

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO  
DETECTADO EN CUELLO UTERINO DE MUJERES INDÍGENAS DEL  
DEPARTAMENTO DE PRESIDENTE HAYES-PARAGUAY, PERIODO 2010/2011**

**PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE**

**Tesis presentada al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica y Dirección General de Postgrado de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Biomédicas.**

**ASUNCIÓN-PARAGUAY**

**FEBRERO-2013**

Universidad Nacional de Asunción  
Dirección General de Postgrado  
Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica  
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

Epidemiología molecular del virus del papiloma humano detectado en cuello uterino de mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes-Paraguay, periodo 2010/2011

Trabajo de tesis para optar al título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Autor: Pamela Esther Mongelós Dacunte.

Directora de Tesis: Prof. Dra. (PhD, MSc) Laura Patricia Mendoza Torres.

Co-Directora de Tesis: Prof. Dra. (MSP) Gloria Malvina Páez Bruno.

ASUNCIÓN

2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Catalogado por: Biblioteca del IICS

Mongelós, Pamela

Epidemiología molecular del Virus del Papiloma Humano detectado en cuello uterino de mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes - Paraguay, periodo 2010-2011/ Mongelós, Pamela; Tutor: Laura Patricia Mendoza Torres. Co Tutora: Gloria Malvina Páez Bruno.-- Asunción : UNA. Dirección General de Posgrado. Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica. IICS, 2013.

84 p. : il.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) -- IICS, 2013

1. Tipificación molecular. 2. HPV. 3. Mujeres.
4. Población indígena. I. Título

CDD (ed. 18ª) 616.0194

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO  
DETECTADO EN CUELLO UTERINO DE MUJERES INDÍGENAS DEL  
DEPARTAMENTO DE PRESIDENTE HAYES-PARAGUAY, PERIODO 2010/2011**

Pamela Esther Mongelós Dacunte

Aprobado en fecha 22 de febrero de 2013.

Tribunal examinador:

Prof. Dra. Virginia Alonio

INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”-Arg

Prof. Dr. Antonio Cubilla

Instituto de Patología e Investigación -Py

Prof. Dra. Elena Kasamatsu

IICS/UNA-Py

Prof. Dra. Laura Mendoza.

Directora de tesis

## **Agradecimientos**

A Dios por ofrecerme una vida llena de bendiciones y oportunidades.

A mi familia por el constante apoyo, a mis padres y en especial a mi mamá, Rosa Carmen Dacunte, mi consejera, quien me enseñó a luchar por mis objetivos.

A la Dra. Laura Mendoza, por la confianza otorgada y por guiarme incondicionalmente durante el desarrollo de la tesis.

A mis compañeras del Dpto. de Salud Pública y Epidemiología, Dra. Amalia Castro, Bioq. Graciela Giménez, Lic. María Isabel Rodríguez, Bioq. Adriana Valenzuela y a la Dra. Malvina Páez; por el acompañamiento, apoyo y entrega incondicional en la ejecución de la presente tesis, ya que sin ellas el trabajo no hubiera sido posible.

A la Bioq. Patricia Araújo, también, por el apoyo y la entrega incondicional en el desarrollo de la presente tesis.

A la XV Región Sanitaria y al Hospital Regional de Villa Hayes del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, por el trabajo en equipo y el acompañamiento en las visitas a las comunidades indígenas.

Al Servicio Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”, Buenos Aires-Argentina, en especial a la Dra. María Alejandra Picconi, al Bioquímico Jorge Baseletti, a Joaquín González y a José Campos, por la hospitalidad, orientación y capacitación ofrecida durante mi estadía en su institución, así como también, por el continuo respaldo otorgado.

Al Dr. Gerardo Deluca, por el apoyo técnico brindado.

Al programa Pablo Neruda de la Red Iberoamericana de Biotecnología Isla Negra (RIABIN) por brindarme la oportunidad de realizar una pasantía académica en el Programa

de Doctorado de Biotecnología de la Universidad Técnica Federico Santa María y la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso; en especial a la Prof. Dra. Rosa Oviedo de Cristaldo, coordinadora de la RIABIN en Paraguay y al Prof. Dr. Michael Seeger, coordinador de la RIABIN en Chile.

A la Dra. Constanza Cárdenas, investigadora asociada al Núcleo de Biotecnología Curauma de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, por la ayuda ofrecida en el análisis de las secuencias de nucleótidos.

A la Dra. Margarita Samudio, por su colaboración y orientación en el análisis de datos.

Al Conacyt, por la beca de postgrado otorgada, que permitió mi dedicación al curso de Maestría.

La presente tesis está dedicada a mi abuela Romualda Ortega, quién aún vive en mis recuerdos. Demostraste lo bella que es la vida cuando optamos por Cristo como guía. Además, demostraste que, no es necesario tenerlo todo para disfrutar de la vida, sino que lo importante es nuestra actitud ante las diferentes circunstancias que ella nos presenta, inclusive en tiempos difíciles e inevitables.

Este trabajo fue financiado por: El Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y el Servicio Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”

## Índice

Ítem	Páginas
<b>Título:</b> Epidemiología molecular del virus del papiloma humano detectado en cuello uterino de mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes- Paraguay, periodo 2010/2011 _____	<b>1</b>
<b>Resumen</b> _____	<b>2</b>
<b>Abstract</b> _____	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b> _____	<b>4-25</b>
1.1 Generalidades _____	5
1.2 Estructura viral, genómica y organización _____	6-7
1.3 Clasificación viral _____	7-9
1.4 Ciclo de vida del HPV _____	10-12
1.5 Historia natural de la infección por HPV en el cuello uterino _____	13-15
1.6 Factores de riesgo asociados al cáncer de cuello uterino _____	16-17
1.7 Prevención y control _____	18-21
1.8 Epidemiología del cáncer de cuello uterino y tipos de HPV _____	22
1.9 Cáncer de cuello uterino y distribución de tipos de HPV en Paraguay _____	23
1.10 Población indígena _____	24-25
<b>2. Objetivos</b> _____	<b>26-27</b>
2.1 Objetivo general _____	27
2.2 Objetivos específicos _____	27
<b>3. Materiales y Métodos</b> _____	<b>28-38</b>
3.1 Diseño del estudio _____	29-31
3.2 Asuntos éticos _____	31-32
3.3 Detección y tipificación de HPV por métodos moleculares _____	32-37
3.4 Detección de lesión de cuello uterino por citología _____	38
3.5 Análisis estadístico _____	38
<b>4. Resultados</b> _____	<b>39-52</b>
4.1 Caracterización de la población analizada _____	40-41
4.2 Calidad de los templados _____	42
4.3 Detección del genoma de HPV _____	43-49
4.4 Diagnóstico citológico _____	49
4.5 Características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos citológicos de las mujeres indígenas incluidas en el estudio según presencia de infección por HPV _____	50-51
4.6 Distribución de infección por HPV según edad _____	52

<b>Ítem</b>	<b>Páginas</b>
<b>5. Discusión</b>	<b>53-64</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>65-67</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>68-69</b>
<b>8. Referencias bibliográficas</b>	<b>70-82</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>83-84</b>

## Lista de tablas

Tablas	Páginas
<b>Tabla 1.</b> Distribución de las 195 mujeres indígenas participantes del Departamento de Presidente Hayes, según etnia y comunidades_____	29
<b>Tabla 2.</b> <i>Primers</i> PGMY09/11biot y sus respectivas secuencias_____	36
<b>Tabla 3.</b> Características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de las mujeres indígenas incluidas en el estudio_____	41
<b>Tabla 4.</b> Frecuencia del virus del papiloma humano detectada en las 181 mujeres por PCR utilizando <i>primers</i> genéricos MY09/11 y PGMY09/11biot seguida de RLB._____	45
<b>Tabla 5.</b> Frecuencia del virus del papiloma humano en mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes, periodo 2010/2011_____	46
<b>Tabla 6.</b> Frecuencia de tipos de HPV detectados en 17 mujeres indígenas con infección viral múltiple del Departamento de Presidente Hayes, periodo 2010/2011_____	47
<b>Tabla 7.</b> Frecuencia de tipos de HPV en mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes_____	48
<b>Tabla 8.</b> Frecuencia de infecciones simples, múltiples y con tipos de HPV indeterminados en mujeres positivas para HPV_____	49
<b>Tabla 9.</b> Frecuencia de citología inflamatoria en mujeres indígenas negativas para lesión escamosa intraepitelial_____	49
<b>Tabla 10.</b> Frecuencia de mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes con antecedentes de diagnóstico citológico de cuello uterino, periodo 2010/2011_____	49
<b>Tabla 11.</b> Valores de medianas o medias de las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos observados en mujeres indígenas según la presencia de HPV_____	50

**Tablas****Páginas**

**Tabla 12.** Frecuencia de HPV según características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de 181 mujeres indígenas \_\_\_\_\_ 51

**Tabla 13.** Frecuencia de mujeres indígenas positivas para HPV según edad \_\_\_\_\_ 52

## Lista de figuras

<b>Figuras</b>	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del genoma del HPV 16_____	7
<b>Figura 2.</b> Árbol filogenético de los papilomavirus basado en el ORF de la región L1 _____	8
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida del HPV _____	10
<b>Figura 4.</b> Imagen de la zona de transformación _____	11
<b>Figura 5.</b> Historia natural de la infección por HPV en el cuello uterino _____	13
<b>Figura 6.</b> Mapa de ubicación de las comunidades indígenas _____	30
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de los productos de amplificación obtenidos por PCR utilizando <i>primers</i> PCO4 y GH20 _____	42
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de los productos de amplificación obtenidos por PCR utilizando <i>primers</i> genéricos MY09/11 _____	43
<b>Figura 9.</b> Detección y tipificación del HPV por PCR PGMY09/11biot seguida de RLB _____	44
<b>Figura 10.</b> Alineamiento por BLAST de una secuencia de nucleótidos parcial del gen L1. _____	46
<b>Figura 11.</b> Frecuencia de infección por HPV según edad _____	52

## Lista de Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxirribunucleico.

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool.*

**CDC:** *Center of Disease Control and Prevention.*

**CIN:** Neoplasia intraepitelial cervical.

**CIN I:** Neoplasia intraepitelial cervical de grado I.

**CIN II:** Neoplasia intraepitelial cervical de grado II.

**CIN III:** Neoplasia intraepitelial cervical de grado III .

**CT:** *Chlamydia trachomatis.*

**DGEEC:** Dirección General de Encuestas Estadísticas y Censos

**Dpto.:** Departamento.

**EMA:** Agencia Europea de Medicamentos.

*et ál.:* Abreviatura de la expresión en latín *et alii*, que significa y otros.

**FDA:** *Food and Drug Administration.*

**HIV:** Virus de inmunodeficiencia humana.

**HPV:** Virus del papiloma humano.

**HR-HPV:** Virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico.

**HSIL:** Lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

**HVS-2:** Virus de herpes simple-tipo 2.

**IC:** Intervalo de confianza.

**IICS:** Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.

**LEEP:** siglas en inglés de procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa.

**LR-HPV:** Virus del papiloma humano de bajo riesgo oncogénico.

**LSIL:** Lesión escamosa intraepitelial de bajo riesgo.

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information.*

**NSIL:** Ausencia de lesión escamosa intraepitelial.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ORF:** siglas del inglés de *Open reading frame*, que significa marco de lectura abierto.

**PAP:** Papanicolaou.

**pb:** Pares de bases.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PCR-CHUV:** Reacción en cadena de la polimerasa que utiliza *primers*

PGMY09/11biot, generando productos de amplificación

biotinalados, los cuales pueden ser tipificados por

hibridación reversa en línea.

**RFLP:** Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

**RLB:** Hibridación lineal reversa.

**UNA:** Universidad Nacional de Asunción.

**URR:** *Upstream regulatory region.*

**USA:** Siglas en inglés de Estados Unidos de América.

**VLP:** *Virus like particles.*

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO  
DETECTADO EN CUELLO UTERINO DE MUJERES INDÍGENAS DEL  
DEPARTAMENTO DE PRESIDENTE HAYES-PARAGUAY, PERIODO 2010/2011**

## **Resumen**

El Paraguay ocupa el séptimo lugar en incidencia de cáncer de cuello uterino en las Américas y el Caribe, siendo el virus del papiloma humano (HPV) su agente causal. Considerando que las mujeres indígenas poseen menor acceso a sistemas de salud, inicio temprano de relaciones sexuales, bajo nivel de educación, características que podrían favorecer el desarrollo de lesiones cervicales, el objetivo del presente estudio transversal analítico fue, determinar la frecuencia de tipos de HPV y lesiones de cuello uterino en 181 mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes-Paraguay, periodo 2010/2011. Las mujeres pertenecieron a las siguientes etnias: Maká (n=39); Nivaclé (n=18); Sanapaná (n=33); Enxet Sur (n=57) y Toba-Qom (n=34). Los tipos de HPV se detectaron por reacción en cadena de la polimerasa seguida de hibridación reversa y las lesiones de cuello uterino, por citología. La frecuencia de HPV fue 23,2% (42/181 mujeres). En 9,4% de las mujeres (17/181) se observó infección múltiple. El HPV 16 (4,4%) fue el más frecuente seguido por HPV 58 (3,3%), HPV 45 (3,3%), HPV 53 (2,8%) y HPV 11 (2,8). No se observó lesión de cuello uterino. Hubo asociación estadísticamente significativa entre la presencia de infección por HPV, un inicio temprano de relaciones sexuales ( $p=0,018$ ) y un número de parejas sexuales mayor a 2 ( $p=0,028$ ). Los datos obtenidos permitieron conocer los tipos de HPV circulantes en la población, lo cual contribuirá a la vigilancia de estos post vacunación y a optimizar las Políticas de Salud Pública destinadas a la detección y prevención del cáncer.

