, se realizó la tipificación viral en el Servicio Virus Oncogénicos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”. Esta metodología permite el procesamiento de hasta 43 muestras por vez y la identificación de hasta 33 genotipos diferentes de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57b, 58, 59a, 59b, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 83 y 84) mediante oligosondas tipo-específicas. Este sistema de PCR-RLB, recomendado por la OMS, tiene las ventajas de permitir la identificación de casi la totalidad de los tipos virales que infectan el tracto anogenital y de analizar hasta 40 muestras en un solo ensayo con una sensibilidad analítica de al menos 50 copias (ESTRADE M et al, 2011; UNGER ER y col, 2009). Cabe destacar que esta estrategia metodológica no comercial, ha sido validada por el Servicio Virus Oncogénicos, siendo la eficiencia en la genotipificación respaldada por la correcta resolución de los paneles de control de calidad internacionales, enviados anualmente por la OMS.

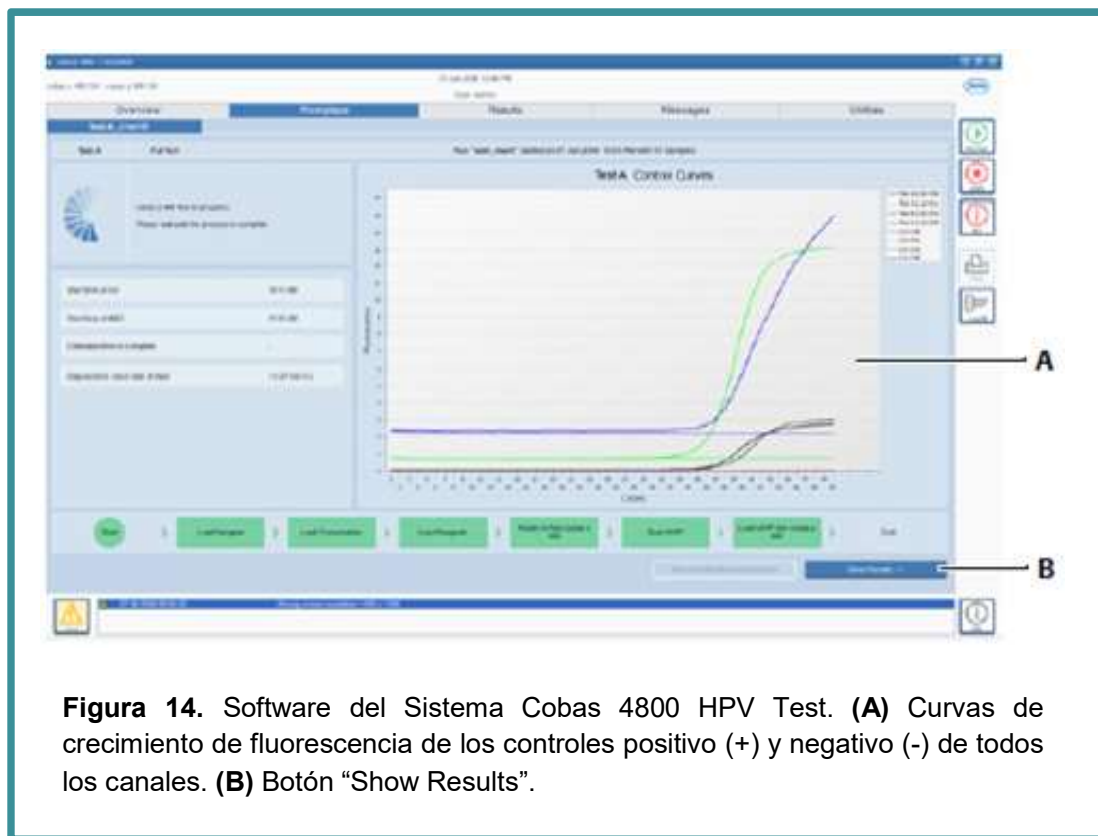
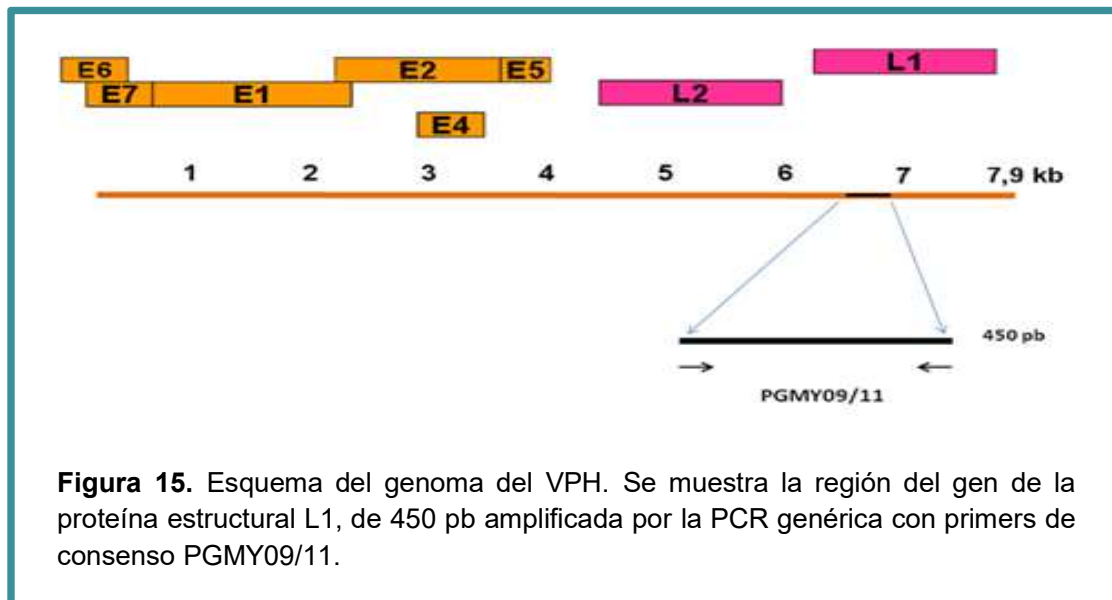


Figura 14. Software del Sistema Cobas 4800 HPV Test. **(A)** Curvas de crecimiento de fluorescencia de los controles positivo (+) y negativo (-) de todos los canales. **(B)** Botón “Show Results”.

La estrategia aplicada, consistió en la realización de una PCR genérica directa empleando primers PGMY09/11 que amplifican un fragmento de 450 pb del gen viral L1 (GRAVITT PE et al, 2000), Figura 15. Los primers PGMY09/11 fueron rediseñados a partir de los primers MY09/11 (MANOS MM et al, 1989) para aumentar la sensibilidad de amplificación de todo el espectro de los tipos de VPH. La heterogeneidad de la secuencia fue acomodada mediante el diseño de múltiples secuencias de cebadores que se combinaron, evitando así el uso de bases degeneradas que producen la síntesis de cebadores irreproducibles. En la Tabla 3 se observa el set de cinco oligonucleótidos PGMY11 (forward) que se encuentran biotinilados en el extremo 5' y el set de trece oligonucleótidos PGMY09 (reverse) no marcados. El sistema PGMY09/11 parece ser significativamente más sensible que el sistema MY09/11 (GRAVITT PE et al, 2000).



La PCR PGMY09/11 se realizó en un volumen final de 50 microlitros conteniendo: solución tamponada 1X (Fermentas), 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 80 nM del set de primers PGMY09, 80 nM del set de primers PGMY11-biotinilados, 20 nM de los primers HLA-dQ, 0,025 U/ul de Taq ADN-polimerasa (Fermentas) y 5 ul de ADN extraído. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de punto final (MyCycler, BIO-RAD), mediante el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 9 min, seguida de 45 ciclos de 95°C por 30 seg/ 55°C por 1 min 30 seg/72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 5 min (UNGER ER y col, 2009).

Tabla 3. Nombre y Secuencias de Primers de consenso PGMY09/11biot.

Adaptado de: UNGER ER y col, 2009.

Primers Biotinilados en el extremo 5´

NOMBRE	SECUENCIA (5´ → 3´)
PGMY11-A	GCACAGGGACATAACAATGG
PGMY11-B	GCGCAGGGCCACAATAATGG
PGMY11-C	GCACAGGGACATAATAATGG
PGMY11-D	GCCCAGGGCCACAACAATGG
PGMY11-E	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
HLAdQ-F	GTGGTGTAACTTGTACCA

Primers no marcados

NOMBRE	SECUENCIA (5´ → 3´)
PGMY09-F	CGTCCCAAAGGAAACTGATC
PGMY09-G	CGACCTAAAGGAAACTGATC
PGMY09-H	CGTCCAAAAGGAAACTGATC
PGMY09-I	GCCAAGGGGAAACTGATC
PGMY09-J	CGTCCCAAAGGATACTGATC
PGMY09-K	CGTCCAAGGGGATACTGATC
PGMY09-L	CGACCTAAAGGGAATTGATC
PGMY09-M	CGACCTAGTGGAAATTGATC
PGMY09-N	CGACCAAGGGGATATTGATC
PGMY09-P	GCCCAACGGAAACTGATC
PGMY09-Q	CGACCCAAGGGAAACTGGTC
PGMY09-R	CGTCCTAAAGGAAACTGGTC
HMB01	GCGACCCAATGCAAATTGGT
HLAdQ-R	GGTAGCAGCGGTAGAGTT

Los productos de la PCR pueden ser tipificados por hibridación reversa en línea (*reverse line blot*, RLB) gracias a que el set de primers PGMY11 están biotinilados en el extremo 5´. Para ello, los productos amplificados fueron aplicados sobre una membrana de nylon pretratada en la que previamente se fijaron las sondas correspondientes a cada uno de los 32 tipos de VPH a identificar, en canales independientes. En todas las muestras, se efectuó simultáneamente un control de integridad del ADN total mediante los primers HLAdQ-F/HLAdQ-R que amplifican un fragmento de 230 pb del gen celular que codifica para el antígeno leucocitario de histocompatibilidad (HLA). Las muestras que

dan negativa esta prueba son descartadas del estudio. El revelado de los híbridos se realizó mediante una reacción quimioluminiscente, con posterior autoradiografía.

3.5. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

El diagnóstico citológico fue realizado por citotecnólogos de cada servicio de Patología Cervical y los resultados fueron recolectados de las historias clínicas de las pacientes incluidas en este estudio. Los mismos fueron clasificados según la terminología Bethesda 2001: como negativa para lesión escamosa intraepitelial o malignidad; ASC-US, presencia de células escamosas alteradas de significado incierto; L-SIL, presencia de lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (incluye CIN I y/o VPH); H-SIL, presencia de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (incluye CIN II, CIN III) o cáncer de cuello uterino (Solomon D et al, 2002).

3.6. RECOLECCIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A todas las pacientes que accedieron a participar del estudio, antes de realizar la toma de muestras, se les aplicó un cuestionario con todos los datos socio-demográficos y sobre factores de riesgos asociados al cáncer cérvico-uterino. Los resultados de la citología han sido recogidos de las historias clínicas que se encuentran en los archivos de los centros participantes y los resultados de la detección de VPH-AR se han obtenido del Dpto. de Inmunología del LCSP.

Las variables fueron recogidas del cuestionario aplicado a las pacientes que accedieron a participar del estudio, de los resultados de laboratorio y las historias clínicas; incluyendo variables demográficas como (EDAD, PROCEDENCIA, NIVEL DE INSTRUCCIÓN), variables asociadas al CCU (EDAD DE LA PRIMERA RELACIÓN SEXUAL, NÚMERO DE PAREJAS SEXUALES, PARIDAD, USO ANTICONCEPCIÓN HORMONAL, TABAQUISMO); variables diagnósticas (DETECCION DE VPH-AR, INFECCION POR VPH-16, VPH-18 y/u OTROS VPH-AR, RESULTADOS DE LA CITOLOGÍA).