**Palabras claves:** tipificación molecular – HPV – mujeres – población indígena.

## **Abstract**

Paraguay occupies the seventh place in the incidence of cervical cancer in the Americas and Caribbean, being Human Papilloma Virus (HPV) the causative agent. Considering that indigenous women show several features that are associated with the appearance of cervical lesions, such as less access to health systems, early initiation of sexual activity and low education level, this cross-sectional analytical study aimed to determine the frequency of HPV types and cervical lesions in 181 indigenous women of the Department of Presidente Hayes, Paraguay in the period 2010-2011. The women belonged to the following ethnic groups: Maká (n=39); Nivaclé (n=18); Sanapaná (n=33); South Enxet (n=57) and Toba-Qom (n=34). HPV types were determined by polymerase chain reaction followed by reverse line hybridization and cytology of cervical lesions. The frequency of HPV found was 23.2% (42/181) and 9.4% of these women (17/181) showed multiple infection. HPV 16 (4.4%) was the most frequent type found, followed by HPV 58 (3.3%), HPV 45 (3.3%), HPV 53 (2.8%) and HPV 11 (2.8). Cervical lesions were not detected but statistically significant associations between HPV infection and early initiation of sexual intercourse ( $p = 0.018$ ) and number of sexual partners higher than 2 ( $p = 0.028$ ) were found. These results allowed the determination of HPV types circulating in this population, data that will contribute to the post-vaccination surveillance and to optimize public health policies for cancer detection and prevention.

**Keywords:** Molecular typing - HPV - women - indigenous population.

# **1. Introducción**

## 1.1 Generalidades.

En la década del 70 se iniciaron trabajos cuyos objetivos fueron establecer la relación entre la infección por el virus del papiloma humano (HPV) y el desarrollo de cáncer de cuello uterino. Meisels y Fortín en los años 1976 y 1977 postularon que las células coilocíticas que se observaban en los frotis cervicales de las pacientes con lesiones displásicas representaban el cambio citopático de una infección por el HPV.<sup>1,2</sup> La descripción por microscopía electrónica de la presencia de partículas virales del HPV en células coilocíticas confirmó el efecto citopático del HPV propuesto por Meisels y Fortin.<sup>3,4</sup> En el año 1982 se publicaron los tres primeros informes sobre secuencias de HPV en tumores humanos.<sup>5-8</sup>

Actualmente, se conoce que la familia de HPV es muy heterogénea y desempeña un rol importante en el desarrollo de tumores malignos en humanos, causando no sólo cáncer de cuello uterino, sino también una proporción sustancial de tumores malignos anogenitales, siendo la prevalencia de HPV aproximadamente del 70% en cáncer de vagina, del 40% en cáncer de vulva, del 47% en cáncer de pene, del 90% en cáncer de ano en mujeres y del 75% en cáncer de ano en hombres.<sup>9-10</sup> Además, el HPV puede causar lesiones benignas en el área anogenital como condilomas y una gran proporción de lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL), así como lesiones anales y orales, entre otras.<sup>11</sup>

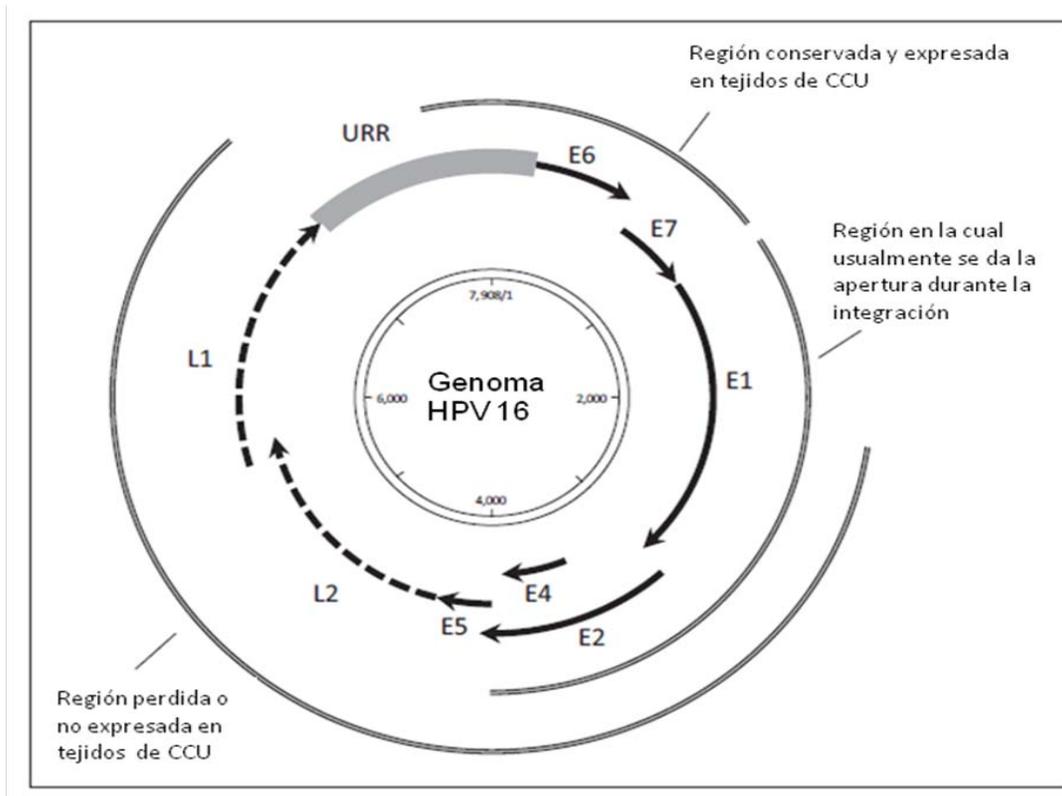
## 1.2 Estructura viral, genómica y organización.

El HPV es un grupo heterogéneo de virus, el genoma del mismo está compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble hebra, cuyo tamaño es aproximadamente de 8000 nucleótidos.

El genoma del HPV está formado por 3 regiones:

- a) URR (*upstream regulatory region*): es una región no codificadora que posee secuencias que controlan la transcripción y replicación viral.
- b) Región temprana: contiene 6 marcos de lectura abierta (*Open Reading Frame-ORFs*) que son E1, E2, E4, E5, E6 y E7, las mismas están involucradas en múltiples funciones incluyendo la activación de la transcripción, transformación, replicación y la adaptación viral a diferentes ambientes celulares.
- c) Región tardía: contempla a dos ORFs que son L1 y L2, los cuales codifican a las proteínas de la cápside viral, las mismas forman la estructura del virión y facilitan el empaquetamiento del ADN.<sup>12</sup>

En la figura 1 se muestra la representación esquemática del genoma del HPV 16.



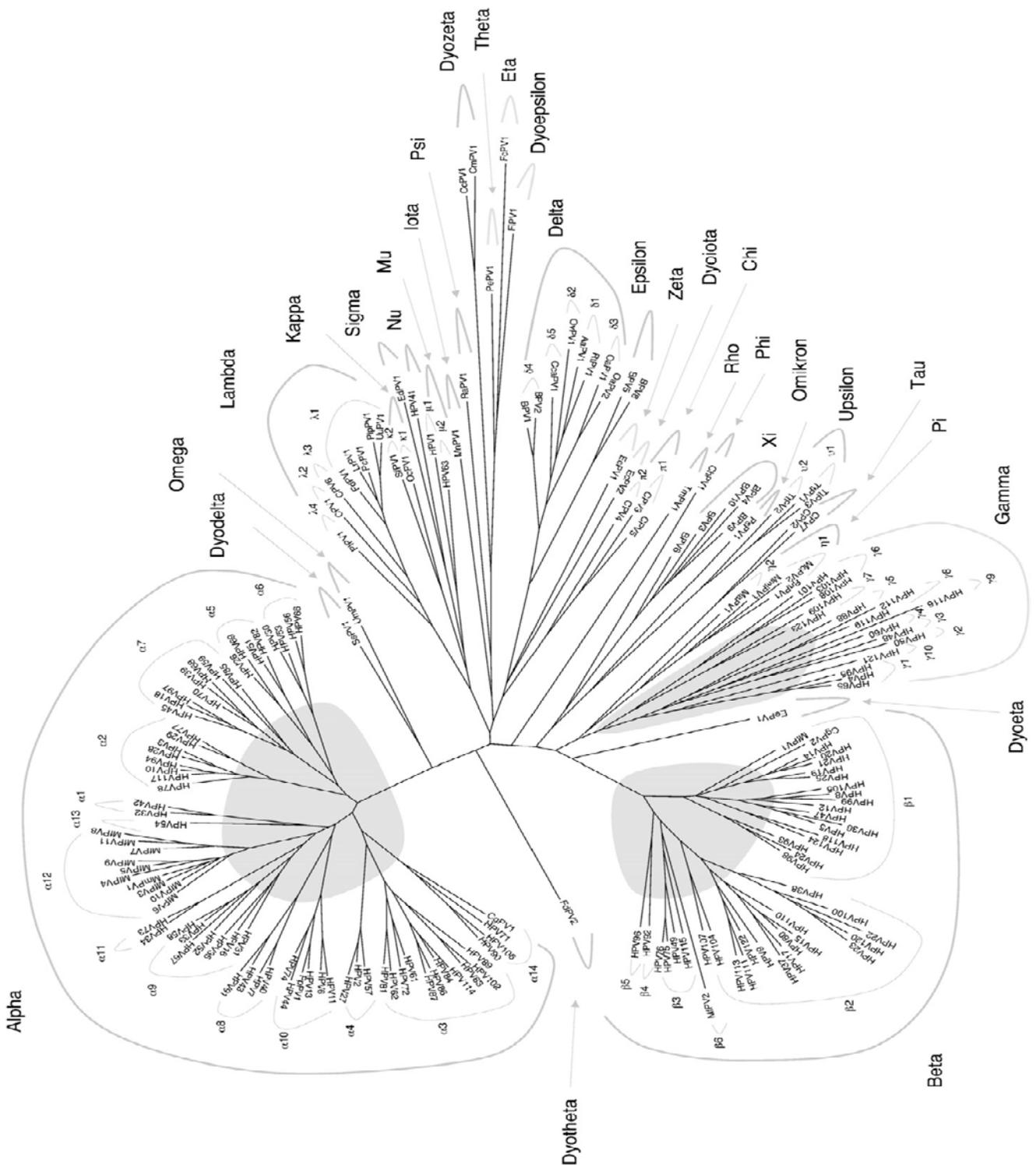
**Figura 1.** Representación esquemática del genoma del HPV 16. (Extraído de Burk *et ál.*, 2009, con modificaciones)

### 1.3 Clasificación viral.

El HPV pertenece a la familia *Papillomaviridae* y se clasifica según la homología de la secuencia de nucleótidos del gen L1, en género, especie, tipo, subtipo y variantes.<sup>13</sup>

Los papilomavirus se dividen en 29 géneros que contienen 189 tipos de papilomavirus, de los cuales, 120 corresponden a tipos de HPV y 69 a tipos de papiloma virus de animales. El HPV se encuentra principalmente en 5 de los 29 géneros, los cuales son: *alpha*, *beta*, *gamma*, *nu* y *mu*.<sup>14</sup> Lo anteriormente citado puede visualizarse en la figura

2.



**Figura 2.** Árbol filogenético de los papilomavirus basado en el ORF de la región L1. Las 29 letras griegas corresponden a los géneros que incluyen 189 tipos de papilomavirus. Los 120 tipos de HPV están comprendidos en 5 géneros, que son *alpha*, *beta*, *gamma*, *nu* y *mu*. (Extraído de Bernard *et al.*, 2010)

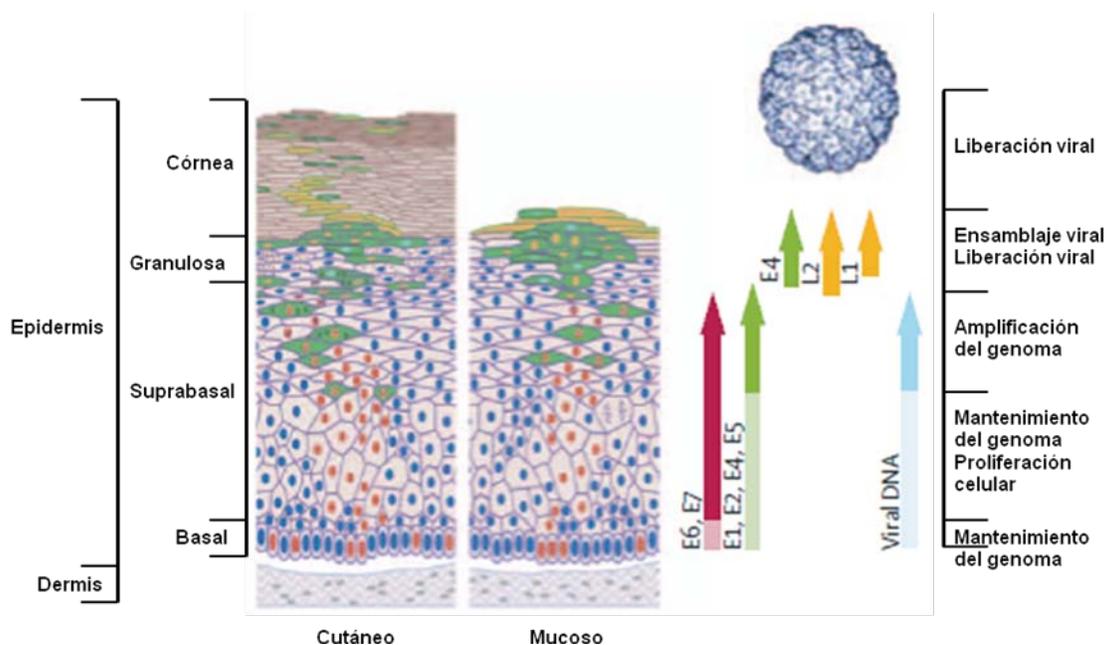
En cada género se encuentran diferentes tipos de papilomavirus que poseen al menos un 60% de identidad en la secuencia de nucleótidos del ORF L1.<sup>13</sup> Para la clasificación en especies dentro de un género se tiene en cuenta una identidad entre el 60%-70% de la secuencia de nucleótidos de la región L1.<sup>13</sup> Se reconoce como un nuevo tipo de papilomavirus si el genoma del mismo ha sido completamente clonado y si la secuencia de ADN del ORF L1 difiere en más del 10% al ser comparado con otros tipos conocidos de papilomavirus más cercanos. Si hay una diferencia en esta región entre el 2%-10% se trata de un subtipo y si la diferencia es menor a 2% se considera una variante del tipo de papilomavirus.<sup>13</sup>

Actualmente, se conocen más de 100 tipos de HPV de los cuales aproximadamente 40 infectan a la mucosa anogenital.<sup>14</sup> Los tipos de HPV que infectan la mucosa anogenital se clasifican según su potencial oncogénico en virus de alto riesgo (HR-HPV) y de bajo riesgo (LR-HPV). Según el meta-análisis realizado por Muñoz *et ál.*, en el 2003 existen 15 tipos de HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, y 82; otros tres son clasificados como probables HR-HPV: 26, 53, y 66 y existen 12 tipos clasificados como LR-HPV: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, y CP6108.<sup>15</sup>

Según Bouvard *et ál.*, 2009, los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 son clasificados como HR-HPV, el HPV 68 es considerado probablemente carcinogénico y los tipos de HPV 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85 y 97 son clasificados como posiblemente carcinogénicos.<sup>16</sup> Los HR-HPV son detectados en más del 95% de los casos de cáncer de cuello uterino.<sup>17</sup>

## 1.4 Ciclo de vida del HPV.

El HPV posee tropismo por células epiteliales, por tanto su ciclo de vida está directamente relacionado con la diferenciación de las células epiteliales. Se divide en cinco fases: infección y entrada viral, mantenimiento del genoma viral, fase proliferativa, fase de amplificación genómica y síntesis viral. En la figura 3 se representan las cinco fases del ciclo de vida del HPV.



**Figura 3.** Ciclo de vida del HPV. Se representa como el HPV se desenvuelve en las diferentes capas de los epitelios cutáneos y mucosos. (Extraída de Shiffman *et al.*, 2007, con modificaciones).

### a) Infección y entrada viral.

La infección por HPV requiere el acceso de partículas virales a las células basales, para ello debe existir un quiebre del epitelio estratificado o bien la exposición de la zona de transformación, zona en la cual hay un cambio de epitelios, del epitelio cilíndrico glandular (endocervix) al escamoso estratificado (ectocervix).<sup>18-20</sup> En la figura 4 se observa la zona de transformación.



**Figura 4.** Imagen de la zona de transformación. La flecha indica la zona de transformación, en la cual existe una transición del epitelio cilíndrico glandular al escamoso estratificado. (Extraída de Shiffman *et ál.*, 2007)

b) Mantenimiento del genoma viral.

Luego de la infección viral, en la capa basal del epitelio, el genoma viral es mantenido en un bajo número de copias, de 10 a 200 copias por célula aproximadamente. Los genes E1 y E2 se expresan a fin de mantener el ADN viral en forma episomal así como también para facilitar la segregación correcta de los genomas durante la división celular.<sup>21,22</sup> Además la expresión de las proteínas virales tempranas (E6, E7, E1 y E2) es baja.<sup>23,24</sup>

c) Fase proliferativa.

En un epitelio no infectado, las células basales migran a las capas celulares suprabasales saliendo del ciclo celular a fin de lograr una diferenciación completa, permitiendo que la superficie epitelial forme una barrera física contra el medio ambiente.<sup>25</sup> Durante la infección del papilomavirus, las proteínas E7 y E6 se expresan en las células basales, estimulando a la progresión del ciclo celular, retardando así la diferenciación completa del epitelio.<sup>26</sup> Las proteínas E6 y E7 se asocian a reguladores del ciclo celular.<sup>27</sup>

d) Fase de Amplificación genómica.

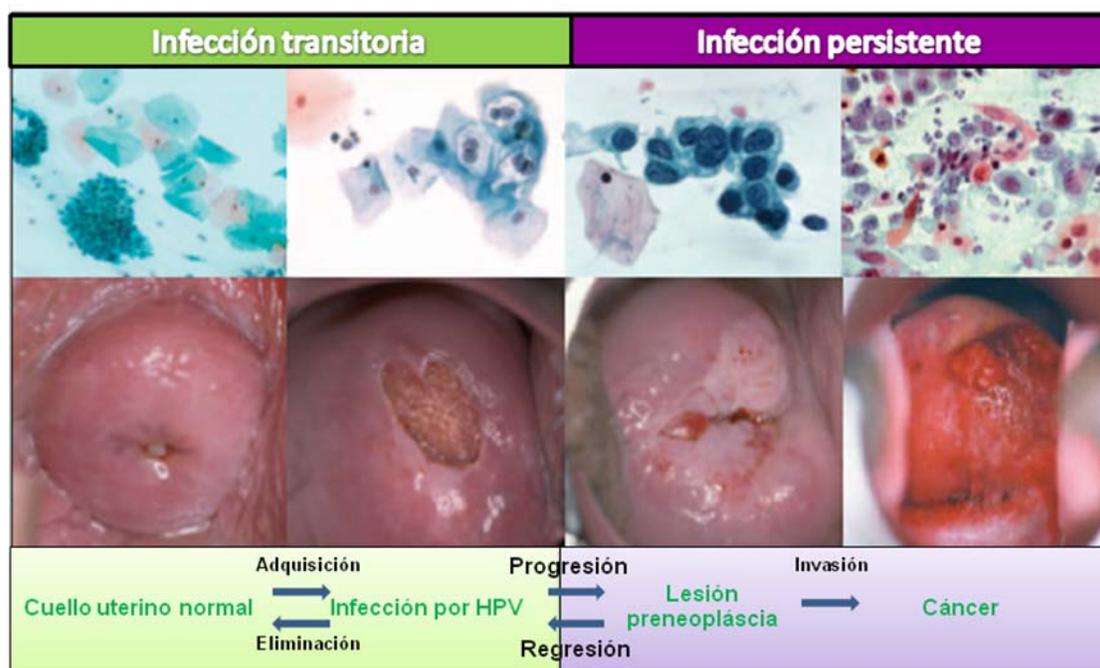
Para la producción de viriones infecciosos, el genoma de los papilomavirus debe ser amplificado y posteriormente empaquetado, esto normalmente ocurre en las capas epiteliales media o superior. Mediante un promotor tardío que se encuentra en el ORF E7, aumenta la expresión de las proteínas E1, E2, E4 y E5, estando implicadas en la replicación viral.<sup>28</sup>

e) Síntesis Viral.

Una vez que la amplificación del genoma viral se ha completado los papilomavirus codifican dos proteínas estructurales, las cuales son expresadas en las capas superiores del tejido infectado.<sup>29</sup> Las proteínas estructurales L2 (proteína de la cápside menor) y L1 (proteína de la cápside mayor) se producen en células que expresan E4, permitiendo el ensamblaje de las partículas infecciosas.<sup>30</sup> Los papilomavirus no producen lisis en la célula infectada, y no se liberan al exterior hasta que las mismas lleguen a la superficie epitelial.<sup>30</sup>

## 1.5 Historia natural de la infección por HPV en el cuello uterino.

El cáncer de cuello uterino se desarrolla en 4 etapas: transmisión del HPV, persistencia viral, progresión a lesiones pre-neoplásicas y desarrollo de cáncer invasor. En la figura 5 se observan las diferentes etapas para el desarrollo del cáncer de cuello uterino.



**Figura 5.** Historia natural de la infección por HPV en el cuello uterino. Se presentan los estadios previos como también el cáncer de cuello uterino invasor. (Extraído de Schiffman *et ál.*, 2007, con modificaciones)

### a) Transmisión del HPV.

Para la trasmisión e infección por HPV debe haber contacto piel a piel, piel a mucosa o mucosa a mucosa. La probabilidad de infección durante el acto sexual es alta.<sup>31,32</sup> Las partículas virales infectan a las células basales a través de pequeñas lesiones en la mucosa. Durante el acto sexual no es necesaria la penetración para la transmisión del HPV. Una infección por HPV originada en el introito puede ser transferida al cuello uterino.<sup>33,34</sup> La mayoría de las mujeres se infectan con al menos un tipo de HPV durante su vida sexual.<sup>35</sup> En el estudio realizado por Woodman *et ál.*, 2001, en el cual incluyeron mujeres inglesas de

15-19 años de edad que hayan iniciado recientemente sus relaciones sexuales, observaron que la incidencia acumulativa de infección por HPV en tres años fue del 44% y en 5 años del 60%.<sup>36</sup>

b) Persistencia viral.

La mayoría de las mujeres con infección por HPV eliminan la misma en un promedio de 1-2 años a través de la inmunidad mediada por células.<sup>37</sup> Por otro lado, si la infección por un mismo tipo de HPV no es resuelta en un periodo de 1-2 años se considera como persistencia viral. La infección por el mismo tipo de HPV puede reaparecer, aún no se sabe si las infecciones se resuelven completamente o si el virus permanece en un estado latente. La aparición de muchas infecciones por HPV en individuos positivos para el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) sugiere que la latencia viral es posible.<sup>38,39</sup>

La probabilidad de desarrollar lesiones pre-neoplásicas aumenta con una infección persistente por HR-HPV.<sup>40</sup> El tipo de HPV infectante determina la probabilidad de desarrollar lesiones. Según el estudio desarrollado por Kjaer *et ál.*, 2010 la probabilidad de desarrollar neoplasia intraepitelial cervical de grado III (CIN III) o cáncer de cuello uterino es del 26,7% en mujeres con infección persistente por HPV 16, del 19,1% en mujeres con infección persistente por HPV 18 (19,1%), 14,3% HPV 31, 14,9% HPV 33 y 6% en mujeres con infección persistente por otros tipos de HR-HPV diferentes a los anteriormente citados.<sup>41</sup>

c) Progresión a lesiones pre-neoplásicas.

El diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) de grado I (CIN I) es un signo histopatológico de la infección por HPV. Mujeres con este tipo de lesiones presentan un menor riesgo de progresión a cáncer cervical.<sup>42</sup> En el estudio realizado por Petrorius *et ál.*, 2006 observaron que el 1,9% de mujeres con lesiones de CIN I o menos, desarrollaron CIN III o cáncer en un período de 26 meses. Cabe destacar que, el porcentaje de mujeres que desarrollaron cáncer o CIN III fue mayor en mujeres positivas para HR-HPV (2,3%) en comparación a mujeres que fueron negativas para HR-HPV (0,4%).<sup>43</sup> Por otro lado, la neoplasia intraepitelial cervical de grado II (CIN II) es heterogénea: a veces es producida por tipos de HPV no carcinogénicos y por tanto poseen menor potencial de desarrollo de cáncer de cuello uterino. Sólo el 5% de mujeres con un diagnóstico de CIN II desarrollan cáncer invasivo.<sup>44,45</sup> En CIN III las células displásicas abarcan casi todo el espesor del epitelio escamoso estratificado del cuello uterino.<sup>46</sup> Cabe destacar que, aproximadamente el 12% de mujeres con un diagnóstico de CIN III progresan a cáncer invasivo.<sup>44</sup>

d) Desarrollo de cáncer invasor.

La edad promedio en que las mujeres desarrollan cáncer de cuello uterino es más temprana que otros cánceres en adultos, teniendo un pico entre los 35 a 55 años de edad. Esto se debe a que el cáncer de cuello uterino se origina a partir de infecciones por HPV, las cuales se transmiten sexualmente, pudiendo adquirirse en la adolescencia tardía o en la adultez temprana.<sup>47</sup> Se estima que el 20-30 % de las mujeres con lesiones pre-neoplásicas poseen riesgo de desarrollar cáncer invasor dentro de un período de tiempo de 5 a 10 años.<sup>48,49</sup>

## 1.6 Factores de riesgo asociados al cáncer de cuello uterino.

El riesgo de desarrollo de cáncer de cuello uterino depende de: el tipo de HPV infectante, carga viral e integración del genoma viral al genoma del huésped, lo cual es característico de los HPV oncogénicos. Además existen otros factores que predisponen a la mujer a desarrollar cáncer de cuello uterino, como el número de parejas sexuales, la edad de inicio de relaciones sexuales, el uso prolongado de anticonceptivos hormonales, la alta paridad, el tabaquismo, la co-infección con otras enfermedades de transmisión sexual y la inmunosupresión.<sup>33</sup>

A continuación se describen algunos factores que predisponen al desarrollo de cáncer uterino:

Tipo de HPV infectante: El HPV 16 es muy cancerígeno, estimándose una probabilidad del 40% en desarrollar lesiones precancerosas en mujeres que presentan infección persistente por este tipo de HPV.<sup>50-52</sup>

Número de parejas sexuales: A mayor número de parejas sexuales es mayor la probabilidad de adquirir la infección por HPV.<sup>53</sup>

Edad de inicio de relaciones sexuales: Al iniciar las relaciones sexuales a temprana edad la probabilidad del desarrollo de CIN III aumenta.<sup>53</sup>

Uso prolongado de anticonceptivos hormonales: la probabilidad de desarrollar cáncer de cuello uterino se duplica en mujeres que usan anticonceptivos hormonales por 10 o más años en comparación a mujeres que no lo utilizan.<sup>54</sup> Una hipótesis es que los estrógenos o progestágenos aumentan la expresión génica del HPV en el cuello uterino a través de receptores de progesterona y elementos de respuesta a hormonas en el genoma viral.<sup>33</sup>

Alta paridad: A mayor paridad mayor es el riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino, en cada embarazo la zona de transformación queda expuesta aumentando así la exposición al HPV. Otra hipótesis es que puede deberse a factores hormonales durante el embarazo.<sup>33</sup>