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de las características epidemiológicas de las pacientes calculando las medias y las desviaciones estándar para las variables cuantitativas, frecuencias y porcentajes para las cualitativas. Se estudió la distribución de los casos positivos y de los genotipos encontrados por grupos de edades de 10 años. El estudio de la relación entre las variables cualitativas se realizó empleando el test de chi-cuadrado. Se asumió la significancia estadística con un valor de P igual o inferior a 0,05. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico Epi-Info 2002.

3.7. ASUNTOS ÉTICOS

El Comité de Ética en Investigación del LCSP revisó y aprobó previamente el protocolo de este estudio. Las pacientes recibieron información esencial sobre el mismo y aquéllas que accedieron a participar firmaron el consentimiento informado, de acuerdo a lo estipulado en el documento “Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos”, surgido de la Declaración de Helsinki (1964), lo que garantizó la confidencialidad y beneficio para las participantes.

4. RESULTADOS

4.1. DETECCIÓN DE VPH CON EL SISTEMA COBAS 4800 HPV TEST

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos con el Cobas 4800 HPV Test, éstos se reportan como VPH-16, VPH-18, Otros VPH-AR, Negativos para VPH-AR. Todas las muestras incluidas en este trabajo fueron positivas para el gen de β -globina humana, lo que demostró la buena calidad del material genético de las mismas en el momento de someterlas a esta prueba. La prevalencia de VPH-AR fue del 14,5% (IC_{95%} 11,6 – 18,0).

Tabla 4. Frecuencia de VPH-AR (n=495)

Resultados	Muestras	Frecuencia % (IC _{95%})
VPH-AR Negativos	423	85,5 (CI _{95%} 82,0 – 88,0)
VPH-AR Positivos (*)	72	14,5 (CI _{95%} 11,6 – 18,0)
TOTAL	495	100

(*) VPH-16, VPH-18 y Otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68)

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la frecuencia de las infecciones producidas por VPH-16, VPH-18 y Otros VPH-AR.

Tabla 5. Frecuencia de la infección por VPH-16, VPH-18 y Otros VPH-AR.

Resultados	N° de casos	Total de Muestras % (IC _{95%}) (n=495)	Total de VPH-AR Positivos % (IC _{95%}) (n=72)
VPH-16 (*)	17	3,4 (CI _{95%} 2,1 – 5,6)	23,6 (CI _{95%} 14,4 – 35,1)
VPH-18 (*)	4	0,8 (CI _{95%} 0,3 – 2,2)	5,6 (CI _{95%} 1,5 – 13,6)
Otros VPH-AR (**)	51	10,3 (CI _{95%} 7,6 – 13,0)	70,8 (CI _{95%} 60,3 – 81,3)

(*) Infecciones únicas o múltiples;

(**) Otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), excluyendo co-infecciones con VPH-16 o VPH-18.

En la Tabla 6 se detallan las infecciones simples y múltiples encontradas. En la población estudiada no se observaron co-infecciones de VPH-16 y VPH-18.

Tabla 6. Frecuencia de infecciones simples y múltiples entre las muestras positivas para VPH-AR. (n=72)

Genotipo	Infecciones simples		Genotipo	Infecciones múltiples	
	N°	Frecuencia % (CI _{95%})		N°	Frecuencia % (CI _{95%})
VPH-16	13	18,1 (CI _{95%} 9,1 – 27,0)	VPH-16/Otros VPH-AR (*)	4	5,6 (CI _{95%} 0,3 – 10,9)
VPH-18	2	2,8 (CI _{95%} 1,0 – 6,6)	VPH-18/Otros VPH-AR (*)	2	2,8 (CI _{95%} 1,0 – 6,6)
Otros VPH-AR (*)	51	70,8 (CI _{95%} 60,3 – 81,3)	-	-	-
TOTAL	66	91,7 (CI_{95%} 85,3 – 98,1)	TOTAL	6	8,3 (CI_{95%} 1,9 – 14,7)

(*) Otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

Para el análisis de la distribución de casos en función de la edad se estratificó la población en cuatro grupos etarios. En la Tabla 7 se detalla la información.

Tabla 7. Frecuencia por edad de la detección de VPH-AR

Edad (años)	N° de Muestras	N° de VPH-AR positivos	VPH-AR positivos % (IC _{95%})
Menos de 30	109	28	25,7 (CI _{95%} 17,8 – 34,9)
30 a 39	168	24	14,3 (CI _{95%} 9,4 – 20,5)
40 a 49	133	15	11,3 (CI _{95%} 6,5 – 17,9)
50 o Más	85	5	5,9 (CI _{95%} 1,9 – 13,2)
TOTAL	495	72	-

(*) Infecciones únicas o múltiples; (**) Otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), excluyendo co-infecciones con VPH-16 o VPH-18.

En la Figura 16 se grafica la frecuencia de la infección por VPH-AR con respecto a la edad. Al graficar la frecuencia de VPH-AR estratificada por grupos etarios, la curva presenta un pico en las mujeres más jóvenes (menores de 30 años) y va decreciendo en forma constante presentando el valor más bajo en mujeres de 50 años o más. No se presentó el segundo pico en el grupo de mujeres mayores (50 años o más).

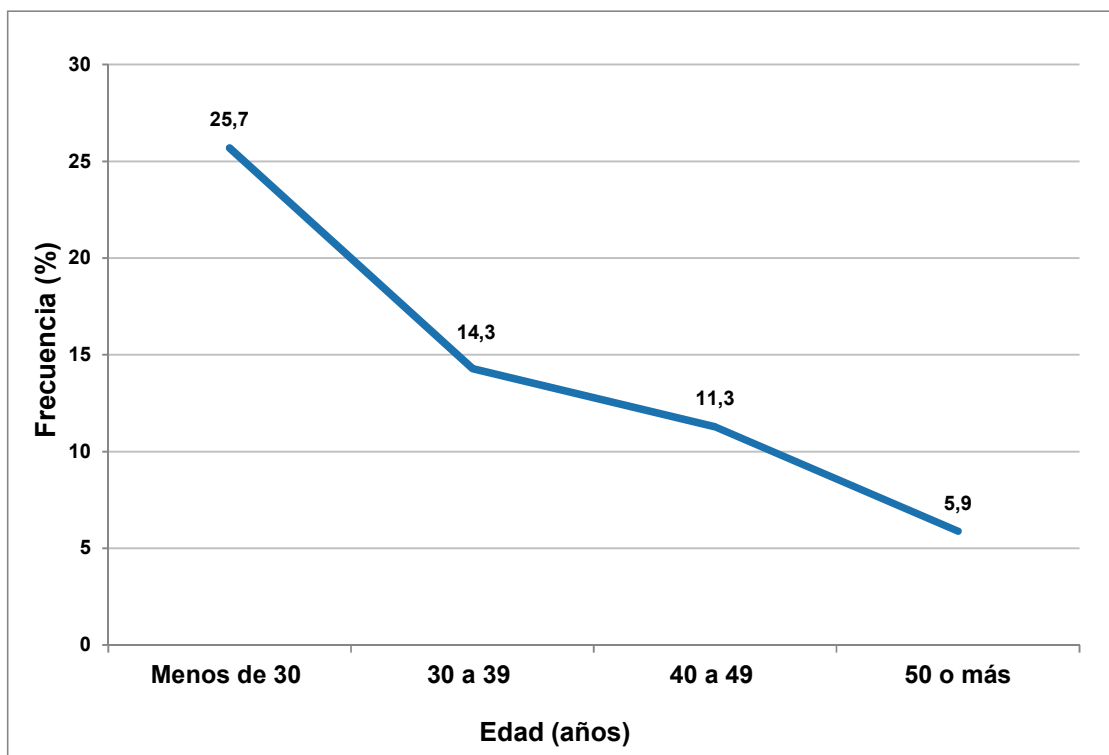


Figura 16. Frecuencia por edad de la detección de VPH-AR

Las frecuencias de los genotipos de VPH por grupos de edades se presentan en la Tabla 8. El VPH-16 fue encontrado en casi todos los grupos de edades, a diferencia del VPH-18 que se vio sólo en mujeres menores de 40 años. Los Otros VPH-AR se distribuyen de manera constante en todos los grupos etarios.

Tabla 8. Frecuencia por edad de la infección por VPH-16, VPH-18 y otros VPH-AR.

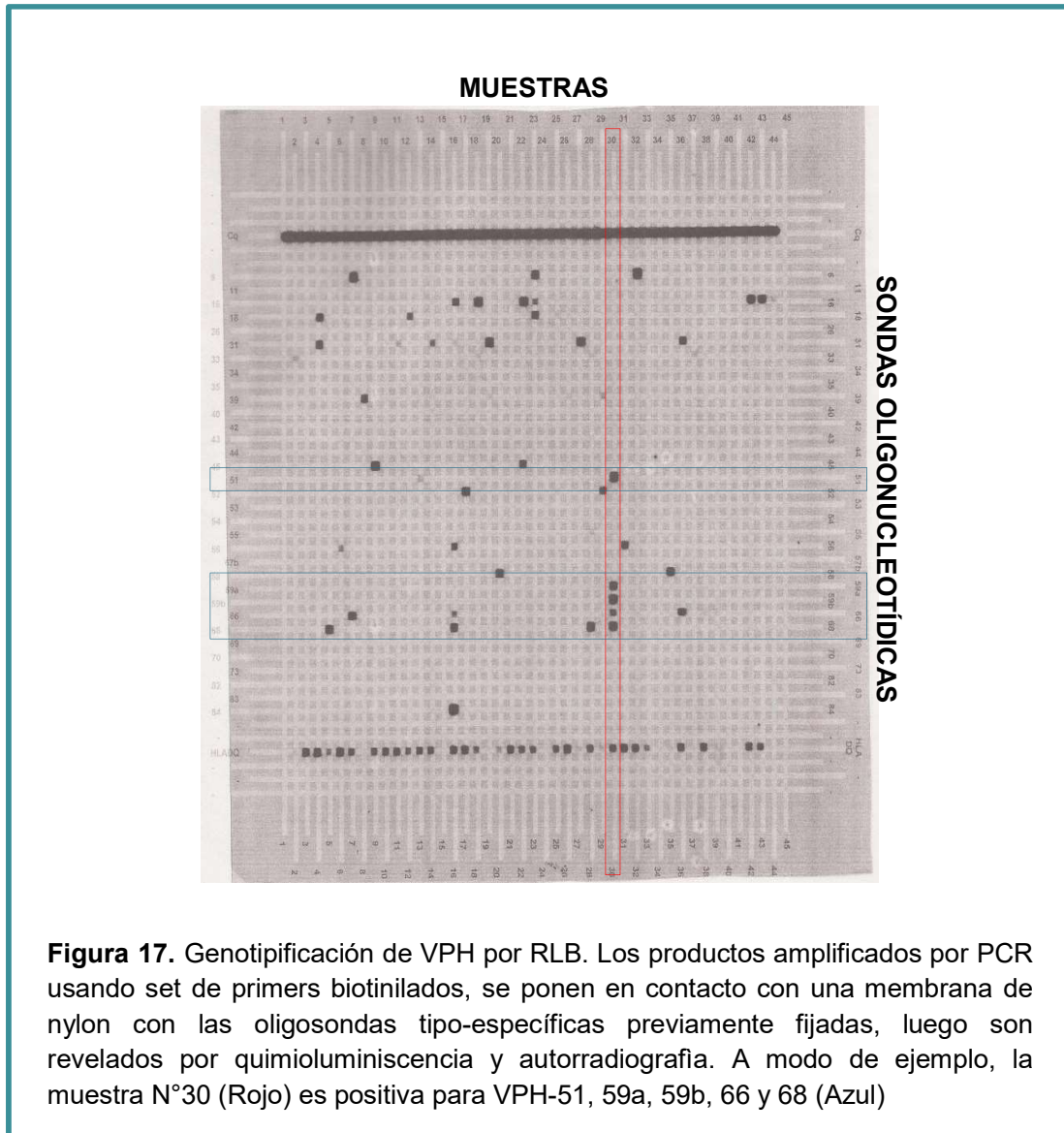
Edad (años)	Nº de Muestras	VPH-16 N (%; IC _{95%}) (*)	VPH-18 N (%; IC _{95%}) (*)	OTROS VPH-AR N (%; IC _{95%}) (**)
Media ± DE	-	35,2 ± 9,0	29,3 ± 3,8	35,2 ± 9,9
Menos de 30	109	7 (6,4; IC _{95%} 2,6 – 12,8)	2 (1,8; IC _{95%} 0,2 – 6,5)	19 (17,4; IC _{95%} 10,8 – 25,9)
30 a 39	168	6 (3,6; IC _{95%} 1,3 – 7,6)	2 (1,2; IC _{95%} 0,1 – 4,2)	16 (9,5; IC _{95%} 5,5 – 15,0)
40 a 49	133	3 (2,3; IC _{95%} 0,5 – 6,5)	-	12 (9,0; IC _{95%} 4,7 – 15,2)
50 o Más	85	1 (1,2; IC _{95%} 0,0 – 6,4)	-	4 (4,7; IC _{95%} 1,3 – 11,6)
TOTAL	495	-	-	-

(*) Infecciones únicas o múltiples;

(**) Otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), excluyendo co-infecciones con VPH-16 o VPH-18.