Tabaquismo: Probablemente existe una reducción de la respuesta inmune en el cuello uterino debido a que el tabaco puede afectar al metabolismo de las hormonas femeninas o bien produce un daño directo, ya que el mismo es carcinogénico.<sup>33</sup>

Co-infección con otras enfermedades de transmisión sexual: se ha mostrado que el virus de herpes simple tipo 2 (HVS-2), *Chlamydia trachomatis* (CT) y el HIV predisponen al desarrollo de cáncer de cuello uterino. La infección por HVS-2 y CT genera una respuesta inflamatoria, lo cual se asocia a la generación de radicales libres produciendo una inestabilidad genética. Por otro lado la infección por HIV está relacionada con un estado de inmunosupresión, lo cual predispone al desarrollo de cáncer de cuello uterino.<sup>33</sup>

## 1.7 Prevención y control.

### Prevención Primaria.

La primera vacuna producida y aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) y por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) fue la vacuna tetravalente, fabricada por Merck & Co., (Gardasil ®), la misma está compuesta por *virus like particles-VLP*, VLPs de la región L1 del HPV-6, HPV-11, HPV-16, y HPV 18, utilizando como adyuvante aluminio amorfo. La vacuna es aplicada en 3 dosis en los meses 0, 2, 6.<sup>55</sup> Estudios de eficacia de 3 años, demuestran que la vacuna tetravalente, en mujeres entre 16-26 años, brinda una protección del 98% contra el desarrollo de CIN II/III o adenocarcinoma in situ relacionada al HPV-16 y HPV-18. Por otro lado, la protección contra verrugas genitales es mayor al 95%.<sup>56</sup>

La vacuna bivalente fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals (Cervarix ®) fue aprobada por la EMA para su utilización en países Europeos y posteriormente por la FDA, la misma contiene los VLPs de la región L1 del HPV-16 y HPV-18; y como adyuvante AS04, compuesto por hidróxido de aluminio y la molécula inmunoestimuladora lípido A monofosforilado. La vacuna es aplicada en 3 dosis en los meses 0, 1, 6.<sup>55</sup> La evaluación de la vacuna bivalente se realizó mediante un ensayo clínico de 7,3 años de seguimiento a mujeres de 15-25 años, demostrando que la misma es altamente inmunogénica y confiere una protección del 100% contra infecciones persistentes y lesiones de cuello uterino (CIN II+) asociadas al HPV-16 y HPV -18.<sup>57</sup>

La vacunación contra el HPV es recomendable en niñas que aún no han iniciado las relaciones sexuales, basado en que existe un mayor beneficio en la profilaxis.<sup>58</sup> El Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización del CDC (*Center of Disease Control and*

*Prevention*) recomienda la vacunación sistemática de niñas de 11-12 años de edad, con permiso para la vacunación en niñas de 9 años de edad.<sup>59,60</sup> Con la introducción de la vacuna contra el HPV, en forma masiva en la población, los casos de cáncer de cuello uterino disminuirán considerablemente, en aproximadamente el 70%.

#### Prevención Secundaria.

Existen dos tipos de métodos de diagnósticos para la prevención del cáncer de cuello uterino, están los métodos convencionales y los métodos moleculares.

#### Métodos convencionales.

Uno de los métodos más utilizados es el diagnóstico citológico, también conocido como Papanicolaou (PAP). A pesar de su historial, la citología tiene limitaciones importantes. Se basa en la interpretación de alteraciones morfológicas de las células presentes en muestras cervicales. La calidad en que se realiza la toma de muestra y el extendido es importante para el análisis.

La citología posee una sensibilidad promedio del 53% en la detección de la neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (CIN II+) y la especificidad promedio es del 97%. La sensibilidad del PAP varía aproximadamente entre el 30% a 75%.<sup>61</sup>

La colposcopia es un examen visual del cuello uterino, la misma es realizada por un médico o colposcopista calificado, permite el diagnóstico y tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical. Revisiones recientes han encontrado que la sensibilidad de la colposcopia y la biopsia dirigida es de 50-65% para lesiones de CIN III a más.<sup>62</sup>

Además otra metodología utilizada para la detección de lesiones precancerosas y cancerosas es la inspección visual al ácido acético, la sensibilidad de la misma varía de 49% a 96% en la detección de lesiones CIN II+ y cáncer invasor del cuello uterino, siendo

la especificidad del 49% al 98%, la misma está orientado a zonas rurales que no poseen acceso al sistema de salud, el objetivo de la metodología es identificar lesiones y tratarlas.<sup>63,64</sup>

### Métodos Moleculares.

En comparación a los métodos convencionales, los moleculares detectan la presencia del HPV inclusive antes de que existan alteraciones morfológicas en las células cervicales.

Entre los métodos moleculares se encuentran:

#### Hibridación in situ.

Este método se basa en el uso de sondas marcadas, las cuales se hibridan específicamente al ADN-HPV de las muestras, las cuales pueden ser cortes histológicos o extendidos citológicos, emitiendo una señal, que es detectada, interpretándose así como positiva la reacción. Desafortunadamente, estos ensayos son moderadamente sensibles, dando una reacción positiva en presencia de un número mayor a 25 copias de ADN de HPV por células. Las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) a menudo presentan cantidades menores de ADN de HPV, pudiendo obtenerse falsos negativos.<sup>65</sup>

#### Captura Híbrida II.

El sistema Captura Híbrida II es un método de amplificación de señal basado en la hibridación, en solución, del ADN del HPV con sondas ARN marcadas. Los híbridos ARN-ADN son capturados en pocillos de microtitulación y se detectan mediante anticuerpos monoclonales y un sustrato quimioluminiscente, lo cual proporciona una medida semi-cuantitativa del ADN del HPV. Esta prueba utiliza la amplificación de señal y a su vez detecta una menor cantidad de ADN HPV que los métodos directos, como el de hibridación

in situ.<sup>66,67</sup> Los resultados se expresan como la relación entre las unidades relativas de luz emitida por la muestra y la media del control positivo. La sensibilidad clínica de la captura híbrida II para detectar CIN II-III, es superior al 90%, y la prueba posee una especificidad superior al 90% en mujeres mayores a 35 años de edad.<sup>61,68</sup>

#### Métodos de amplificación de ácido nucleico.

En estos ensayos, la cantidad inicial de ADN del HPV se amplifica y los productos de amplificación son los detectados, pudiendo detectarse de 1-10 copias de ADN del HPV.<sup>69</sup>

Una de las técnicas más utilizadas para la amplificación del ADN del HPV es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la misma es una herramienta útil en la investigación epidemiológica de la infección por HPV o del cáncer de cuello uterino. La tipificación del HPV se realiza por hibridación con sondas de oligonucleótidos tipo específicas, utilización de enzimas de restricción o por secuenciación del ADN.<sup>65</sup>

La tipificación del HPV permite estimar el riesgo de desarrollar lesiones de alto grado en cuello uterino, evaluar la prevalencia del tipo específico de HPV y la distribución geográfica de los genotipos, así como también controlar si una infección persistente por HPV se debe a un sólo tipo de HPV y a su vez se pueden estudiar infecciones múltiples. Por otro lado permite el monitoreo de la infección por HPV en ensayos clínicos sobre tratamientos quirúrgicos, la evaluación de duración de la protección en las poblaciones vacunadas.<sup>69</sup>

## **1.8 Epidemiología del cáncer de cuello uterino y tipos de HPV.**

El cáncer de cuello uterino es el tercer cáncer más frecuente en mujeres en el mundo, con 529.828 nuevos y 275.128 muertes por año, de las cuales 31.712 se dieron en Latino América y el Caribe. El 85% de los casos nuevos ocurre en países en vías de desarrollo. La tasa de incidencia estandarizada por edad en América del Sur es de 24,1 x 100.000 mujeres.<sup>70</sup>

### Prevalencia y distribución de tipos de HPV.

La prevalencia de infección por HPV así como también la distribución de tipos virales varían según la región geográfica y severidad de la lesión del cuello uterino. Teniendo en cuenta la población general de mujeres con citología normal, la prevalencia de HPV, es mayor en países en vías de desarrollo (15,5%) que en países desarrollados (10%). La región con mayor prevalencia de infección por HPV es África (23%) y con la menor es Europa (7%).<sup>71</sup> Según el grado de severidad de la lesión, en mujeres con HSIL la prevalencia es de 85% y en mujeres con cáncer de cuello uterino es de más del 90%.<sup>15,72</sup> En mujeres con citología normal estudios realizados mundialmente detectan que el HPV 16 es el tipo más frecuente. Sin embargo, a partir del segundo lugar en frecuencia se observan variaciones geográficas, siendo en América del Sur el segundo tipo más frecuente el HPV 58 y en América Central el HPV 31 y el HPV 18.<sup>71</sup> Por otro lado, en mujeres con cáncer de cuello uterino invasivo el HPV 16 y 18 son los más frecuentes a nivel mundial, detectándose aproximadamente en el 71% de los casos, seguido del HPV 45 en las Américas, África y Asia; y HPV 33 en Europa.<sup>73</sup>

## 1.9 Cáncer de cuello uterino y distribución de tipos de HPV en Paraguay.

En Paraguay la tasa de incidencia y mortalidad, en el 2008, fue de 35,0 y 16,6 x 100.000 mujeres respectivamente. Esta tasa fue superior a las registradas en los países vecinos como Argentina, Brasil, Uruguay y Chile, siendo el doble de las registradas en Argentina, cuya tasa de incidencia y mortalidad fue de 17,5 y 7,4 x 100.000 mujeres respectivamente.<sup>70</sup>

Existen trabajos de tipificación de HPV realizados en muestras de cáncer de cuello uterino invasivo; así Kasamatsu *et ál.*, 2012, en 316 casos positivos para HPV, observó que el tipo viral más frecuente fue el HPV 16 (64,6%) seguido por el HPV 18 (8,5%) y en tercer lugar el HPV 45 (5,4%). Por otro lado, Rolón *et ál.*, 2000, observaron que de 109 casos positivos para HPV, el más frecuente fue el HPV 16 (49,5%), seguido del HPV 18 (10,1%), HPV 33 (4,6%), ocupando el HPV 45 y HPV 31 el cuarto lugar con una frecuencia de 3,7% cada uno.<sup>74,75</sup>

En el país aún existen pocos trabajos con respecto a la frecuencia y distribución de tipos de HPV en mujeres con o sin lesiones precursoras de cáncer. En el estudio realizado por Mendoza *et ál*, 2011, observaron resultados positivos para HPV en 43 de 207 (21%) mujeres sin lesión escamosa intraepitelial (NSIL), en 130 de 164 (80%) mujeres con LSIL, en el 96 % (71/74) de las mujeres con HSIL, y en el 100% (41/41) de las mujeres con cáncer de cuello uterino. En todos los casos el HPV 16 fue el tipo viral más frecuente, seguido por el HPV 58 y HPV 31 en mujeres con NSIL, y en mujeres con cáncer por el HPV 18 (14,6%) y HPV 45 (12.2%).<sup>76</sup>

### **1.10 Población indígena.**

La población indígena en nuestro país se clasifica en 5 familias lingüísticas (Guaraní, Lengua Maskoy, Mataco Mataguayo, Zamuco y Guaicuru) y a la vez en 20 diferentes etnias.<sup>77</sup>

Según los resultados del II Censo Nacional Indígena de población y viviendas del año 2002, la población indígena asciende a aproximadamente 87. 099 personas, representando al 1,7% de la población total del país. Más de la mitad (50,7%) reside en la región Oriental y el resto (49,3%) en la región Occidental, encontrándose el 91,5% de los indígenas en áreas rurales. Además, el 23% (19.751 indígenas) de la población total de indígenas reside en el Departamento de Presidente Hayes y el 23% (19.754 indígenas) en el Departamento de Boquerón, considerándose estos los departamentos con mayor población indígena.<sup>77</sup> En relación a la distribución por sexo se observa una similar proporción de hombres y mujeres en la población; siendo el 51,7% hombres y 48,3% mujeres.<sup>77</sup>

Entre las poblaciones étnicas del Paraguay, la población indígena es la que posee menor acceso a sistemas de salud, aproximadamente el 88% de esta población no cuenta con seguro médico. Sólo 1,4% de los hogares indígenas posee acceso al agua procedente de ESSAP/SENASA, mientras que la Red Comunitaria provee agua a 4,5% de los hogares. La gran mayoría (37,8%) sólo tiene acceso a tajarar o río.<sup>78</sup>

En relación a las características del mercado laboral el 52% de la población de 10 o más años posee alguna actividad económica, siendo este porcentaje superior en la población masculina respecto a la femenina (71% versus 34%). El ingreso promedio mensual de los asalariados es aproximadamente de 778 mil guaraníes.<sup>78</sup>

Con respecto a los factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de cuello uterino, en la población indígena se observa, una alta tasa de fecundidad, de 6,3 hijos/mujer, un bajo nivel de educación (promedio de años de estudio de 2,2años), siendo analfabeta el 38,9% de la población mayor a 14 años de edad. Además, las mujeres poseen un inicio temprano de relaciones sexuales, entre otras prácticas de riesgo.<sup>77-79</sup>

Estudios realizados en Argentina en mujeres indígenas revelan una elevada frecuencia de infección por HPV como también elevada presencia de factores de riesgo de cáncer de cuello uterino.<sup>80,81</sup> Tonnon *et ál.*, 2004, observó una frecuencia de infección por HPV del 64% (133/207) en mujeres guaraníes de la selva de Misiones-Argentina, siendo HPV 16 el tipo más frecuente (30,8%) seguido por HPV 6 (12,0%). Además, observó la presencia de factores de riesgo como; iniciación temprana de relaciones sexuales (13 años), edad temprana del primer embarazo (15 años), 87% de analfabetismo y 80% de poligamia, entre otros.<sup>80</sup> El estudio de Picconi *et ál.*, 2002, realizado en mujeres quechuas jujeñas reveló un 76% (193/254) de infección por HPV siendo el HPV 16 el tipo más frecuente seguido por el HPV11 y el HPV 6, y otros factores de riesgo como el elevado número de embarazos.<sup>81</sup>

En Paraguay aun no existen trabajos en la población indígena relacionados a HPV y considerando que puede existir una variación en la frecuencia y distribución de tipos de HPV, es de suma importancia que cada país y grupo étnico cuente con resultados de tipificación.

## **2. Objetivos**

## **2.1) Objetivo general.**

Determinar la frecuencia de tipos de HPV y lesiones de cuello uterino en mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes-Paraguay, periodo 2010/2011.

## **2.2) Objetivos específicos.**

- a) Describir las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de las mujeres indígenas de diferentes comunidades del Departamento de Presidente Hayes-Paraguay.
- b) Detectar la presencia del genoma de HPV por PCR utilizando *primers* consensus MY 09/11.
- c) Determinar los tipos de HPV por RLB utilizando *primers* consensus PG MY 09/11.
- d) Detectar la presencia de lesiones escamosas intraepiteliales de cuello uterino por diagnóstico citológico-PAP.
- e) Determinar la posible asociación entre las características socio-demográficas, antecedentes ginecológicos y la frecuencia de HPV

# **3. Materiales y Métodos**

### 3.1 Diseño del estudio.

En el presente estudio transversal analítico, se incluyeron 195 mujeres indígenas de diferentes comunidades del Dpto. de Presidente Hayes, con actividad sexual iniciada, no embarazadas, sin enfermedades mentales y sin tratamientos con medicamentos (óvulos) o quirúrgicos (LEEP, cono, histerectomía, u otros) durante el periodo del estudio, el cual va de octubre del 2010 a noviembre del 2011.

En relación a la etnia de las 195 mujeres incluidas, 39 pertenecieron a la etnia Maká; 18 a la etnia Nivaclé, 33 a la etnia Sanapaná; 65 a la etnia Enxet Sur; y finalmente 40 a la etnia Toba-Qom. Las comunidades incluidas en el estudio se encontraron a una distancia de 30 a 434 km de Asunción (Tabla 1). La ubicación de las comunidades indígenas a las que pertenecieron las mujeres incluidas en el estudio es presentada en la figura 6.

**Tabla 1.** Distribución de las 195 mujeres indígenas participantes del Departamento de Presidente Hayes, según etnia y comunidades.

Etnia	Comunidades	N° de mujeres incluidas	Porcentaje de cobertura de la población total*	Distancia aproximada de Asunción (Km)
Maká <sup>a</sup>	Quemkuket	39	42	30
Nivaclé <sup>a</sup>	Complejo Novoktas	18	14	434
Sanapaná <sup>b</sup>	Complejo Laguna Pato	33	53	340
Enxet Sur <sup>b</sup>	Complejo Maxhawaya	42	16	300
	Espinillo	13	21	300
	Pozo Colorado	10	**	270
Toba Qom <sup>c</sup>	Rio Verde	40	22	50
	Toba Qom			

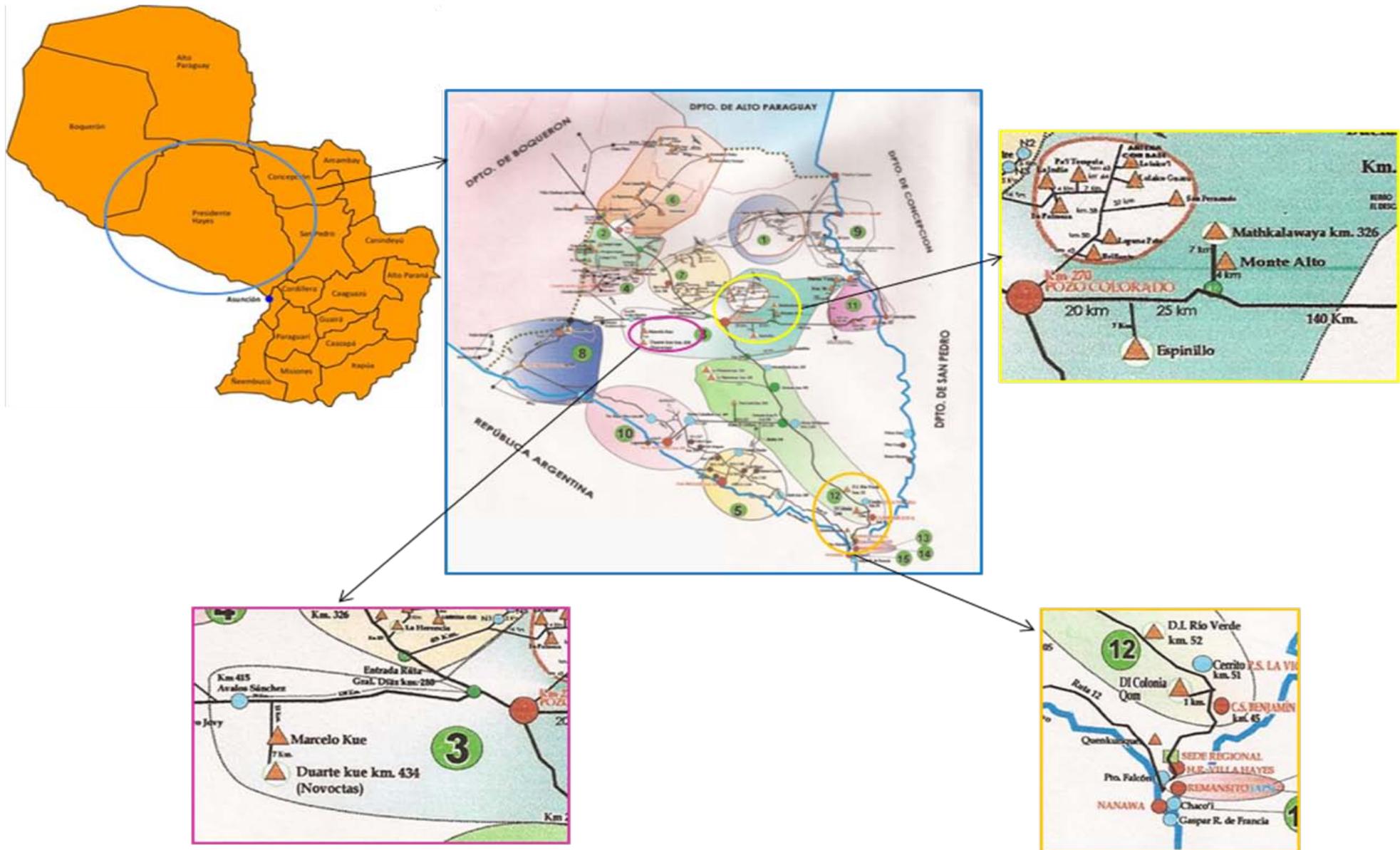
\*Población de mujeres mayor o igual a 13 años.

\*\* No se encontraron datos de la población total de mujeres mayor o igual a 13 años.

<sup>a</sup> Familia lingüística Mataco Mataguayo

<sup>b</sup> Familia lingüística Lengua Maskoy

<sup>c</sup> Familia lingüística Guaicuru



**Figura 6.** Mapa de ubicación de las comunidades indígenas. En círculos se enmarcan las que fueron incluidas en el estudio.

Para el cálculo del tamaño de muestra se consideró las frecuencias de HPV observadas en mujeres indígenas de estudios de la Argentina.<sup>80,81</sup> El promedio de proporción esperada utilizado fue de 0,70, teniendo en cuenta una amplitud del 0,15 y un intervalo de confianza (IC) del 95%. El tamaño de muestra mínimo requerido fue de 143 mujeres indígenas. Además, para el presente trabajo se consideró un aumento del 20%, lo cual correspondió a un tamaño de muestra de 172 mujeres indígenas.<sup>82</sup>

### **3.2 Asuntos Éticos.**

Previo a la toma de muestra, se obtuvo un consentimiento firmado por las mujeres participantes del estudio, el cual fue presentado en el protocolo aprobado (P11/2010) por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA). En el caso de mujeres indígenas que no hablaban español ni guaraní, el consentimiento fue traducido a su lengua por un integrante de la comunidad, explicándoles los riesgos y beneficios de participar en el estudio. En caso de tratarse de una menor de edad, el consentimiento fue firmado por el responsable de la misma. Los riesgos fueron reducidos al mínimo ya que la toma del material biológico fue realizada por profesionales capacitados incluyendo médicos, enfermeras y bioquímicas. Las mujeres participantes se realizaron gratuitamente en el marco del presente trabajo un estudio citológico (PAP) y uno de detección de ADN-HPV. Los resultados de PAP y de detección de ADN-HPV fueron entregados a las mujeres y al Hospital Regional de Villa Hayes para el seguimiento y tratamiento.

Por último a todas las mujeres participantes se les realizó un cuestionario (Anexo), a fin de obtener datos socio-demográficos y antecedentes ginecológicos. Todos los datos colectados se procesaron respetando la confidencialidad.

### **3.3 Detección y tipificación de HPV por métodos moleculares.**

#### **a) Extracción del ADN de muestras cervicales - Digestión con Proteinasa K.**

La muestra cervical fue obtenida utilizando un cepillo citobrusch, el cual fue introducido en un tubo con solución de transporte (Kit colector de muestra cervical Digene, USA). Las muestras fueron transportadas en hielo hasta el IICS-UNA y allí fueron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

La extracción del ADN se realizó utilizando 500 uL de la muestra, la misma se centrifugó y se lavó con solución fisiológica, obteniéndose un *pellet* celular, el cual fue resuspendido con buffer de digestión que poseía 150 ug/mL de proteinasa K (Promega, USA), 10mM de buffer Tris pH=8,3, 0,45% de Tween 20 y 0,45% de Igepal CA-630. Se incubó por 1 h a 56 °C; luego la enzima se inactivó a 95 °C durante 30 min y el digesto crudo fue utilizado como fuente de ADN templado.<sup>83</sup>

El digesto obtenido fue almacenado a -70°C hasta su procesamiento

#### **b) Detección del genoma de HPV por PCR con *primers* consensus MY 09/11.**

A las 195 muestras se les realizó una PCR para la detección del genoma de HPV utilizando un volumen final de 10 ul, conteniendo; 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,24 mM de cada dNTP (Invitrogen, USA), 0,04 unidades/ul de Taq DNA polimerasa (SBS, China), 1uM de *primers* MY09 y MY11 y 5 ul del digesto obtenido (dilución 1/10). La amplificación del DNA se realizó en un termociclador (MJ Research

PTC-100, USA) incluyendo un primer paso de desnaturalización a 94 °C por 4min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60s, 52°C por 60s y 72°C por 60s y una extensión final de 72°C por 5min.<sup>84</sup>

Cabe destacar que, se siguió el protocolo estandarizado por el Servicio de Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”-Argentina, el cual es el Laboratorio de Referencia Regional de las Américas en lo que respecta a HPV.<sup>85</sup> A continuación se detallan las secuencias de los *primers* consensus MY 09/11.

MY09 5'-CGTCC(AC)A(AG)(AG)GGA(AT)ACTGATC-3'(Reverse)

MY11 5'-GC(AC)CAGGG(AT)CATAA(CT)AATGG-3'(Forward)

Mediante la utilización de este par de *primers* se obtuvo la amplificación parcial del gel L1, obteniéndose un amplicón de 450pb aproximadamente, el cual fue visualizado mediante una corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 7% y posterior tinción con nitrato de plata.<sup>86</sup> En cada corrida electroforética fue utilizado un marcador de peso molecular phiX174 DNA/HaeIII (Invitrogen, USA). A fin de verificar la calidad del ADN extraído, todas las muestras fueron amplificadas por PCR utilizando *primers* específicos para el gen de la  $\beta$ -globina humana (PCO4 y GH20), siguiendo el protocolo sugerido por Wanderlei-Silva *et ál.*, 2005.<sup>87</sup>

c) Tipificación de HPV utilizando primers consensus PGMY09/11 biot seguida de hibridación lineal reversa (RLB)-PCR CHUV.

La PCR PGMY09/11biot seguida de RLB se llevó a cabo en el servicio de Virus Oncogénicos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán” siguiendo la metodología descrita en la primera edición (2009) del manual de laboratorio del HPV redactado por la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>88</sup>

Cabe destacar que, el laboratorio del Servicio de Virus Oncogénicos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán” forma parte de la Red Mundial de Laboratorios de HPV (HPV LabNet OMS). La red de laboratorios se ha establecido mediante la selección de laboratorios de todo el mundo a fin de apoyar la introducción de las vacunas contra el HPV, la vigilancia de la enfermedad y la infección por HPV. Hasta la fecha, esta red tiene dos laboratorios de referencias mundiales (Suecia y EE.UU.) y 8 laboratorios de referencias regionales (Australia Argentina, India, Japón, Sudáfrica, Suiza, Tailandia y Túnez). Se trata de una iniciativa establecida por la OMS a fin de estandarizar las metodologías de detección de HPV, logrando así que los resultados internacionales sean comparables, pudiendo también aplicarse un control de calidad en los laboratorios de HPV. Los miembros de esta red deben participar anualmente de la evaluación de tipificación de HPV ofrecida por la OMS, a fin de determinar la aptitud del laboratorio. Se les pide realizar la tipificación de HPV en 43 muestras del panel de control utilizando uno o más de los ensayos habituales. El laboratorio argentino ha participado en estos paneles de control de calidad desde 2009 y fue considerado competente.<sup>89,90</sup>

Las muestras cervicales positivas para el gen de la  $\beta$ -globina humana fueron procesadas por PCR PGMY09/11biot seguida de RLB.

La PCR CHUV mejora la detección de HPV e infecciones múltiples, pudiendo discriminar los diferentes tipos de HPV en infecciones múltiples con más de tres tipos virales.<sup>91</sup> La misma amplifica un fragmento de aproximadamente 450pb del gen L1 del HPV. Los productos de la PCR pueden ser tipificados por RLB gracias a que el *mix de primers* PGMY11 se encuentra biotinilado en el extremo 5'. El ensayo permite la tipificación de 43 muestras por vez, pudiendo identificarse hasta 37 tipos diferentes de HPV, tales como HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57b, 58, 59a, 59b, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 83, y 84, esto es debido a la utilización de oligosondas tipo-específicas.