4.2. TIPIFICACIÓN VIRAL POR PCR-RLB

Se analizaron por PCR-RLB 57 muestras, que constituyen el 79,2% (IC_{95%} 69,8 – 88,6) del total de muestras positivas. La Figura 17 muestra la foto de una película radiográfica correspondiente a una hibridación reversa en línea, luego del revelado por quimioluminiscencia.



Se efectuó el control de integridad del ADN total mediante primers que amplifican un fragmento de 230 pb del gen celular de HLA; resultando negativo en seis muestras, por lo que fueron excluidas del análisis. Además, diez muestras dieron positivo para el gen celular de HLA, pero no pudieron ser tipificadas por esta metodología. En total 19 tipos virales distintos pudieron identificarse en infecciones únicas y múltiples. Los resultados se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Tipos de VPH identificados por PCR-RLB (n=51)

Infecciones únicas (Total)		25
VPH-AR		
31		3
33		3
39		1
45		2
51		2
52		1
56		2
58		3
59		1
VPH-pAR		
26		1
66		3
68		2
VPH-BR		
6		1
Infecciones múltiples (Total)		16
16/33		1
16/53		1
16/31/45		1
16/52/58		1
18/39		1
18/58/59		1
31/39		4
31/66		1
33/55/68		1
39/52		1
53/58		1
59/70		2
No tipificados (*)		10
(*) Otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) que no pudieron ser tipificados por PCR-RLB, pero dieron HLA (+)		

4.3. CORRELACIÓN DE LOS DATOS VIROLÓGICOS CON LA CITOLOGÍA

El 93,1% (461/495) de las muestras incluidas en el estudio presentaron ausencia de lesión escamosa intraepitelial (N-SIL). En la Tabla 10 se presentan los resultados de la detección del ADN viral según la severidad de la lesión. La frecuencia de detección de VPH-AR fue mayor en las anomalías citológicas de grado superior.

Tabla 10. Frecuencia de VPH-AR según diagnóstico citológico.

CITOLOGIA	Total de muestras	Nº Positivos para VPH-AR (% IC _{95%})	Nº Negativos para VPH-AR (% IC _{95%})
N-SIL	461	55 (11,9 IC _{95%} 9,2-15,3)	406 (88,1 IC _{95%} 84,7-90,8)
ASC-US	4	2 (50,0 IC _{95%} 6,8-93,2)	2 (50,0 IC _{95%} 6,8-93,2)
L-SIL	25	11 (44,0 IC _{95%} 24,4-65,1)	14 (56,0 IC _{95%} 34,9-75,6)
H-SIL	5	4 (80,0 IC _{95%} 28,4-99,5)	1 (20,0 IC _{95%} 0,5-71,6)
TOTAL	495	72	423

N-SIL: negativo para lesión escamosa intraepitelial; ASC-US: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto; L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado

Con los resultados expuestos en la Tabla 9 sobre la tipificación realizada por PCR-RLB y teniendo en cuenta la exclusión de aquellas muestras que fueron inadecuadas y las que no pudieron ser tipificadas por esta metodología, puede hacerse el análisis de la frecuencia de infecciones únicas y múltiples según el grado de lesión cervical sobre un total de 56 muestras.

Como se muestra en la Tabla 11, se encontró una frecuencia similar de infecciones múltiples en las mujeres con citología negativa (29,3%, IC_{95%} 16,1-45,5) y en las mujeres con ASC-US o más (26,7%; IC_{95%} 7,8-55,1) ($p=0,84$). No se observaron infecciones múltiples en las pacientes con L-SIL.

Tabla 11. Frecuencia de infecciones simples y múltiples según el diagnóstico citológico. (n=56)

CITOLOGIA	N-SIL	SIL			TOTAL
		ASC-US	L-SIL	H-SIL	
Infección única	29 (70,7)	1 (50,0)	6 (66,7)	4 (100)	11 (73,3)
Infección múltiple	12 (29,3)	1 (50,0)	3 (33,3)	-	4 (26,7)
TOTAL	41 (100)	2 (100)	9 (100)	4 (100)	15 (100)

N-SIL: negativo para lesión escamosa intraepitelial; ASC-US: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto; L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado

En la Tabla 12, se observan los resultados obtenidos con el sistema Cobas 4800 HPV Test distribuidos según el diagnóstico citológico de las pacientes. Se encontró que el VPH-16 y el VPH-18 en el 2,6% (12/461) de las pacientes con N-SIL y en el 26,5% (9/34) de las pacientes con SIL (ASC-US o más).

Tabla 12. Tipos de VPH-AR detectados según diagnóstico citológico.

CITOLOGIA	Positivos para VPH-AR	Positivos VPH-16	Positivos VPH-18	Positivos OTROS VPH-AR
N – SIL	55	10	2	43
ASC – US	2	1		1
L – SIL	11	4	2	5
H – SIL	4	2		2
TOTAL	72	17	4	51

N-SIL: negativo para lesión escamosa intraepitelial; ASC-US: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto; L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado

La Figura 9 muestra la distribución de frecuencia de los diferentes genotipos VPH-AR en mujeres citología negativa y en mujeres con anomalías citológicas (ASC-US o más).

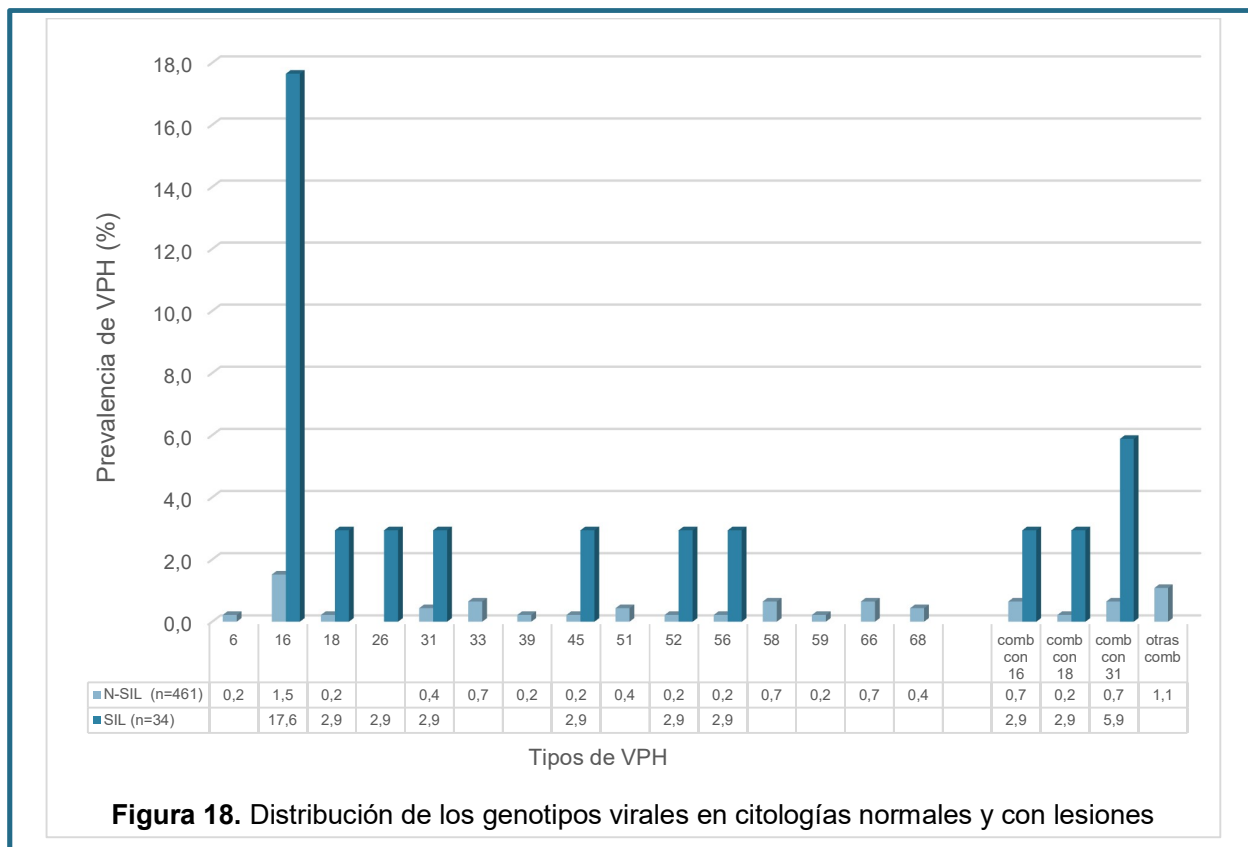


Figura 18. Distribución de los genotipos virales en citologías normales y con lesiones

4.4. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VPH-AR

La Tabla 13 describe las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de las pacientes. La población estudiada incluyó a 495 mujeres de 25 a 64 años siendo la edad promedio de 39 ± 10 años. Cerca de la mitad de las pacientes residía en Asunción (44%). La mayoría de las participantes refirió dedicarse a los quehaceres domésticos (76%) sin contar con un empleo formal. Con respecto al nivel educativo, el 65% había cursado estudios secundarios o más. El 58% eran casadas o en unión libre. El inicio de las relaciones sexuales fue en promedio a los 18 ± 3 años (rango 12 – 35 años) y el 61% señaló haberlo hecho antes de los diecinueve años. La moda para el número de parejas sexuales fue de 1 y el 83% de las participantes informó haber tenido menos de 3 parejas sexuales durante su vida. Con respecto a la paridad, la moda fue de 2 y se observó que el 37% de tenía de dos a tres hijos.

El uso de anticonceptivos hormonales fue referido por el 28% de las pacientes. De la población en estudio, el 34% tenía antecedentes de una infección de transmisión sexual (ITS), siendo las infecciones por *Candida sp* y *Gardnerella vaginalis* las más frecuentemente citadas. El 12% nunca había se hecho una prueba de Papanicolaou, mientras que el 60% tenía una prueba de Papanicolaou realizada en el último año. Sólo el 7% de las mujeres eran fumadoras. En la tabla 6 se detallan las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos obstétricos de las pacientes estudiadas.

Se encontraron asociaciones significativas entre la infección por VPH-AR y la edad de la paciente (OR 2,69 - IC_{95%}: 1,53 - 4,73), el lugar de residencia (OR 2,10 - IC_{95%}: 1,23 - 3,61), el uso de anticonceptivos hormonales (OR 1,69 - IC_{95%}: 0,97 - 2,94) y el antecedente de infecciones de transmisión sexual (OR 1,79 - IC_{95%}: 1,04 - 3,05).