El volumen final es de 50uL conteniendo; 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,025 unidades/ul de Taq DNA polimerasa (Fermentas, USA), 80nM del *mix de primers* PGMY09, 80nM del *mix de primers* PGMY11biot y 5 ul de ADN extraído. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador (Bio-Rad, USA) incluyendo un primer paso de desnaturalización a 95°C por 9min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 1min 30s y 72°C por 2min y una extensión final de 72°C por 5min.<sup>88</sup>

Los productos de amplificación fueron guardados en un freezer a -20°C hasta la tipificación por RLB.

Primers utilizados en la PCR CHUV:

<b>Primers</b>	<b>Secuencia nucleotídica (5'--&gt; 3')</b>
PGMY11-A-bio	GCACAGGGACATAACAATGG
PGMY11-B-bio	GCGCAGGGCCACAATAATGG
PGMY11-C-bio	GCACAGGGACATAATAATGG
PGMY11-D-bio	GCCCAGGGCCACAACAATGG
PGMY11-E-bio	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
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

**Tabla 2.** Primers PGMY09/11biot y sus respectivas secuencias

### Tipificación por RLB.

La misma consta de 3 pasos:

- Preparación de la membrana: Las oligosondas se unen covalentemente a la membrana. Las oligosondas utilizadas fueron para la detección de los tipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57b, 58, 59a, 59b, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 83 y 84.
- Hibridación reversa en línea: El producto de amplificación es puesto en contacto con las diferentes oligosondas tipo-específicas.
- Detección de la Hibridación: En una placa radiográfica se observan los resultados de la detección y tipificación del HPV en las diferentes muestras cervicales.

- Regeneración de la membrana: El producto de PCR hibridado puede ser disociado de la membrana, pudiendo ser utilizada para una nueva hibridación.

Para la tipificación de HPV , se consideró como HR-HPV al HPV 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73 y 82 y como LR-HPV al HPV 6, 11, 44, 54, 83, y 84, según la bibliografía de de Villiers *et ál.*, 2004. Cabe destacar que, algunos de los tipos de HPV (26, 53 y 66) clasificados como HR-HPV son considerados de probable alto riesgo desde el punto de vista epidemiológico, dada su baja prevalencia en cáncer de cuello uterino, sin embargo según de Villiers *et ál.*, 2004 son taxonómicamente considerados como HR-HPV.<sup>13,15</sup>

#### d) Secuenciación de tipos de HPV indeterminados.

Se realizó una amplificación utilizando *primers* MY09/11. El producto amplificado de 450pb, se purificó siguiendo las instrucciones detalladas del kit *AxyPrep DNA Gel Extraction* (Axygen Biosciences, USA).

La reacción de secuenciación fue realizada con el kit *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posterior a la reacción de secuenciación el producto de ADN marcado fue secuenciado utilizando el secuenciador automático (*ABI PRISM® 3500 DNA Sequencer*, Applied Biosystems, USA).

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas y editadas con el software v7.0.7.0 de *BioEdit*.<sup>92</sup> Las secuencias obtenidas se compararon por *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) con las secuencias de nucleóticos del gen L1 del HPV existentes en la base de datos del Gen Bank del NCBI.<sup>93</sup>

### **3.4 Detección de lesión de cuello uterino por citología.**

El material de cuello uterino fue tomado por una profesional ginecóloga, quien realizó el extendido cervical en una lámina esmerilada correctamente identificada, la cual fue remitida al IICS, UNA. La interpretación de los hallazgos fue realizada por un especialista en citología ginecológica. Los resultados se informaron siguiendo el Sistema Bethesda 2001, como NSIL, LSIL (incluye CIN I y/o HPV), HSIL (incluye CIN II, CIN III) o cáncer de cuello uterino infiltrante.<sup>94</sup>

### **3.5 Análisis estadístico.**

El análisis de los datos se realizó empleando procedimientos de estadística descriptiva y analítica utilizando el programa (CDC, Atlanta) Epi Info versión 3.5.3. Para determinar la frecuencia de tipos de HPV en la población se tuvo en cuenta tanto las infecciones simples y múltiples. Para estimar la posible asociación entre las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos con la presencia de infección por HPV, fue utilizado el test de Chi cuadrado, considerándose estadísticamente significativa los valores de  $p \leq 0,05$ . Las variables cuantitativas (edad, edad de inicio de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, número de embarazos) fueron convertidas a variables dicotómicas a fin de realizar el análisis por el Test de Chi cuadrado. El punto de corte fue seleccionado en base a los valores de las medias o medianas (según corresponda) observados en la población de mujeres positivas HPV. Las medianas fueron expresadas con un IC<sub>25%-75%</sub> y las medias con un IC<sub>95%</sub>. Finalmente, se realizó el análisis de regresión logística para determinar si existe independencia entre las variables estadísticamente significativas con respecto a la presencia de infección por HPV.

# **4. Resultados**

#### **4.1 Caracterización de la población analizada.**

Con respecto a las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de las mujeres indígenas participantes, se observó una mediana de edad igual a 30 años (IC<sub>25%-75%</sub> 23-42años). El 35% de las mujeres participantes se encontró en el rango de 20 a 29 años de edad (Tabla 3).

Se evidenció una elevada frecuencia de mujeres sin escolaridad (39%), siendo la mediana de años de escolaridad observada igual a 2 años (IC<sub>25%-75%</sub> 0-4 años). Sólo el 7% de las mujeres participantes presentaron una escolaridad mayor a 6 años (Tabla 3).

En relación a los antecedentes ginecológicos, la media de edad de inicio de relaciones sexuales en la población fue de 17 años (IC<sub>95%</sub> 14-20 años), el 45% de las mujeres participantes iniciaron sus relaciones sexuales entre los 14 y 16 años. La mediana de número de parejas sexuales observada fue 1 (IC<sub>25%-75%</sub> 1-2 parejas sexuales). Sólo el 6,7% de las mujeres presentó un número de parejas sexuales mayor o igual a 4. El 92% de las mujeres tuvo al menos un embarazo, siendo la mediana de número de embarazos igual a 3 (IC<sub>25%-75%</sub> 2-6). Cabe destacar que, el 71% de las mujeres indígenas participantes se realizó por primera vez un diagnóstico citológico y que se observó una alta frecuencia (60%) de mujeres que utilizaban anticonceptivos hormonales (Tabla 3).

Además, se observó que el 21,5% de las mujeres eran fumadoras (Tabla 3).

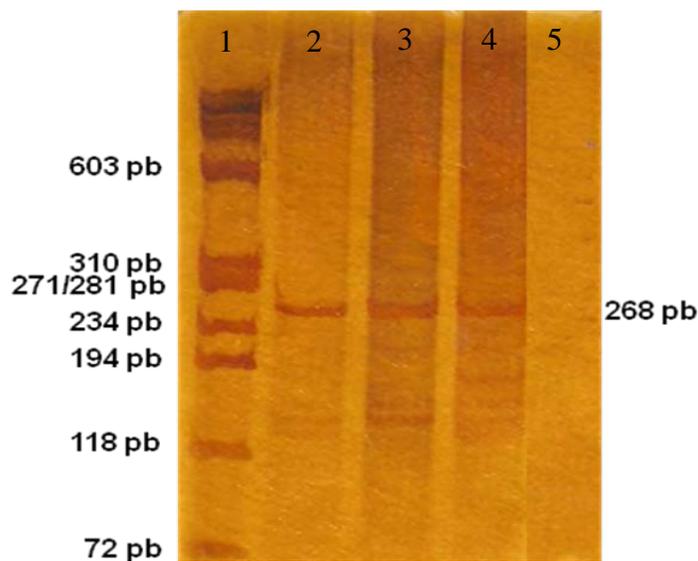
**Tabla 3.** Características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de las mujeres indígenas incluidas en el estudio.

<b>Variables</b>	<b>Población total (n=195)</b>
<b>Edad (años)</b>	
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	30 (23-42)
13-19 (n %)	22 (11)
20-29 (n %)	68 (35)
30-39 (n %)	49 (25)
40-49 (n %)	27 (14)
≥50 (n %)	29 (15)
<b>Escolaridad (años)</b>	
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	2 (0-4)
0 (n %)	76 (39)
1-3 (n %)	55 (28)
4-6 (n %)	50 (26)
7-12 (n %)	14 (7)
<b>Edad de inicio de relaciones sexuales (años)</b>	
Media (IC <sub>95%</sub> )	17 (14-20)
11-13 (n %)	22 (11)
14-16 (n %)	88 (45)
>16 (n %)	85 (44)
<b>Nro. de parejas sexuales</b>	
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	1 (1-2)
1 (n %)	114 (58,5)
2-3 (n %)	68 (34,9)
≥4 (n %)	13 (6,7)
<b>Embarazos</b>	
Si (n %)	179 (92)
No (n %)	16 (8)
<b>Nro. de embarazos</b>	
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	3 (2-6)
1-3 (n %)	91(51)
4-6 (n %)	56 (31)
≥6 (n %)	32 (18)
<b>Uso de anticonceptivo hormonal</b>	
Si (n %)	117 (60)
No (n %)	78 (40)
<b>Fuma</b>	
Si (n %)	42 (21,5)
No (n %)	153 (78,5)
<b>Citología anterior</b>	
Si (n %)	57 (29)
No (n %)	138 (71)

## 4.2 Calidad de los templados.

Del total de 195 muestras cervicales pertenecientes a las mujeres indígenas incluidas en el estudio, 181 (93%) muestras fueron positivas para el gen de la  $\beta$ -globina humana, indicando la buena calidad del templado. De las 181 muestras cervicales, 39 muestras pertenecieron a mujeres indígenas de la comunidad de Qemkuket, 18 del Complejo Novoktas, 33 del Complejo Laguna Pato, 34 del Complejo de Maxhawaya, 13 de la Comunidad de Espinillo, 10 de Pozo Colorado y 34 de las Comunidades del Pueblo Toba Quom. Finalmente, los próximos resultados son presentados en base a una población total de 181 mujeres, excluyendo a las 14 mujeres cuyas muestras fueron negativas para el gen de la  $\beta$ -globina humana.

En la figura 7 se muestra la corrida electroforética de los productos amplificados para el fragmento de 268pb del gen de la  $\beta$ -globina humana.



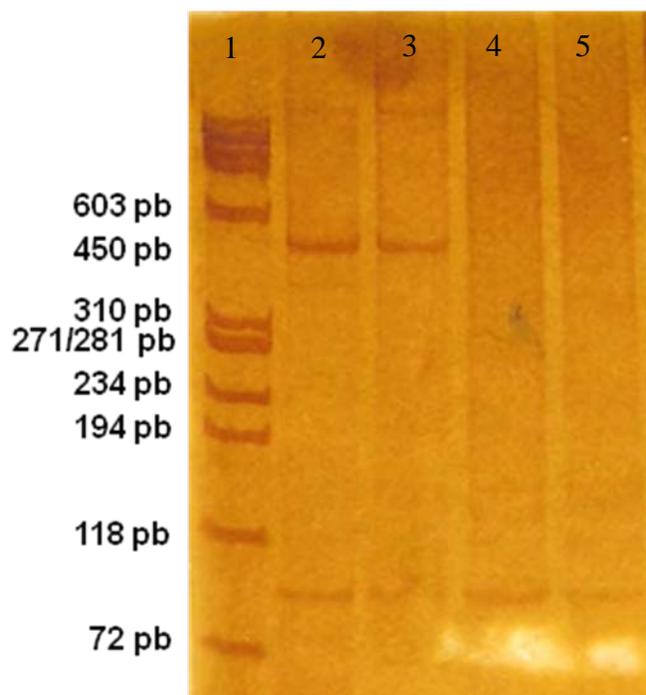
**Figura 7.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de los productos de amplificación obtenidos por PCR utilizando *primers* PCO4 y GH20 para el gen de la  $\beta$ -globina humana (268pb). En el primer carril se observa el marcador de pares de base phiX174 DNA/Hae III (Invitrogen, USA), en los carriles del 2 al 4 se observan muestras positivas para el gen de la  $\beta$ -globina humana y en carril 5 se corrió un control negativo que consistió en agua destilada.

### 4.3 Detección del genoma de HPV.

#### a) Detección del genoma de HPV por PCR utilizando *primers* genéricos MY09/11.

Se analizaron 181 muestras cervicales, de las cuales 37 (20,4%, IC<sub>95%</sub> 14,8%-27,1%) fueron positivas para el genoma del HPV.