Tabla 13. Características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de las pacientes estudiadas. (n=495)

VARIABLES	Positivos para VPH-AR N° (% IC_{95%}) n = 72	Negativos para VPH-R N° (% IC_{95%}) n = 423	P
Edad (años)			
<30 años	28 (26 IC _{95%} 18 – 35)	81 (74 IC _{95%} 65 – 82)	0,0002
≥30 años	44 (11 IC _{95%} 9 – 15)	342 (89 IC _{95%} 85 – 92)	
Residencia			
Asunción	43 (20 IC _{95%} 15 – 26)	175 (80 IC _{95%} 74 – 85)	0,004
Otras localidades	29 (11 IC _{95%} 7 – 15)	248 (89 IC _{95%} 85 – 93)	
Educación			
Primaria	25 (15 IC _{95%} 10 – 22)	139 (85 IC _{95%} 78 – 90)	0,76
Secundaria o más	47 (14 IC _{95%} 11 – 19)	284 (86 IC _{95%} 82 – 89)	
Primera relación sexual			
16 años o menos	40 (13 IC _{95%} 10 – 18)	261 (87 IC _{95%} 82 – 90)	0,32
Mayor de 16 años	32 (17 IC _{95%} 12 – 23)	162 (83 IC _{95%} 78 – 88)	
N° de parejas sexuales			
1 a 2	58 (14 IC _{95%} 11 – 18)	354 (86 IC _{95%} 82 – 89)	0,51
3 ó más	14 (17 IC _{95%} 10 – 27)	69 (83 IC _{95%} 73 – 91)	
Vive con compañero sexual			
SI	37 (12 IC _{95%} 9 – 17)	249 (87 IC _{95%} 83 – 91)	0,24
NO	35 (17 IC _{95%} 12 – 23)	174 (83 IC _{95%} 78 – 88)	
Embarazo			
SI	56 (14 IC _{95%} 11 – 18)	350 (86 IC _{95%} 82 – 89)	0,31
NO	16 (18 IC _{95%} 11 – 27)	73 (82 IC _{95%} 72 – 89)	
Paridad			
1 a 3	45 (16 IC _{95%} 12 – 20)	244 (84 IC _{95%} 80 – 88)	0,10
4 ó más	11 (9 IC _{95%} 5 – 16)	106 (91 IC _{95%} 84 – 95)	
Uso de anticonceptivos hormonales			
SI	27 (19 IC _{95%} 13 – 27)	112 (81 IC _{95%} 73 – 87)	0,049
NO	45 (13 IC _{95%} 10 – 17)	311 (87 IC _{95%} 83 – 91)	
Antecedente de Infecciones de Transmisión Sexual			
SI	33 (19 IC _{95%} 14 – 26)	136 (81 IC _{95%} 74 – 86)	0,024
NO	39 (12 IC _{95%} 9 – 16)	287 (88 IC _{95%} 84 – 91)	
PAP previos			
SI	62 (14 IC _{95%} 11 – 18)	375 (86 IC _{95%} 82 – 89)	0,54
NO	10 (17 IC _{95%} 9 – 29)	48 (83 IC _{95%} 71 – 91)	
Años del último PAP			
1 año o menos	41 (16 IC _{95%} 11 – 21)	221 (84 IC _{95%} 79 – 88)	0,28
Más de 1 año	21 (12 IC _{95%} 8 – 18)	154 (88 IC _{95%} 82 – 92)	
Ocupación			
Ama de casa	53 (14 IC _{95%} 11 – 18)	321 (86 IC _{95%} 81 – 89)	0,68
Empleo formal	19 (16 IC _{95%} 10 – 23)	102 (84 IC _{95%} 77 – 90)	
Hábito de fumar			
SI	8 (23 IC _{95%} 10 – 40)	27 (77 IC _{95%} 60 – 90)	0,15
NO	64 (14 IC _{95%} 11 – 17)	396 (86 IC _{95%} 82 – 89)	

5.DISCUSIÓN

Este trabajo muestra los primeros resultados obtenidos con la implementación de técnicas moleculares para detección y tipificación de VPH como parte del sistema de salud pública de Paraguay, llevado a cabo como un estudio piloto dentro de los programas nacionales de tamizaje, realizado en un contexto asistencial en consultorios ginecológicos.

El ADN de VPH-AR fue detectado en el 14,5% (IC_{95%} 11,6-18,0) de las pacientes estudiadas. Esto es bastante similar a lo descrito por Mendoza y col, que reportaron una prevalencia del 21% para VPH genérico y del 12,1% para VPH-AR, en un estudio nacional realizado en pacientes paraguayas con citologías negativas para lesión escamosa intraepitelial (MENDOZA L col, 2012). Además, es semejante a lo observado en dos estudios poblacionales de la región, uno realizado en Concordia, Argentina, que encontró una prevalencia del 16,6% para VPH y del 12,1% para VPH-AR (MATOS E y col, 2003); y otro realizado en trece regiones de Chile para determinar la distribución geográfica tipo-específica del VPH, que encontró una prevalencia del 23,2% para VPH y del 15,3% para VPH-AR (FERRECCIO C y col, 2005).

Así también, los datos presentados en este estudio, son cercanos a los reportados en el meta-análisis realizado en un millón de mujeres de los cinco continentes, con citología normal, donde la prevalencia estandarizada de VPH para Sudamérica fue del 15,3%. Cabe destacar que, en ese estudio, la prevalencia estandarizada de VPH por países mostró un amplio rango de variabilidad (del 1,6% al 41,96%) (BRUNI L y col, 2010). Esto indicaría que la frecuencia de infección es afectada por las características étnicas, culturales y de desarrollo propias, lo que justificaría a su vez la semejanza de nuestros datos con aquéllos obtenidos en otros países de Latinoamérica.

Así también, en el estudio ATHENA, diseñado para la evaluación clínica del Cobas 4800 HPV Test, se encontró infección por VPH-AR en el 6,7% de 32.260 mujeres con citología normal, de 30 años o más, en los EEUU (WRIGHT TC y col, 2011), valor considerablemente menor a lo reportado en este trabajo. Como ya se ha mencionado, la prevalencia de VPH en países más desarrollados es sustancialmente más baja (6,2%) (BRUNI L y col, 2010). Otro factor que podría contribuir a esta diferencia es el rango de edad de la población, que en este estudio incluyó algunas mujeres menores de 30 años. Es bien conocido que por debajo de 30 años hay un marcado pico de prevalencia de VPH debido a la proximidad del debut sexual, fuertemente relacionado a la primo infección (WELLINGS K y col, 2006).

En el 28,6% (IC_{95%} 17,3-42,2) de los casos positivos, se identificaron infecciones por más de un tipo viral. Diversos trabajos han detectado frecuencias de infecciones múltiples variables que van de menores al 10% hasta más del 80% (TROTTIER H y col, 2010;

RIPABELLI G y col, 2010). Este amplio rango podría deberse a la diferencia entre las metodologías moleculares empleadas para la tipificación viral, como así también a las características clínicas de las muestras en que fue realizada la tipificación viral. Hay datos que indican que las coinfecciones son más frecuentes en muestras con anormalidades citológicas (CASTELLSAGUE X y col, 2001; HERRERO R y col, 2000; FIFE KH y col, 2001), mientras que a medida que la lesión se agrava, comienzan a predominar marcadamente las infecciones simples de VPH-AR. La frecuencia encontrada en el presente trabajo es ligeramente menor al 20% reportado por Bruni y col, en el meta-análisis de mujeres con citología normal (BRUNI L y col, 2010), pero muy similar a lo publicado por Cardozo-Segovia y col, que reporta infecciones múltiples en el 30,1% de una población de mujeres paraguayas (CARDOZO-SEGOVIA FM y col, 2012).

La infección con múltiples tipos de VPH también guarda relación con la edad. Ha sido observada muy frecuentemente en los grupos de mujeres más jóvenes (MOLANO M y col, 2002; CASTELLSAGUE X y col, 2001). Sin embargo, en el presente estudio no se ha encontrado diferencia significativa de la frecuencia de infecciones múltiples entre mujeres menores de 30 años y de 30 años o más ($p=0,16$) ni entre mujeres con citología normal y con ASCUS o más ($p=0,85$).

En la actualidad aún no está completamente aclarado el papel de las infecciones múltiples en el desarrollo de lesiones cervicales. En algunos trabajos, han sido asociadas con un riesgo mayor de neoplasia cervical intraepitelial (SASAGAWA T y col, 2001; VAN DER GRAAF Y y col, 2002); mientras que, en otros, en coincidencia con nuestros hallazgos, no se ha observado diferencia significativa en la contribución para el desarrollo de neoplasia cervical intraepitelial y CCU en mujeres con infecciones simples o múltiples (HERRERO R y col, 2000; BOSCH FX y col, 2002). Sin embargo, hay evidencia de que, más allá de la presencia de múltiples tipos virales en una muestra, sólo uno de los VPH-AR es el que va a conducir la potencial transformación maligna (QUINT W y col, 2012).

Está bien establecido que la prevalencia de la infección cervical por VPH es edad dependiente (SCHIFFMANN M y col, 2007), mostrando un patrón general que disminuye con la edad. Existen algunas variaciones en la forma de las curvas de prevalencia de VPH *versus* edad de diferentes países o regiones. Pueden ser *unimodal*, con un solo pico asociado a las mujeres ≤ 25 años; o *bimodal*, con dos picos, el primero similar a la anterior, pero con un segundo pico en mujeres de 45-50 años (DE SANJOSE S y col, 2007). Las infecciones asociadas al segundo pico podrían tratarse de distintas entidades: algunas serían nuevas infecciones (infecciones incidentes) vinculadas a nuevas parejas sexuales; otras podrían ser infecciones previamente adquiridas que se mantienen activas (infecciones persistentes), o también podrían ser infecciones pasadas que fueron

controladas y que reaparecen vinculadas a algún tipo de inmunosupresión (reactivación) (CASTLE PE y col, 2005; STANLEY M y col, 2014).

En este trabajo, se describió una curva unimodal que refleja la disminución de la prevalencia de VPH-AR en función de la edad, no observándose un segundo pico. Si bien difiere del patrón de curva bimodal para Sudamérica, mostrado en el meta-análisis de mujeres con citología normal provenientes de los cinco continentes (BRUNI L y col, 2010), coincide con estudios poblacionales de Chile (FERRECCIO C y col, 2005) y Argentina (MATOS E y col, 2003).

Así también, la frecuencia de VPH-AR en mujeres menores de 30 fue del 25,7%, observándose una diferencia estadísticamente significativa con la frecuencia de infección por VPH-AR en mujeres mayores de 30 años ($p=0,0002$). Esto está en concordancia con numerosos estudios previos que han establecido al contacto sexual como la principal vía de transmisión de esta infección; por lo tanto, la mayor detección viral en las mujeres ≤ 25 años se vincularía con la proximidad a su debut sexual, situación que incrementa la chance de exposición al virus (SANJOSE S y col, 2007; ALMONTE y col, 2008; CASTELLSAGUE X, 2008).

La disminución progresiva de la presencia de VPH-AR en mujeres mayores de 30 años se explica por el carácter auto-limitado y el control de la infección por la acción del sistema inmune del hospedador (infecciones transitorias), lo que hace que el virus se haga indetectable (STANLEY M y col, 2014). En algunos casos, la respuesta inmune falla y lleva a una infección persistente, mayormente por tipos de VPH-AR; esta situación de persistencia viral aumenta la posibilidad de progresión a una lesión preneoplásica grave, que en caso de no ser tratada oportunamente podría alcanzar el estadio de carcinoma invasor (RODRIGUEZ AC y col, 2008; CASTLE PE y col, 2005; STANLEY M y col, 2014).