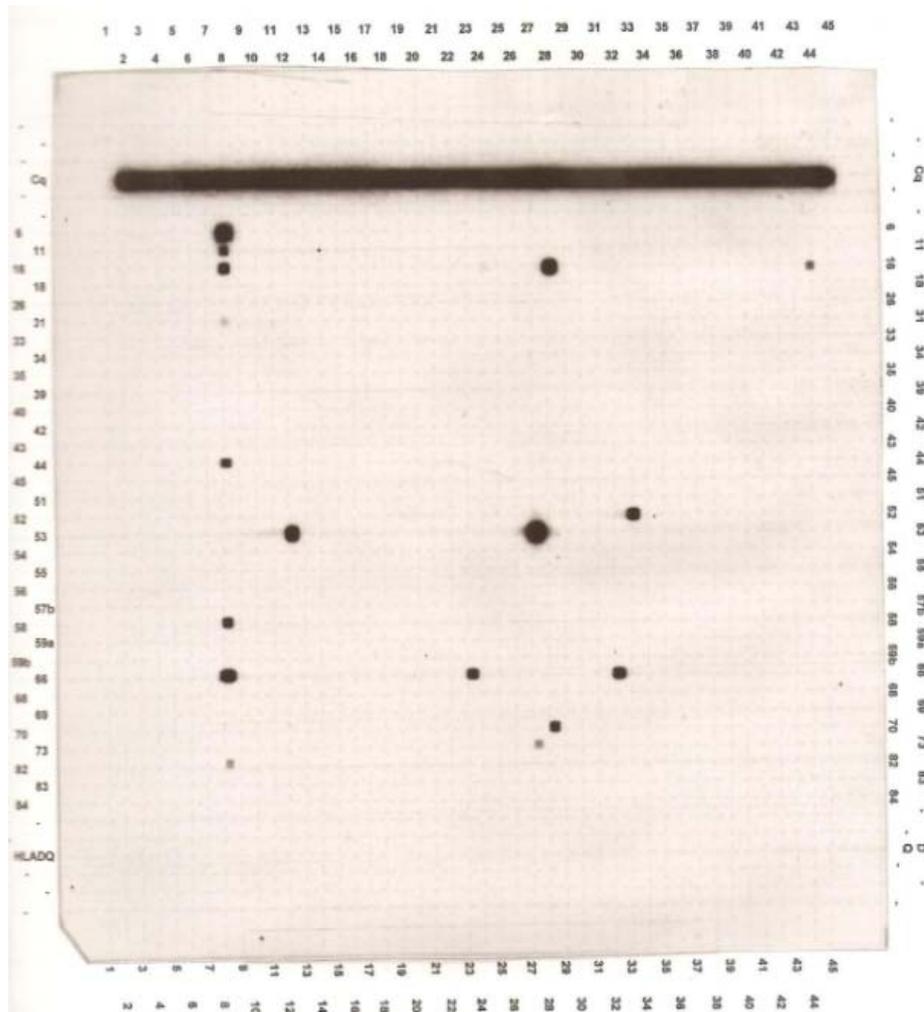
En la figura 8 se muestra la corrida electroforética de los productos amplificados para el fragmento de 450pb del gen L1 del HPV.



**Figura 8.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% de los productos de amplificación obtenidos por PCR utilizando *primers* genéricos MY09/11 para el gen L1 del HPV (450pb). En el primer carril se observa el marcador de pares de bases phiX174 DNA/Hae III (Invitrogen, USA), en los carriles 2 y 3 se observan muestras positivas para el genoma del HPV, en el carril 4 una muestra negativa para el genoma del HPV y en el carril 5 se corrió un control negativo que consistió en agua destilada.

b) Tipificación por PCR PGMY09/11biot seguida de RLB.

De las 181 mujeres indígenas participantes, 40 (22,1%, IC<sub>95%</sub>: 16,3%-28,9%) fueron positivas para algún tipo de HPV por PCR PGMY09/11 seguido por RLB. En la figura 9 se observan los resultados de la tipificación de 40 muestras cervicales de mujeres indígenas.



**Figura 9.** Detección y tipificación del HPV por PCR PGMY09/11biot seguida de RLB. En las columnas 1 y 45 no se sembraron muestras, las muestras sembradas en las columnas 2 al 7, 9 al 11, 13 al 22, 25, 26, 29, 30 y del 34 al 42 fueron negativas para HPV, en la columna 8 se tuvo una muestra positiva para HPV 6, 11, 16, 31, 58, 66 y 82. En la columna 23 la muestra fue positiva para HPV 66. En la 27, fue positiva para HPV 53 y 73. En la 28, positiva para HPV 16 y 70. En la 31, muestra positiva para HPV 11, en la 32 para HPV 66 y en la 33 para HPV 52. Se corrieron 3 controles, un control negativo, que consistía en una muestra de líneas celulares negativas para HPV (columna 24), otro control negativo con agua destilada (columna 43) y un control positivo (columna 44) para la PCR que consistía en un digesto de células CaSki, que poseen secuencias integradas de HPV 16 en su genoma.

Al comparar los resultados obtenidos por PCR MY09/11 versus PCR PGMY09/11biot seguido de RLB, se observó que 5 muestras negativas por PCR MY09/11 fueron positivas por PGMY09/11biot seguida de RLB. Además de las 37 muestras positivas para HPV por MY09/11, 35 fueron tipificadas por PCR PGMY09/11biot seguida por RLB.

Por tanto, en 2 muestras de cuello uterino no fue posible determinar el tipo viral con la metodología de PCR PGMY09/11biot seguida de RLB. Finalmente, 42 mujeres (23,2% IC<sub>95%</sub> 17,3%-30%) fueron positivas para el genoma del HPV (Tabla 4).

**Tabla 4.** Frecuencia del virus del papiloma humano detectada en las 181 mujeres por PCR utilizando *primers* genéricos MY09/11 y PGMY09/11biot seguida de RLB.

PCR MY09/11	MUESTRAS TIPIFICADAS POR PCR PGMY09/11biot-RLB	
	HPV Positivo (n=40)*	HPV Negativo (n=141)
HPV Positivo (n=37)	35	2
HPV Negativo (n=144)	5	139

\*Muestras positivas para al menos un tipo de HPV. HPV: virus del papiloma humano

c) Secuenciamiento de muestras indeterminadas.

En el caso de las 2 muestras positivas para HPV de tipo indeterminado, se procedió a secuenciar parcialmente el gen L1 obteniéndose un resultado interpretable de las secuencias sólo en una de las muestras de cuello uterino.

La secuencia analizada por BLAST, presentó un 100% de identidad con la secuencia del HPV 84 con número de acceso del Gen Bank (gb|AF293960.1|AF293960). En la figura 10 se muestra el alineamiento de las secuencias. A través del análisis de la secuencia de nucleótidos se determinó que el tipo viral presente en la muestra fue el HPV 84.

```

1      ACCACCCGCAGCACCAATTTTACTATTAGTGCTGCTACCAACACCGAATCAGAATATAAA 60
      |||
6679   ACCACCCGCAGCACCAATTTTACTATTAGTGCTGCTACCAACACCGAATCAGAATATAAA 6738

61     CCTACCAATTTTAAGGAATACCTAAGACATGTGGAGGAATATGATTTGCAGTTTATATTC 120
      |||
6739   CCTACCAATTTTAAGGAATACCTAAGACATGTGGAGGAATATGATTTGCAGTTTATATTC 6798

121    CAGTTGTGTAAGGTCCGTCTGACTCCAGAGGTCATGTCCTATTTACATACTATGAATGAC 180
      |||
6799   CAGTTGTGTAAGGTCCGTCTGACTCCAGAGGTCATGTCCTATTTACATACTATGAATGAC 6858

181    TCCTTATTAGATGAGTGGAATTTTGGTGTTGTGCCCCCTCCCTCC 225
      |||
6859   TCCTTATTAGATGAGTGGAATTTTGGTGTTGTGCCCCCTCCCTCC 6903

```

**Figura 10.** Alineamiento por BLAST de una secuencia de nucleótidos parcial del gen L1. Muestra positiva para HPV por PCR utilizando *primers* MY09/11; alineada por *BLAST* con una región del gen L1 del genoma completo del HPV 84, con número de acceso del Gen Bank gb|AF293960.1|AF293960.

d) Frecuencia de tipos de HPV.

En relación a los tipos de HPV, en 24 de 181 mujeres (13,3%; IC<sub>95%</sub> 8,7%-19,1%) fueron detectadas infecciones simples y en 17 de 181 mujeres (9,4%; IC<sub>95%</sub> 5,6%-14,6%) infecciones múltiples. El 19,9% de las mujeres (36/181) fueron positivas para al menos un tipo de HR-HPV y el 9,4% (17/181) para al menos un tipo de LR-HPV. En una mujer indígena positiva para HPV no fue posible determinar el tipo viral infectante (Tabla 5).

**Tabla 5.** Frecuencia del virus del papiloma humano en mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes, periodo 2010/2011

Población de mujeres	Frecuencia en la población total (n=181) (n%)
<b>HPV negativas</b>	<b>139 (76,8)</b>
<b>HPV positivas</b>	<b>42 (23,2)</b>
Infección simple	24 (13,3)
Infección múltiple	17 (9,4)
Infección por HPV indeterminado	1 (0,06)
<b>HR-HPV positivas*</b>	<b>36 (19,9)</b>
<b>LR-HPV positivas**</b>	<b>17 (9,4)</b>

HPV: Virus del papiloma humano; HR-HPV: virus del papiloma humano de alto riesgo  
LR-HPV: virus del papiloma humano de bajo riesgo.

\*Mujeres positivas para al menos un tipo de HR-HPV

\*\*Mujeres positivas para al menos un tipo de LR-HPV

De las 17 mujeres indígenas con infecciones múltiples, 10/17 (59%) presentaron infecciones por 2 tipos virales, 5/17 (29%) por 3 tipos virales, 1/17 (6%) por 5 tipos virales y 1/17 (6%) por 7 tipos virales (Tabla 6).

**Tabla 6.** Frecuencia de tipos de HPV detectados en 17 mujeres indígenas con infección viral múltiple del Departamento de Presidente Hayes, periodo 2010/2011.

<b>Tipos de HPV</b>	<b>n</b>
6 y 56	1
11 y 68	1
16 y 31	1
16 y 70	1
31 y 54	1
39 y 44	1
45 y 83	1
51 y 83	1
53 y 73	1
53 y 83	1
11, 31 y 45	1
18, 45 y 68	1
39, 44 y 54	1
52, 73 y 83	1
52, 58 y 84	1
16, 45, 58, 82 y 84	1
6,11,16,31,58,66 y 82	1
<b>Total</b>	<b>17</b>

HPV: Virus del papiloma humano

En relación a la frecuencia de tipos de HPV detectados en las 181 mujeres indígenas participantes, el tipo más frecuente fue el HPV 16 (4,4%) seguido por el HPV 58 (3,3%), HPV 45 (3,3%), HPV 53 (2,8%) y HPV 11 (2,8%) (Tabla 7). En total se detectaron 17 tipos de HR-HPV y 6 tipos de LR-HPV.

**Tabla 7.** Frecuencia de tipos de HPV en mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes.

Tipos de HPV	Frecuencia de HPV en la población (n=181) <sup>a</sup>	Frecuencia de HPV en infecciones simples (n=24)	Frecuencia de HPV en infecciones múltiples (n=17) <sup>b</sup>
	n (%)	n	n
<b>HR-HPV</b>	<b>36 (19,9)</b>	<b>19</b>	<b>17</b>
16	8 (4,4)	4	4
18	1 (0,6)	0	1
31	4 (2,2)	0	4
35	1 (0,6)	1	0
39	2 (1,1)	0	2
45	6 (3,3)	2	4
51	1 (0,6)	0	1
52	3 (1,7)	1	2
53	5 (2,8)	3	2
56	1 (0,6)	0	1
58	6 (3,3)	3	3
59	1 (0,6)	1	0
66	4 (2,2)	3	1
68	2 (1,1)	0	2
70	1 (0,6)	0	1
73	3 (1,7)	1	2
82	3 (1,7)	0	3
<b>LR-HPV</b>	<b>17 (9,4)</b>	<b>5</b>	<b>12</b>
6	2 (1,1)	0	2
11	5 (2,8)	2	3
44	3 (1,7)	1	2
54	2 (1,1)	0	2
83	4 (2,2)	0	4
84	4 (2,2)	2	2

HPV: virus del papiloma humano; HR-HPV: virus del papiloma humano de alto riesgo; LR-HPV: virus del papiloma humano de bajo riesgo

<sup>a</sup> Frecuencia de tipos de HPV en mujeres indígenas, incluyendo tipos de HPV detectados en infecciones simples y múltiples (2 o más tipos de HPV infectantes por mujer)

<sup>b</sup> Frecuencia de tipos de HPV en mujeres indígenas con infección múltiple (2 o más tipos de HPV infectantes por mujer)

Considerando sólo a las 42 mujeres con infección por HPV, el 57,1% presentó infección simple, el 40,4% infección múltiple, y el 2,4% infección por tipo indeterminado de HPV (Tabla 8).

**Tabla 8.** Frecuencia de infecciones simples, múltiples y con tipos de HPV indeterminados en mujeres positivas para HPV.

<b>Mujeres con infección por HPV</b>	<b>n (%)</b>
Infecciones simples	24 (57,1)
Infecciones múltiples	17 (40,5)
Infecciones-HPV indeterminado	1 (2,4)
<b>Total</b>	<b>42 (100)</b>

HPV: Virus del papiloma humano

#### 4.4 Diagnóstico citológico.

Las 181 mujeres participantes presentaron ausencia de lesión escamosa intraepitelial (NSIL). Además, en el 13,8% (IC<sub>95%</sub> 9,10%-19,70%) de las mujeres se observó citología inflamatoria (Tabla 9).

**Tabla 9.** Frecuencia de citología inflamatoria en mujeres indígenas negativas para lesión escamosa intraepitelial.

<b>Citología</b>	<b>n (%)</b>
Normal	156 (86,2)
Inflamatoria	25 (13,8)
<b>Total</b>	<b>181 (100)</b>

Cabe destacar que, del total de 181 mujeres el 71,8 % (IC<sub>95%</sub>: 64,7%-78,2%) de la población se realizó por primera vez un estudio citológico (Tabla 10).

**Tabla 10.** Frecuencia de mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes con antecedentes de diagnóstico citológico de cuello uterino, periodo 2010/2011.

<b>Citología anterior</b>	<b>n (%)</b>
Si	51 (28,2)
No	130 (71,8)
<b>Total</b>	<b>181 (100)</b>

#### 4.5 Características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos en relación a la presencia de infección por HPV.

En relación a las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos en relación a la presencia de infección por HPV se observó que en las mujeres positivas para HPV la mediana de edad fue de 27 años, la edad media de inicio de relaciones sexuales de 16 años, la mediana de número de parejas sexuales fue de 2 y la mediana de número de embarazos fue de 3 (Tabla 11).

**Tabla 11.** Valores de medianas o medias de las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos observados en mujeres indígenas según la presencia de HPV.