Se ha sugerido que estas variaciones geográficas en cuanto a la forma de la curva de prevalencia de VPH podrían estar relacionadas no sólo con la edad, sino con múltiples factores, entre los que se considera la conducta sexual, susceptibilidad del hospedador, estrategias de tamizaje, entre otros; y ser resultado de la interacción entre ellos. Debe tenerse en cuenta que la conducta sexual está estrechamente ligada a cambios sociales, afectando significativamente la transmisión del VPH (BOSCH FX y col, 2008; SICHERO L y col, 2007; DE SANJOSE S y col, 2007).

El efecto del tamizaje sobre la frecuencia viral ha sido descrito y se considera una de las razones por las cuales las curvas de prevalencia para América Central y Sudamérica muestran valores mayores que las de América del Norte (DE SANJOSE S y col, 2007). Apoyando esto, se puede mencionar un estudio prospectivo llevado a cabo en Costa Rica, que presenta una curva de prevalencia de VPH bimodal al inicio del estudio;

sin embargo, durante el seguimiento, cuando dicha población es monitoreada y tratada de manera efectiva, la forma de la curva se vuelve menos pronunciada (CASTLE PE, 2005). Este argumento también podría justificar en parte, la forma unimodal de la curva de prevalencia de VPH-AR por edad mostrada en este trabajo, debido a que las mujeres estudiadas corresponden mayormente a una población frecuentemente controlada, reclutadas al acudir a los servicios de salud para la realización del estudio citológico de rutina; el 88% de ellas se había realizado una prueba de Papanicolaou anteriormente y el 60% lo había hecho en el último año.

En VPH-16 es el virus más frecuente independientemente del diagnóstico citológico (CLIFFORD G y col, 2003; CLIFFORD G y col 2005; SMITH JS y col, 2007; SANJOSE S y col, 2007; BRUNI L y col, 2010). En coincidencia con esto, en el presente estudio el VPH-16 fue el tipo viral predominante, detectándose en el 3,4% de la población estudiada y en el 23,6% de los casos positivos. Estos datos son similares a lo observado en Paraguay 4,3% (MENDOZA L y col, 2012); en la región de Latinoamérica y el Caribe, 3,3% y a nivel mundial 3,2% en mujeres con citología normal (SANJOSE S y col, 2007; BRUNI L y col, 2010).

Numerosos autores han señalado que las mujeres con infecciones persistentes por VPH-16 poseen una mayor probabilidad de desarrollar lesiones precancerosas al ser comparadas con mujeres infectadas por otros tipos virales. Kjaer y col observaron que mujeres con citología normal e infección persistente por VPH-16 poseen aproximadamente un 30% de probabilidad de desarrollar lesiones de alto grado en un período de 12 meses (KJAER SK y col, 2010; SCHIFFMAN M y col, 2005; KHAN MJ y col, 2005; CASTLE PE y col, 2005). Esto da relevancia al presente estudio, ya que la mayoría de las mujeres que se identificaron como portadoras de infecciones por VPH-AR presentaban citología normal; sin embargo, la presencia viral, en especial en las mayores de 30 años, las ubica en un grupo de mayor riesgo de una potencial persistencia viral, instancia previa al probable desarrollo de lesiones graves.

Otros tipos virales pueden ocupar los siguientes lugares en orden de frecuencia según la región geográfica y el diagnóstico cito-histológico, entre otros factores. En este trabajo, los otros genotipos más comúnmente detectados después del VPH-16; fueron, en orden decreciente, el VPH-31, 39, 58 y 33. Estos datos son concordantes con los cinco tipos más frecuentes en mujeres con citología normal en el mundo (VPH-16, 18, 31, 58 y 52) y en Sudamérica (VPH-16, 58, 18, 45 y 31) (BRUNI L y col, 2010; SANJOSE S y col, 2007; CLIFFORD GM y col, 2005).

Los genotipos 18, 59 y 66 aparecieron en igual frecuencia (0,8%), ubicándose en el sexto lugar. A nivel mundial, el VPH-18, fue encontrado en 1,4% de las mujeres con

citología normal, ubicándose en segundo lugar después VPH-16. Sin embargo, al analizar la distribución del VPH-18, se puede observar menores tasas de prevalencia en diferentes regiones (BRUNI L y col, 2010; SANJOSE S y col, 2007; CLIFFORD GM y col, 2005). El estudio CLEOPATRA, realizado en población española con el 97,8% de citologías normales, mostró al VPH-16 como el genotipo mayormente implicado en las infecciones, seguido por el VPH-52 y el VPH-31 (CASTELLSAGUÉ X y col, 2012). Herrero y col, han descrito a los VPH-58, 51 y 52 como relativamente abundante en Costa Rica, seguido por los VPH-31 y 18 (HERRERO R y col, 2000). Según Ferreccio y col, los tipos virales de alto riesgo más comunes en la población chilena estudiada fueron VPH-16, 56, 31, 58, 59, 18 y 52 (FERRECCIO C y col, 2005). En Colombia, las infecciones con VPH-16 fueron las más frecuentes, seguidos por el VPH-58 (MOLANO M y col, 2002). Así mismo, Mendoza y col, reportaron como los tipos más predominantes en mujeres paraguayas con citología normal a los VPH-16, 58 y 31 (MENDOZA L y col, 2012).

La frecuencia de la infección por VPH-AR aumenta con el grado de lesión cervical. Los porcentajes de infección por tipos de alto riesgo fueron del 44 % y 80% para L-SIL y H-SIL, respectivamente. Entre las pacientes VPH-AR positivas con diagnóstico citológico de L-SIL el genotipo más comúnmente detectado fue claramente el VPH-16; sin embargo, también fueron detectados varios otros como VPH-18, 31, 45, 58, 59, 61, 26 y 66 en menor frecuencia. Esto es bastante similar a lo encontrado en un estudio sobre casi 6.000 casos de L-SIL, en el que se encontró que los genotipos más frecuentes eran el VPH-16, 31, 51, 53, 56, 18, 66 y 58. Del mismo modo, habían sido detectado muchos otros tipos en menor frecuencia, destacando la amplia variedad de genotipos de VPH en L-SIL (CLIFFORD GM y col, 2005).

A pesar del reducido número de pacientes con diagnóstico citológico de H-SIL incluidos en este trabajo, pudo observarse que los tipos de VPH-AR más frecuentes fueron VPH-16, 31 y 56. Esto concuerda con datos de un amplio meta-análisis realizado sobre más de 7.000 casos, donde reporta que los genotipos mayormente identificados fueron VPH-16, 31, 58, 18, 33, 52, 35, 51, 56, 45, 39, 66 y 6 (SMITH JS y col, 2007). Coincidiendo, también en que el VPH-16 es el tipo más común en H-SIL. En relación al VPH-18, descrito consistentemente como uno de los más prevalentes en todas las regiones, no fue identificado en este trabajo en las H-SIL.

Debe tenerse en cuenta que la distribución de genotipos encontrados está influenciada en gran medida por las características de la población en estudio, así como también por la sensibilidad y especificidad de los métodos analíticos de genotipificación empleados. Se ha observado que una misma población analizada con diferentes técnicas

pueden duplicar o incluso triplicar la prevalencia estimada del VPH (CASTELLSAGUÉ X y col, 2008).

Dado el elevado número de tipos de VPH a identificar, alrededor de 40 son los que infectan las mucosas, no existe un único método que lo permita, sino que se requieren estrategias mixtas. Una de las más usadas en el mundo es la que combina una PCR genérica con una posterior hibridación tipo- específica. Es bien sabido que en estos casos es imposible lograr que el desempeño de la amplificación genérica sea idéntico para todos los tipos virales por igual, siendo algunos tipos virales más beneficiados que otros; en especial, la sensibilidad diferencial se manifestaría en las muestras que contienen un bajo número de copias (SNIJDERS PJF y col, 2010). Por esta razón es muy importante que los estudios de epidemiología molecular se realicen con técnicas validadas analíticamente y que se desarrollen en condiciones estandarizadas para permitir obtener resultados confiables (TABRIZI SN y col, 2010).

Cabe destacar que los datos aportados en este estudio fueron obtenidos empleando una técnica artesanal validada por la OMS (PCR-RLB), de acuerdo al Manual de la Red Global de Laboratorios de VPH de la OMS (WHO HPV LabNet) (UNGER ER y col, 2009). Estas determinaciones permiten detectar hasta 5 copias de los VPH-AR más frecuentes (HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 54, 56, 58) y cuentan además con el respaldo de los paneles internacionales de evaluación de la genotipificación de la OMS, resueltos en el Laboratorio de Referencia de HPV del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS- Carlos G. Malbrán (FAGAN EJ y col, 2010).

El rendimiento específico de los ensayos no sólo depende de la técnica, sino también de la experticia del laboratorio en el procesamiento de la muestra (GRAVITT PE y col, 2008). La estandarización de los protocolos y técnicas para la caracterización de genotipos basados en la población es crucial tanto para las comparaciones internacionales como para la vigilancia después de la introducción de la vacuna contra el VPH.

En relación al diagnóstico citológico, el 93% de las pacientes incluidas en este estudio presentaron un diagnóstico de N-SIL, lo que es razonable porque fueron seleccionadas en consultorios externos de Patología Cervical, donde acuden de manera ordinaria para su control ginecológico anual. Sin embargo, en estas mujeres se observó una considerable frecuencia de los VPH-AR (11,9%). El valor es bastante más elevado, de lo observado en el estudio ATHENA en EEUU realizado en 32.260 mujeres de ≥ 30 años, con citología normal, en el que fue reportada una frecuencia de 6,7% para VPH-AR (WRIGHT TC y col, 2011). Esta diferencia podría estar relacionada principalmente a que

nuestro grupo incluía algunas mujeres menores de 30 años, lo que podría haber aumentado la frecuencia de la infección.

Diversos estudios han demostrado que aún con un adecuado control de calidad, la citología convencional tiene, en promedio, una sensibilidad del 53% (IC_{95%} 48,6–57,4%) (NANDA K y col, 2000). En países en desarrollo, en general, la prueba de Papanicolaou ha demostrado ser ineficiente (CHU y col, 2007; ALMONTE M y col, 2010), debido generalmente al muestreo inadecuado de los especímenes (RAAB y col, 2008), mala fijación, observadores con entrenamiento insuficiente (TWOREK y col, 2007) y al excesivo número de extendidos observados por el citotecnólogo en cada jornada laboral. La consecuencia es un número muy elevado de resultados falsos negativos (DEMAY RM, 1996). Vinculado con esto, la falta de estandarización, da lugar a una considerable variabilidad intra e inter-observador.

El hecho de que la mayoría de las pacientes infectadas, aún con VPH-AR no progresen a CCU, indica que la presencia viral, si bien es necesaria, no es suficiente para general la neoplasia; otros factores contribuirían para la transformación maligna. Se han considerado entre ellos a la multiparidad, las coinfecciones con otras ITS, factores del hospedador vinculados con la respuesta inmune y la acción hormonal, el tabaquismo, estado nutricional, entre otros (MUÑOZ N y col, 2006; ANTTILA T y col, 2001; BOSCH X y col, 2002; MORENO V, 2002; CASTELLSAGUÉ X y col, 2003).

La mayoría de las mujeres refirió haber cursado estudios secundarios o más; sin embargo, estaban dedicadas a quehaceres domésticos sin contar con otro empleo formal. El rango de edad de inicio de las relaciones sexuales fue de 12 a 35 años. La moda para el número de parejas sexuales fue de uno y para la paridad, la moda fue de dos hijos. El 60% de las pacientes tenía una prueba de Papanicolaou realizada en el último año.

Se observó una marcada disminución en la infección por VPH con la edad. Estos resultados son consistentes con investigaciones anteriores que han demostrado que la prevalencia del VPH en mujeres con citología normal disminuye con la edad, siendo las mujeres <25 años las que tienen tasas sustancialmente más altas (SANJOSÉ S y col, 2007; BOSCH X y col, 2008; HIBBITTS S y col, 2008). Se ha sugerido que las células cervicales son más susceptibles a la infección por VPH a edades tempranas (MUÑOZ N y col, 1994). Además, entre las mujeres más jóvenes, la mayor actividad sexual y la menor probabilidad de parejas estables, constituyen un fuerte predictor de la infección.

Diversos estudios han encontrado asociación entre el mayor número de parejas sexuales y el inicio precoz de las relaciones sexuales con la adquisición de la infección por VPH, enfatizando el probable rol de estos factores en la transición de la infección a la

persistencia y el probable desarrollo de lesiones neoplásicas (VACCARELLA S y col, 2006). Sin embargo, en este trabajo no se ha podido establecer una asociación significativa entre la infección por VPH y estos dos factores; eso podría deberse a que la gran mayoría de las mujeres refirió haber tenido dos o menos parejas sexuales y una cantidad considerable de ellas declaró haber iniciado su vida sexual después de los 16 años.

En Asunción la prevalencia de VPH fue significativamente mayor que en las otras localidades ($p=0,004$). Si bien no se observó una marcada diferencia entre el número de parejas sexuales y la edad del inicio de las relaciones sexuales entre mujeres de la capital y de localidades más pequeñas, se ha descrito en trabajos previos que las poblaciones urbanas y rurales muestran diferencias socioeconómicas y psicosociales (estilo y calidad de vida) que podrían explicar de alguna manera este resultado (SHARMA K y col, 2015; VAMOS CA y col, 2015).

La asociación entre el uso de anticonceptivos hormonales y la infección por VPH encontrada en el presente trabajo fue bastante débil ($p=0,049$). Se ha propuesto que estrógenos o progestágenos aumentan la expresión de genes del VPH en el cuello uterino a través de receptores de progesterona y elementos de respuesta a hormonas en el genoma viral (MUÑOZ N y col, 2006). Un meta-análisis halló que en las usuarias de anticonceptivos hormonales el riesgo de CCU aumenta con la duración de su uso y que dicho riesgo disminuye una vez que se interrumpe su utilización (BERAL V y col, 2007). Sin embargo, aunque numerosos estudios proveen una fuerte evidencia de la relación causal del uso de anticonceptivos hormonales y el CCU, debe tenerse en cuenta que la mayoría de los datos disponibles corresponden al uso de anticonceptivos orales de primera generación, que difieren a los utilizados actualmente (ALMONTE M y col, 2008).

Existe evidencia sobre el papel de otras ITS como cofactores para el desarrollo del CCU en mujeres VPH positivas. En la población estudiada se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la infección por VPH-AR y el antecedente de ITS ($p=0,024$). Numerosos trabajos han considerado que las coinfecciones producidas por otras ITS, tales como el virus Herpes simple tipo 2 (HVS-2) y *Chlamydia trachomatis* (CT) predisponen al desarrollo del CCU en mujeres con infecciones persistentes de VPH-AR. Se ha demostrado que las infecciones por HVS-2 y CT generan una respuesta inflamatoria, asociada con la liberación de radicales libres que producen inestabilidad genética (CASTLE PE y col, 2006). Otros microorganismos, como *Gardnerella* sp, *Candida* sp, *Trichomonas* sp, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Treponema pallidum* han sido asociados con procesos inflamatorios en el cuello uterino, hecho que podría facilitar la entrada del VPH (ROETERS AM y col, 2010; OLIVEIRA FA y col, 2007) y desfavorecer la respuesta inmune.

En relación a la educación, diversos autores han informado que el menor nivel de formación estaría asociado a un mayor riesgo de infección por VPH y presencia de lesiones (FRANCESCHI S y col, 2011), aunque no existe consenso pleno. No se ha encontrado una asociación de un bajo nivel educativo y/o falta de empleo formal con la infección por VPH-AR en la población estudiada; a pesar de que se ha descrito que mujeres procedentes de entornos más desfavorecidos son más renuentes a acudir a los servicios de control cervical, probablemente por un menor conocimiento sobre los factores de riesgo del CCU (BAKER D y col, 2003). Nuestros datos son coincidentes con lo descrito por Deluca y col, en un estudio realizado en una comunidad de Formosa (Argentina), donde no se encontró relación entre el nivel educativo alcanzado con la infección por VPH, aunque sí se describió un riesgo relativo aumentado en mujeres con algún grado de educación formal (DELUCA G y col, 2012). En este contexto, es oportuno recordar que este trabajo se llevó a cabo en un ámbito hospitalario, sobre una población frecuentemente monitoreada que; por lo tanto, no representaría a las mujeres más carenciadas. Debe tenerse en cuenta además que la privación social se ha asociado más frecuentemente con la incidencia del CCU (CURRIN LG y col, 2009), pero se sabe menos en qué medida esta privación se correlaciona con la infección por VPH.

Hay datos controvertidos sobre el hábito de fumar y su efecto sobre la carcinogénesis inducida por el VPH. Se ha especulado que una posible reducción de la respuesta inmune en el cuello uterino inducida por el tabaco podría afectar al metabolismo de las hormonas femeninas o bien producir un daño directo a través de la generación de nitrosaminas carcinogénicas en el flujo vaginal (MUÑOZ N y col, 2006). Solo un pequeño porcentaje de las pacientes estudiadas refirieron ser fumadoras, no encontrándose relación entre este hecho y la infección por VPH, coincidentemente a lo hallado por Yetimalar y col (YETIMALAR H y col, 2012).

Es importante recalcar que las pacientes con citología negativa y VPH-AR positivo podrían haber sido sub-diagnosticadas en ausencia de esta última prueba. Se sabe que la infección por VPH-AR es muy común, y la mayoría de las mujeres controlan la infección con el tiempo; sin embargo, aproximadamente en el 15% de las pacientes el virus permanece activo. Se ha estimado que el 10% de pacientes con citología negativa y VPH-AR positivo pueden desarrollar lesiones graves en un período de 6 años (DILLNER J y col, 2008). Estas mujeres deben recibir un seguimiento más estricto, ya que la infección persistente con un VPH-AR constituye es el principal factor de riesgo para desarrollar CCU, (STANLEY M y col, 2007; LIAW K y col, 2001; MAYRAND M y col, 2007).

El VPH-16 fue el virus predominante dentro de las infecciones por VPH-AR encontradas en este trabajo. Ha sido ampliamente comprobada la mayor tendencia del

VPH-16 de producir infecciones persistentes e inducir lesiones con mayor riesgo de progresión maligna en relación a otros VPH-AR (KHAN MJ y col, 2005; CASTLE PE y col, 2005). Se ha demostrado que mujeres con citología normal e infección persistente por VPH-16 poseen aproximadamente un 30% de probabilidad de desarrollar lesiones graves en un período de doce meses (KJAER SK y col, 2010). Debido a ello, la utilización de una prueba de detección de ADN de VPH-AR que identifique separadamente los VPH-16 y 18 brindaría un valor adicional al permitir identificar grupos de mujeres con mayor riesgo a desarrollar lesiones graves y CCU, quienes deberían ser sometidas a controles periódicos más rigurosos.

Llama la atención un caso positivo para VPH-AR por Cobas que en la genotipificación por PCR-RLB solo se identificó VPH-6. Esto podría deberse a que la muestra original presentaba una co-infección con VPH-AR, en bajo número de copias, junto con VPH6, no detectable por cobas porque no incluye sondas para VPH-BR; o porque algún tipo de deterioro de la muestra habría impedido la detección del virus minoritario (UNGER ER y col, 2009).

Como era de esperar, en las muestras con citología L-SIL procesadas por cobas se observó un 56% de resultados VPH negativos. Es probable que se trate de infecciones producidas por VPH-BR, muy frecuentes en estas lesiones que no son detectadas por este sistema.

Por otro lado, hubo un 20% de muestras H-SIL que llamativamente resultaron negativas por Cobas, ya que era esperable que fueran portadoras de VPH-AR. Esto puede deberse a un problema vinculado con un muy bajo número de copias, aunque no puede descartarse que se trate de un probable error en el diagnóstico citológico, ya que varios autores han descrito un 15% de falsos positivos (CARVALHO MO y col, 2005; MORRISON H y col, 1993).

Por lo expuesto, resulta de gran importancia realizar un cuidadoso seguimiento a las mujeres positivas para VPH-AR, lo que incluye estudios adicionales para confirmar la presencia de lesiones que puedan evolucionar a CCU. Por otro lado, en armonía con estudios previos, las mujeres negativas para VPH-AR tienen casi nula probabilidad de desarrollar lesiones de alto grado en los próximos 5 años (DILLNER J y col, 2008; SHERMAN ME y col, 2003; MESHER D y col, 2010). Este elevado valor predictivo negativo de la prueba virológica permite espaciar el intervalo de control a al menos 5 años, lo que ahorra recursos al sistema de salud, además de brindar una gran tranquilidad a este grupo de mujeres.

6. CONCLUSIONES

1) Este estudio aporta los primeros datos sobre la implementación de técnicas moleculares para detección y tipificación de VPH como parte del sistema de salud pública de Paraguay.

2) La alta frecuencia de infección por VPH-AR encontrada en pacientes con citología normal, similar a la hallada en otros países de la región, representa información de valor a la hora de decidir políticas sanitarias de prevención de lesiones precancerosas y CCU. Este hallazgo explicaría en parte, la elevada incidencia de esta neoplasia en Paraguay.

3) Los tipos viales hallados coinciden con los informados en otras regiones del mundo. El tipo más frecuente fue el VPH-16; seguido, en orden decreciente, por el VPH-31, 39, 58 y 33; el VPH-18 se ubicó en el sexto lugar. El predominio de VPH-16, confirma la amplia circulación de este virus a nivel mundial y dado su mayor potencial oncogénico, señala una alerta a considerar, en especial en las mujeres por encima de los 30 años portadoras de una infección persistente.

4) La curva unimodal de prevalencia de VPH en función de la edad, confirma que en las mujeres muy jóvenes (menores de 25 años) la mayor detección viral se vincularía con la proximidad a su debut sexual, situación que incrementa la chance de exposición al virus. La disminución progresiva de la presencia viral en mujeres mayores de 30 años se debería al carácter auto-limitado y el control inmune. Asimismo, se reafirma la relevancia clínica de aquellas infecciones por VPH-AR que se presentan en las mujeres mayores de 30 años, que muestran mayor tendencia a persistir.

5) Las asociaciones significativas halladas entre la infección por VPH-AR y la edad de la paciente ($p=0,0002$), el lugar de residencia ($p=0,004$), el uso de anticonceptivos hormonales ($p=0,049$) y el antecedente de infecciones de transmisión sexual ($p=0,024$) remarcan la importancia de las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos en la adquisición y curso de la infección por VPH.

En resumen, estos datos apoyan la importancia de la implementación criteriosa y la utilización apropiada de las pruebas moleculares actualmente disponibles para la prevención y control del CCU. Su uso en el contexto de programas nacionales como tamizaje primario podría significar una herramienta de gran valor y ayuda para la óptima selección del tratamiento y seguimiento de las mujeres. Esto brinda un escenario sumamente promisorio en cuanto a las posibilidades de mejorar el manejo clínico de las pacientes con patología cervical y la prevención del CCU.

7.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A, Safaeian M, Astemborski J, Daniel R, Shah K. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis.* 2001;15;184(6):682-90.
2. Almonte M, Murillo R, Sánchez G, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, et al. Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Sal Pub Mex.* 2010; 52 (6): 544-59.
3. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ and Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine.* 2008;26:L16-L36.
4. Almonte M, Murillo R, Sánchez G, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, et al. Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Sal Pub Mex.* 2010; 52 (6): 544-59.
5. Anis EA, O'Neill SH, Newkirk KM, Brahmabhatt RA, Abd-Eldaim M, Frank LA, Kania SA. Molecular characterization of the L1 gene of papillomaviruses in epithelial lesions of cats and comparative analysis with corresponding gene sequences of human and feline papillomaviruses. *Am J Vet Res.* 2010;71(12):1457-61.
6. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikäheimo I et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *Jama.* 2001;285(1):47-51.
7. Arbyn M, Rebolj M, De Kok IM, Fender M, Becker N, O'Reilly M, et al. The challenges of organizing cervical screening programmes in the 15 old member states of the European Union. *Eur J Cancer.* 2009; 45(15): 2671-8.
8. Armstrong N, Foley G, Wilson J, Finan P and Sebag-Monefiore D. Successful treatment of a large Buschke-Lowenstein tumour with chemo-radiotherapy. *Int J STD AIDS* 2009, 20: 732-34.
9. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer.* 2006;119:2105-12.
10. Avendaño LF, Ferrés M and Spencer E. *Virología Clínica.* Santiago, Chile, Editorial Mediterráneo, 2011. pp.188-91.
11. Baker D and Middleton E. Cervical screening and health inequality in England in the 1990s. *J Epidemiol Community Health.* 2003;57:417-23.
12. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology.* 2010;401(1):70-79.
13. Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A et al. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer: Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16.573 women with cervical cancer and 35.509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007; 370(9599):1609-21

14. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S1-6.
15. Bertram C. Evidence for practice: oral contraception and risk of cervical cancer. *J Am Acad Nurse Pract.* 2004;16:455-461.36.
16. Bosch, F. X., Manos, M. M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute.* 1995;87(11):796-802.
17. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ y Shah KV. The causal relation between papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:244-65.
18. Bosch FX and de Sanjosé S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Disease markers.* 2007;23(4):213-27.
19. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjosé S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Krugar Kjaer S, Munoz N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008;26S:K1–K16.
20. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ y Shah KV. The causal relation between papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:244-65.
21. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984;3:1151–57.
22. Boulet GAV, Micalessi IM, Horvath CAJ, Benoy IH, Depuydt CE and Bogers JJ. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay for Human Papillomavirus mRNA Detection and Typing: Evidence for DNA Amplification. *Journal of Clinical Microbiology.* 2010;48(7):2524-29.
- 23.(a) Bousarghin L, Touze A, Combita-Rojas AL, Coursaget P. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J. Gen. Virol.* 2003, 84:157-64.
- 24.(b) Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P. Human Papillomavirus Types 16, 31, and 58 Use Different Endocytosis Pathways To Enter Cells. *J Virol* 2003; 77: 3846-50.
25. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F et al. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group A review of human carcinogens – Part B: biologicals agents. *Lancet Oncol.* 2009;10:321-22.
26. Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX and de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *Journal of Infectious Diseases.* 2010;202(12):1789-99.
27. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infections. *Vaccine.* 2006;24(3):52-61.
28. Burd E.M. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):291-319.
29. Burger EA, Kornør H, Klemp M, Lauvrak V and Kristiansen IS. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecologic oncology.* 2011;120(3):430-38.

30. Campo, P, Puerto, M. Comparación entre las técnicas de citología compartida: convencional vs. base líquida. *Repertorio de Medicina y Cirugía*. 2011;20(4):240-44.
31. Cardozo Segovia FM, Mendoza Torres LP, Páez Acchiardi GM, Mongelós Dacunte PE, Castro Matto AM, Giménez Ortigoza G. Detección molecular de infecciones múltiples en mujeres con y sin lesión de cuello uterino positivas para el virus del papiloma humano de alto riesgo, período 2007-2011. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 2012 Dec; 10(2):05-12.
32. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16,18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000;181:1911-19.
33. Carter JJ, Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Cushing-Haugen KL, Wipf GC, et al. Human papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. *Cancer Res*. 2001;61:1934-40.
34. Carvalho MOO, Carestiato FN, Perdigão PH, Xavier MPPT, Silva KC, Botelho MO et al. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis*. 2005 Oct;9(5):398-404.
35. Castellsague X and Munoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:20-8.
36. Castellsague X, de Sanjose S, Aguado T, et al. HPV and cervical cancer in the world. 2007 Report. WHO/ICO Information Centre on HPV and cervical cancer (HPV Information Centre). *Vaccine*. 2007;25: C1–C230.
37. Castellsague X, Klaustermeier J, Carrilho C, et al. Vaccine-related HPV genotypes in women with and without cervical cancer in Mozambique: burden and potential for prevention. *Int J Cancer*. 2008;122:1901-04.
38. Castellsague X, Menendez C, Loscertales MP, et al. Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique. *Lancet* 2001;358:1429-1430.
39. Castellsagué, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2008;110(3):S4-S7.
40. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: The CLEOPATRE Study. *J Med Virol*. 2012;84(6):947-56.
41. Castellsague X and Munoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:20-8.
42. Castle PE and Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients-assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:29-34.
43. Castle PE, Schiffman M, Herrero R et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*. 2005; 191:1808-16.
44. Castle PE, Schiffman M, Burk RD, Wacholder S, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Lorincz A. Restricted cross-reactivity of Hybrid Capture 2 with non-oncogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11:1394–99.

- 45.Castle PE, Solomeno D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1066-71.
- 46.Castle PE, Jeronimo J, Schiffman M, Herrero R, Rodríguez AC, Bratti MC et al. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Research*. 2006;66(2):1218-24.
- 47.Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*, 1982, 299:529–534.
- 48.Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant, T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev*. 1995;9:2335–49.
- 49.Chu KC, Miller BA and Springfield SA. Measures of racial/ethnic health disparities in cancer mortality rates and the influence of socioeconomic status. *Journal of the National Medical Association*. 2007;99(10):1092.
- 50.Ciapponi GM, Bardach A, Gijovskiy D, Gibbons L, Picconi MA. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analyses. *PLoS One*. 2011;6:e25493.
- 51.Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;89:101-5.
- 52.(a) Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005; 14: 1157-64.
- 53.(b) Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJF, Vaccarella S, Anh PTH, Ferreccio C, Hieu NT et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005;366: 991-998.
- 54.Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryaik BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol*. 1994;102:768–74.
- 55.Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66:407-25.
- 56.Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*. 2013;445: 21-34.
- 57.Currin LG, Jack RH, Linklater KM, Mak V, Møller H, Davies EA. Inequalities in the incidence of cervical cancer in South East England 2001–2005: An investigation of population risk factors. *BMC Public Health*. 2009.9:62
- 58.Cuschieri K and Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2008;17(10):2536-45.
- 59.Cuzick J, Bergeron C, von Knebel Doeberitz M, Gravitt P, Jeronimo J, Lorincz AT et al. New technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine*.2012;30: F107-F116.

60. Cuzick J, Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Perryman K et al. Long-term follow-up of cervical abnormalities among women screened by HPV testing and cytology—Results from the Hammersmith study. *International journal of cancer*. 2008;122(10):2294-2300.
61. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *The EMBO Journal*. 1982;1(2):231-236.
62. De Villiers EM, Gissmann L, Zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol*, 1981; 40:932–935.
63. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010;2:15.
64. De Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N and Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2007;7(7): 453-9.
65. De Villiers EM, Fauquet C, Broker T, Bernard H, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004, 324 (1): 17-24.
66. De Jong A, van der Burg SH, Kwapenberg KMC, van der Hulst JM, Franken KLMC, Geluk A, et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res*. 2002;62:472–79.
67. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S: Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009;124:1626–36.
68. Deluca GD, Basiletti J, González JV, Vásquez ND, Lucero RH and Picconi MA. Human papilloma virus risk factors for infection and genotype distribution in aboriginal women from Northern Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 2012;72(6).
69. DeMay RM. Cytopathology of false negatives preceding cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175:1110-13.
70. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study *BMJ*. 2008; 337.
71. DiMaio D and Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*. 2001;20(54):7866-73.
72. Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf E, Hartley O, Propero T et al. Characterisation of events during the late stages of HPV 16 infection in vivo using high affinity synthetic fabs to E4. *Virology*. 1997;238:40-52.
73. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 2006, 110: 525-41.
74. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and lifecycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: 55-70.
75. Durst, M, Gissmann, L, Ikenberg, H, zur Hausen, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *PNAS*. 1983, 80.

76. Eiguchi K, Tatti S, Alonio LV, González JV, Leiros GJ, Fleider L, Picconi MA. Association of DRB1 and DQB1 HLA class II polymorphisms in high-grade and neoplastic cervical lesions of women from Argentina. *Journal of lower genital tract disease*. 2008;12(4):262-8.
77. Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Zhou T and Dillner J. The 2010 global proficiency study of human papillomavirus genotyping in vaccinology. *Journal of clinical microbiology*. 2012;JCM-00840.
78. Estrade C, Menoud PA, Nardelli-Haeffliger D, Sahli R: Validation of a low-cost human papillomavirus genotyping assay based on PGMY PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. *J Clin Microbiol*. 2011; 49 (10): 3474-3481.
79. Fagan EJ, Moore C, Jenkins C, Rossouw A, Cubie HA, James VL. External quality assessment for molecular detection of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2010; 48: 251–4.
80. Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomaviruses: general features. *Clin dematol* 1997; 15:180-98.
81. Ferreccio C, Prado R, Luzoro A. Prevalencia poblacional y distribución por edad del virus papiloma humano entre mujeres en Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile. *Boletín Escuela de Medicina* 2005. 30 (1): 34-9.
82. Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM y Brown DR. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J. Med. Virol*. 2001;64:550-59.
83. Fu YS, Cheng L, Huang I, Huang S, Wiesmeier E, Wettstein F, Weissman M. DNA ploidy analysis of cervical condyloma and intraepithelial neoplasia in specimens obtained by punch biopsy. *Anal Quant Cytol Histol*. 1989;11(3):187–95.
84. García-Piñeres AJ, Hildesheim A, Herrero R, Trivett M, Williams M, Atmetlla I et al. Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. *Cancer Res*. 2006;66(22):11070-6.
85. Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa L, Nolan T, Marchant C, Radley D et al. Impact of baseline covariates on the immunogenicity of a quadrivalent (types 6, 11, 16, and 18) human papillomavirus virus-like-particle vaccine. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(8):1153-62.
86. Gissmann, L, zur Hausen, H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int. J. Cancer*. 1980, 25:605–609.
87. GLOBOCAN 2012. International Agency for Research on Cancer. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. WHO. 2012. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/>
88. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2000; 38(1): 357-61.
89. Gravitt PE, Coutlee F, Iftner T, Sellors JW, Quint WG, Wheeler CM. *New technologies in cervical cancer screening. Vaccine* 2008;26(suppl 10):K42-K52.
90. Hakama M, Louhivuori K. A screening programme for cervical cancer that worked. *Cancer Surv*. 1988; 7(3): 403-16.
91. Hebner CM, Laimins LA: Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006;16: 83–97.
92. Hemminki K, Dong C and Vaittinen P. Familial risks in cervical cancer: is there a hereditary component?. *International journal of cancer*. 1999;82(6):775-81.

93. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *Journal of infectious diseases*. 2005;191(11):1796-1807.
94. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:464-74.
95. Ho GYF, Burk RD, Klein S et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1365–71.
96. Hovland S, Arbyn M, Lie AK, Ryd W, Borge B, Berle E J et al. A comprehensive evaluation of the accuracy of cervical pre-cancer detection methods in a high-risk area in East Congo. *British journal of cancer*. 2010;102(6):957-965.
97. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Molecular and cellular biology*. 1993 Aug 1;13(8):4918-27.
98. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 119(5):1108-24.
99. Hibbitts S, Jones J, Powell N, Dallimore N, McRea J, Beer H, Tristram A, Fielder H, Fiander AN. Human papillomavirus prevalence in women attending routine cervical cancer screening in South Wales, UK: A cross-sectional study. *Br J Cancer*. 2008;99:1929–33.
100. Jochmus-Kudielka I, Schneider A, Braun R, Kimmig R, Koldovsky U, Schneeweis KE et al. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(22):1698-704.
101. Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev*. 1997;11:2101–11.
102. Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA et al. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *The Lancet*. 2007;369(9574):1693-1702.
103. Joura EA, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M et al. HPV antibody levels and clinical efficacy following administration of a prophylactic quadrivalent HPV vaccine. *Vaccine*. 2008;26(52):6844-51.
104. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem*. 1999; 274:5810–22
105. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A and Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. Receptor-independent/-associated viral tropism. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3(152):5-16.

106. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14): 1072-79.
107. Kirchhausen T. Clathrin. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 699-727.
108. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. Both RB/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* 1998;396:84-8.
109. Kjær SK, Frederiksen K, Munk C and Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *Journal of the National Cancer Institute.* 2010;102(19):1478-88.
110. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D and Smith JS. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *American journal of epidemiology.* 2008;168(2):123-37.
111. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997;102 (5):3-8.
112. Kovacic MB, Castle PE, Herrero R, et al. Relationships of human papillomavirus type, qualitative viral load, and age with cytologic abnormality. *Cancer Res.* 2006;66:10112-119.
113. Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene.* 1992;7:19–25.
114. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer,* 2010, 128: 927-935.
115. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *Journal of Infectious Diseases.* 2001;183(1):8-15.
116. Longworth MS and Laimins LA. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 2004;78:3533-41.
117. Madison KC. Barrier function of the skin “la raison d’être” of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003;121:231-41.
118. Malagón T, Drolet M, Boily MC, Franco EL, Jit M, Brisson J et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases.* 2012;12(10):781-789.
119. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR and Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer cells.* 1989;7(17):209-14.
120. Manual Nacional de Normas y Procedimiento para la Prevención y el Control del Cáncer de Cuello Uterino. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Paraguay, 2010.

121. Marty R, Roze S, Bresse X, Largeron N and Smith-Palmer J. Estimating the clinical benefits of vaccinating boys and girls against HPV-related diseases in Europe. *BMC cancer*. 2013;13(1):1.
122. Matos E, Loria D, Amestoy GM, Herrera L, Prince MA, Moreno J et al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection Among Women in Concordia, Argentina: A Population-Based Study. *Sexually transmitted diseases*. 2003;30(8):593-99.
123. Mayrand M, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1579-88.
124. McFarlane N, Bazuaye PE, Jackson MD, Smikle M, Fletcher HM. Cervical Dysplasia and cancer and the use of hormonal contraceptives in Jamaica. *BMC Women Health*. 2008; 30: 8-9
125. Mendoza LP, Arbiza J, Páez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G et al. Características clínico-demográficas y tipificación del virus de papiloma humano en mujeres paraguayas con citologías negativas para lesión escamosa intraepitelial. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. 2012;10:46-55.
126. Merle E, Rose RC, LeRoux L and Moroianu J. Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin alpha2beta1 heterodimers. *J Cell Biochem*. 1999;74(4):628-37.
127. Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, Guissmann L, Pawlita M. Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J. Clin. Microbiol*. 1998;36:457-80.
128. Mesher D, Szarewski A, Cadman L, Cubie H, Kitchener H, Luesley D et al. Long-term follow-up of cervical disease in women screened by cytology and HPV testing: results from the HART study. *British journal of cancer*. 2010;102(9):1405-10.
129. Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, Castellsagué X, Bosch FX, de Sanjosé S: Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol*. 2009;62:870–8.
130. Molano M, Posso H, Weiderpass E, Van den Brule AJ et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*. 2002;87:324-33.
131. Monsonego J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjänen K, Halfon P et al. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: The FASE study. *International Journal of Cancer*. 2011;129(3):691-701.
132. Monsonego J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjänen K and Smith JS. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (the FASE study). *Gynecologic oncology*. 2012;125(1):175-180.
133. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers IM et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: The IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359:1085-92.
134. Morrison H. Human papillomavirus absence predicts normal cervical histopathologic findings with abnormal papanicolaou smears. *J Hum Virol* 1993; 4: 283-7.
135. Moscicki AB, Shiboski S, Hill NK. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesion in young women. *Lancet*. 2004;364:1678-83.

136. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology*. 2004 Nov 1;78(21):11451-60.
137. Muñoz N, Castellsagué X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24(suppl 3):S1-S10.
138. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S and Shah KV. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1994;305(2):293-301.
139. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD and Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Annals of internal medicine*. 2000;132(10): 810-19.
140. Nelson, L. M., R. C. Rose and J. Moroianu. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J. Biol. Chem*. 2002;277:23958-64.
141. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC rich Sp1 binding sites. *J Virol*. 2001;75:5559-66.
142. Oliveira FA, Pflieger V, Lang K, Heukelbach J, Miralles I, Fraga F et al. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(6):751-56.
143. O'Neill SH, Newkirk KM, Anis EA, Brahmbhatt R, Frank LA and Kania SA. Detection of human papillomavirus DNA in feline premalignant and invasive squamous cell carcinoma. *Veterinary Dermatology*. 2011;22: 68–74.
144. Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelska M, Rzesza G. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesion of epidermodysplasia verruciformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978, 75:1537-1541.
145. Östör, AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International Journal of Gynecological Pathology*. 1993;12(2):186.
146. Ozbun MA and Mayers C. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 1998;72:2715-22.
147. Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:41-6.
148. Picconi MA. Detección de virus papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino. *Buenos Aires: Medicina*. 2013;73(6): 585-96.
149. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijder P, Bosch X et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control*. 2003; 14 (9):805-14
150. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available tests for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Exp Rev Anti Infect Ther*. 2010;8:1139–62.
151. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J and Arbyn M. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30:F100-F106.

152. Quint W, Jenkins D, Molijn A, Struijk L, Van der Sandt M, Doobar J, Mols J, Van Hoof C, Hardt K, Struyf F, Colau B. One virus, one lesion – individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol.* 2012;May227(1):62-71.2
153. Raab SS, Jones BA, Souers R, Tworek JA. The effect of continuous monitoring of cytologic-histologic correlation data on cervical cancer screening performance. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:16-22.
154. Reisinger KS, Block SL, Lazcano-Ponce E, Samakoses R, Esser MT, Erick J et al. Safety and persistent immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 L1 virus-like particle vaccine in preadolescents and adolescents: a randomized controlled trial. *The Pediatric infectious disease journal.* 2007;26(3):201-209.
155. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, Coutlée F, Franco EL. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Jun;12(6):485-90.
156. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Ann.* 1973;8:301-28.
157. Rijkaart DC, Heideman DAM, Coupe VMH et al. High-Risk Human Papillomavirus (hrHPV) E6/E7 mRNA Testing by PreTect HPV-Proofer for Detection of Cervical High-Grade Intraepithelial Neoplasia and Cancer among hrHPV DNA-Positive Women with Normal Cytology. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012;50(7):2390-2396.
158. Ripabelli G, Grasso G, Del Riccio I, Tamburro M, Sammarco M. Prevalence and genotype identification of human papillomavirus in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Molise, Central Italy. *Cancer Epidemiology.* 2010;34(2):162-7.
159. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:513-17.
160. Roeters AM, Boon ME, van Haaften M, Vernooij F, Bontekoe T and Heintz APM. Inflammatory events as detected in cervical smears and squamous intraepithelial lesions. *Diagnostic cytopathology.* 2010;38(2): 85-93.
161. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H e Inoue M. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2001;10:45-52.
162. Sasieni P, Adams J. Effect of screening on cervical cancer mortality in England and Wales: analysis of trends with an age period cohort model. *BJM.* 1999; 318(7193): 1244-5.
163. Schiller JT, Day PM and Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology.* 2010;118:S12-S17.
164. Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL and Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine.*2008;26:K53-K61.
165. Schiffman M, Clifford G y Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer.* 2009;4:8.
166. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC and Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet.* 2007;370(9590):890-907.

167. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillén D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005, 337:76-84.
168. Schwarz E, Durst M, Demankowski C, Lattermann O, Zech R, Wolfspurger E, Suhai S, zur Hausen H. DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J*, 1983, 2:2341–2348.
169. Sharma K, Kathait A, Jain A, Kujur K, Raghuwanshi S, Bharti AC, Saklani AC y Das BC. Higher prevalence of human papillomavirus infection in adolescent and young adult girls belonging to different Indian tribes with varied socio-sexual lifestyle. *PlosS One*. 2015 May 8;10(5):e0125693.
170. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(1):46-52.
171. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J. Exp. Med.* 1933, 58:607-624.
172. Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL and Villa LL. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *International journal of cancer*. 2007;120(8):1763-68.
173. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R and Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International journal of cancer*. 2007;121(3): 621-632.
174. Snijders PJF, Heideman DAM, Meijer CJLM. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. *APMIS* 2010; 118: 520–528.
175. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N, Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop: The Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;267(16):2114-19.
176. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006;24(S1):S16–22.
177. Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*. 2009;130:266-76.
178. Stanley MA and Sterling JC. Host responses to infection with human papillomavirus. In *Human Papillomavirus*. Karger Publishers. 2014; (Vol. 45):58-74.
179. Stanley M, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:1456-60.
180. Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol*. 1995;69:3185–92.
181. Syrjänen, S. "The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers." *Annals of oncology*. 2010;21(S7):243-45.
182. Szarewski A, Jarvis MJ, Sasieni P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ et al. Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet*. 1996;347(9006):941–3.
183. Tabrizi SN. Quality assessment for human papillomavirus testing. *Sex Health* 2010; 7: 335–7.

184. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*. 2003 Feb 27;22(8):1225-37.
185. Thun MJ, Apicella LF, Henley SJ. Smoking vs other risk factors as the cause of smoking-attributable deaths: confounding in the courtroom. *JAMA*. 2000;284:706-12.
186. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24(1):4-15.
187. Tworek JA, Jones BA, Raab S, Clary KM, Walsh MK. The value of monitoring human papillomavirus DNA results for Papanicolaou tests diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance: a College of American Pathologists Q-Probes study of 68 institutions. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:1525-31.
188. Unger ER et al. World Health Organization. Human papillomavirus Laboratory Manual. 1st ed. HPV Laboratory Network, WHO: Switzerland. 2010.
189. Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders PJ, Meijer CJ, Thomas JO et al. Reproductive factors, oral contraceptive use and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(11):2148-53.
190. Vamos CA, Calvo AE, Daley EM, Giuliano AR y López Castillo H. Knowledge, Behavioral, and Sociocultural Factors Related to Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Screening Among Inner-City Women in Panama. *J Community Health*. 2015 Dec;40(6):1047-56.
191. Van der Graaf Y, Molijn A, Doornwaard H, Quint W, Van Doorn LJ y Van den Tweel J. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am. J. Epidemiol*. 2002;156:158-64.
192. Van Doorslaer K. Evolution of the papillomaviridae. *Virology*. 2013;445(1-2):11-20.
193. Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ and van de Wijgert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *The Lancet infectious diseases*. 2010;10(12):862-74.
194. Vilos GA. The history of the Papanicolaou smear and the odyssey of George and Andromache Papanicolaou. *Obstet Gynecol*. 1998, 479-83
195. Von Krogh G. Management of anogenital warts (condylomata acuminata). *European Journal of Dermatology*. 2001;11(6):598-604.
196. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-9.
197. Wellings K, Collumbien M, Slaymaker E et al. Sexual behavior in context: a global perspective. *Lancet*. 2006;368:1706-28.
198. Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwammenberg KM, Hassane S, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* 2003;63:636–41.
199. Wentzensen N, Vinokurova S and von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer research*. 2004 Jun 1;64(11):3878-84.
200. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function and features. *Virus Genes*. 2002;24: 275-90.

201. Woodman CBJ, Collins S and Young L. "The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues." *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(1):11-22.
202. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*. 2001 Jun 9;357(9271):1831-6.
203. Wooldridge TR y Laimins LA. Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. *Virology*. 2008;374(2), 371-80.
204. Wright TC, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C and Wright TL. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *American journal of clinical pathology*. 2011;136(4):578-86.
205. Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(1):4-10.
206. Yetimalar H, Kasap B, Cukurova K, Yildiz A, Keklik A and Soylu F. Cofactors in human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2012;285(3):805-810.
207. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with BRD4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*. 2004;117: 349-60.
208. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996;13:2323-30.
209. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst*. 2000;92:690-98.