<b>Variables</b>	<b>Población total (n=181)</b>	<b>Mujeres positivas para HPV (n=42)</b>	<b>Mujeres negativas para HPV (n=139)</b>
<b>Edad (años)</b>			
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	30 (23-41)	27 (20-40)	30 (24-42)
<b>Edad de inicio de relaciones sexuales (años)</b>			
Media(IC <sub>95%</sub> )	16 (13-19)	16 (14-18)	17 (14-20)
<b>Nro. de parejas sexuales</b>			
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	1 (1-2)	2 (1-3)	1 (1-2)
<b>Nro. de embarazos*</b>			
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	3 (1-5)	3 (2-5)	3 (2-5)

\* Población total: n=166, Frecuencia de mujeres positivas para HPV: n=39 y Frecuencia de mujeres negativas para HPV: n=127

Finalmente, del total de características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos analizados según presencia de HPV, se observó una asociación estadísticamente significativa entre un inicio temprano de relaciones sexuales a una edad menor o igual a 16 años y la infección por HPV ( $p=0,018$ ), así como también entre el número de parejas sexuales mayor a 2 y la presencia de infección por HPV ( $p=0,028$ ). Además, al realizar el análisis de regresión logística entre la edad de inicio de relaciones sexuales, el número de parejas sexuales y la presencia de HPV se observó que ambas se encuentran asociadas en forma independiente a la adquisición de infección viral, evidenciándose valores de  $p$  de 0,025 y 0,042, respectivamente (Tabla 12).

**Tabla 12.** Frecuencia de HPV según características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos de 181 mujeres indígenas.

<b>VARIABLES</b>	<b>Población total (n=181)</b>	<b>Mujeres positivas para HPV (n=42)</b>	<b>p</b>
<b>Edad (años)</b>			
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	30 (23-41)	27 (20-40)	
<27 (n %)	64	19 (30)	p=0,13
≥27 (n %)	117	23 (20)	
<b>Escolaridad (n %)</b>			
Ninguna/Primaria	168	40 (24)	p=0,49
Secundaria	13	2 (15)	
<b>Edad de inicio de relaciones sexuales (años)*</b>			
Media(IC <sub>95%</sub> )	16 (13-19)	16 (14-18)	
≤16 (n %)	105	31 (30)	<b>p=0,018</b> <b>PR=2 IC<sub>95%</sub> (1,01-3,8)</b>
>16 (n %)	76	11 (14)	
<b>Nro. de parejas sexuales*</b>			
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	1 (1-2)	2 (1-3)	
>2 (n %)	28	11 (39)	<b>p=0,028</b> <b>PR=1,9 IC<sub>95%</sub> (1,1-3,4)</b>
≤2 (n %)	153	31 (20)	
<b>Embarazos</b>			
Si (n %)	166	39 (23)	p=0,52
No (n %)	15	3 (20)	
<b>Nro. de embarazos (n=166 mujeres)</b>			
Mediana (IC <sub>25%-75%</sub> )	3 (1-5)	3 (2-5)	
>3 (n %)	80	18 (23)	p=0,77
≤3 (n %)	86	21 (24)	
<b>Uso de anticonceptivo hormonal</b>			
Si (n %)	107	23 (21)	p=0,51
No (n %)	74	19 (26)	
<b>Fuma</b>			
Si (n %)	39	11 (28)	p=0,40
No (n %)	142	31 (22)	
<b>Citología</b>			
Inflamatoria (n %)	25	5 (20)	p=0,68
Normal (n%)	156	37 (24)	
<b>Citología Anterior</b>			
No (n%)	130	28 (22)	p=0,40
Si (n%)	51	14 (27)	

HPV: virus del papiloma humano. PR: prevalencia relativa. IC: intervalo de confianza.

\*Valores por regresión logística para las variables estadísticamente significativas por  $\chi^2$ , edad de inicio de relaciones sexuales p=0,025 (OR=2,42) y número de parejas sexuales p=0,042 (OR=2,47)

#### 4.6 Distribución de infección por HPV según edad.

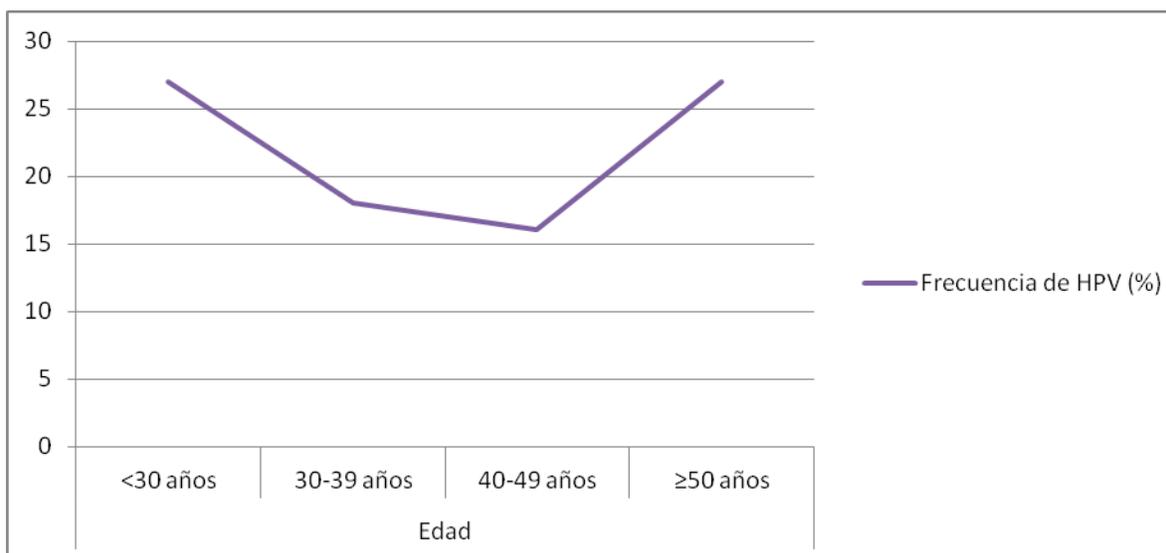
Del total de 181 mujeres indígenas, se observó una mayor frecuencia de HPV en mujeres menores a 30 años (27%) y en mujeres mayores o igual a 50 años (27%) (Tabla 13).

**Tabla 13.** Frecuencia de mujeres indígenas positivas para HPV según edad.

	Edad			
	<30 años	30-39 años	40-49 años	≥50 años
<b>n Total</b>	<b>85</b>	<b>45</b>	<b>25</b>	<b>26</b>
<b>Frecuencia de HPV (n%)</b>	23 (27)	8 (18)	4 (16)	7 (27)

HPV: virus del papiloma humano

Al graficar la frecuencia de infección por HPV versus edad se obtiene una curva en forma de U, la misma se observa en la figura 11.



**Figura 11.** Frecuencia de infección por HPV según edad.

# **5. Discusión**

El presente trabajo provee información sobre la distribución de tipos de HPV en mujeres indígenas del Departamento de Presidente Hayes.

Con respecto a la detección y frecuencia de tipos de HPV en las mujeres indígenas incluidas en el estudio, se observó que el 23,2% de las mujeres indígenas presentaron infección por HPV, siendo inferior a la detectada en otros estudios desarrollados en mujeres indígenas en la Argentina, observándose en el estudio de Tonon *et ál.*, 2004 una frecuencia del 64%, y en el de Picconi *et ál.*, 2002 una frecuencia del 76% de infección por HPV en mujeres quechuas de Jujuy-Argentina.<sup>80,81</sup> La diferencia observada en la frecuencia de HPV con respecto a los estudios argentinos puede deberse a diferencias existentes en las características de cada población. En la población analizada por Tonon *et ál.*, 2004 las mujeres indígenas participantes poseían una edad media de 15 años, la cual es menor al compararla a la mediana de edad observada en el presente estudio (30 años), lo cual podría explicar en parte la menor prevalencia de infección por HPV observada. Esto se atribuye a que mujeres mayores a 30 años de edad ya han estado expuestas a la infección por HPV, la cual pudo resolverse a través de la propia inmunidad.<sup>37,71</sup>

Por otro lado, la media de edad de inicio de relaciones sexuales observada en las mujeres guaraníes de Misiones fue de 13 años, lo cual predispone a una mayor probabilidad de infección por HPV.<sup>80,95</sup> Además, el 80% de la población analizada por Tonon *et ál.*, 2004 practicaba la poligamia (matrimonio en que se permite a una persona estar casada con más de una persona al mismo tiempo), en comparación a la población analizada en el presente trabajo en la cual se observó una mediana de parejas sexuales igual a 1 (IC<sub>25%-75%</sub> 1-2 parejas sexuales).<sup>80,96</sup>

En el presente estudio la mediana de número de embarazos fue de 3, menor al compararlo con lo observado por Picconi *et ál.*, 2002 (7 embarazos por mujer). En la literatura existe una fuerte evidencia en relación al aumento del riesgo a desarrollar cáncer de cuello uterino al ser elevado el número de embarazos.<sup>97-99</sup> Por tanto, esta diferencia podría explicar en parte la mayor prevalencia de HPV observada por Picconi *et ál.*, 2002 en mujeres indígenas. Además cabe destacar que, dentro de la población de mujeres quechuas de Jujuy-Argentina no sólo estaban incluidas mujeres con citología normal, sino que también incluía a mujeres con lesiones de bajo grado, alto grado y cáncer de cuello uterino,<sup>81</sup> aumentando así la frecuencia de HPV, la cual aumenta a medida que la severidad de la lesión lo hace.<sup>33,76</sup>

Sin embargo, la frecuencia de HPV observada en el presente estudio (23,2%) es similar a la publicada por Mendoza *et ál.*, en el 2011, observándose una frecuencia del 20,8% en mujeres no indígenas con NSIL procedentes de Asunción y sus alrededores.<sup>76</sup> Además cabe resaltar que, la frecuencia de HPV observada en mujeres indígenas (23,2%) y no indígenas (20,8%) paraguayas con citología normal es mayor a la detectada en Europa (8,1%), Asia (8%), América del Norte (11,3%), Centro América y México (20,4%), y América del Sur (14,3%), siendo comparable a la frecuencia más elevada observada a nivel mundial en África (22,9%), lo cual explicaría en parte la elevada frecuencia de cáncer de cuello uterino en nuestro país, siendo la tasa de incidencia del 2008 de 35x100.000 mujeres.<sup>70,71</sup> Las diferencias en la frecuencia de infección por HPV en los trabajos anteriormente citados pueden deberse a diversos factores como: parámetros geográficos, étnicos, comportamiento sexual, entre otros, así como también la sensibilidad y técnicas utilizadas para la detección de HPV.<sup>100</sup>

El porcentaje de infección por HR-HPV fue de 19,9%, el mismo es comparable al detectado por Mendoza *et ál.*, 2011, en mujeres caucásicas con citología normal (13,5%).<sup>76</sup> También, es comparable al resultado obtenido por Girianelli *et ál.*, 2009, en 1236 mujeres caucásicas brasileras, observándose una frecuencia del 12,5%.<sup>101</sup> Pero a su vez es menor a la publicada por Tonon *et ál.*, 2004, en mujeres indígenas guaraníes (34,6%) de Misiones-Argentina, lo cual puede deberse a las diferencias existentes en las características sexuales entre ambas poblaciones, expuestas anteriormente.<sup>80</sup> Se ha estimado que el 10% de mujeres sin lesiones intraepiteliales y positivas para HR-HPV podrían desarrollar lesiones de alto grado en un periodo de 6 años.<sup>102</sup>

El tipo de HPV más frecuente tanto en infecciones simples como en las múltiples fue el 16, lo cual también fue observado en los trabajos anteriormente citados. La frecuencia de HPV 16 observada en la población de mujeres indígenas fue del 4,4%, la cual es mayor a la prevalencia mundial detectada por Sanjosé *et ál.*, 2007 en 157.879 mujeres con citología normal.<sup>71</sup> Estudios determinan que mujeres con infección persistente por HPV 16 poseen una mayor probabilidad de desarrollar lesiones precancerosas al ser comparadas con mujeres infectadas por otros tipos de HPV.<sup>50-52</sup> En el estudio desarrollado por Kjaer *et ál.*, 2010, observaron que mujeres con citología normal e infección persistente por HPV 16 poseen aproximadamente un 30% de probabilidad de desarrollar lesiones de alto grado en un periodo de 12 meses.<sup>41</sup>

Los otros tipos de HPV más frecuentes detectados en el presente trabajo fueron el 45 y el 58, ambos con una frecuencia del 3,3%. Sanjosé *et ál.*, 2007, informó que en mujeres con citología normal pertenecientes a América del Sur el HPV 58 (1,2%) fue el segundo tipo más frecuente, sin embargo el HPV 45 (0,9%) ocupó el cuarto lugar en frecuencia.<sup>71</sup>

Estudios revelan que el HPV 45 es poco frecuente en mujeres con citología normal (0,4%) o mujeres con LSIL grado (3,7%) en comparación a la frecuencia de HPV 16 de 2,5% y 20%, respectivamente.<sup>103</sup> Sin embargo, es el tercer tipo más común en mujeres con cáncer de cuello uterino en el mundo y en mujeres con cáncer de cuello uterino en el país.<sup>73,74</sup> Además, se ha observado que mujeres con cáncer de cuello uterino y positivas para HPV 45 tienen mayor riesgo de desarrollar a temprana edad cáncer invasivo en comparación a mujeres con cáncer de cuello uterino con otros tipos de HPV, lo cual sugiere la pronta progresión a cáncer invasivo inclusive sin pasar por los estadios de lesiones precancerosas.<sup>73,104</sup> Por tanto, estos resultados sugieren que debería realizarse un control periódico de las mujeres positivas para HPV a fin de prevenir el desarrollo de lesiones que puedan desarrollar un cáncer. Sin embargo, según sugerencias de trabajos previos las 139 mujeres negativas para HPV y con citología normal (77%) tienen baja probabilidad de desarrollar lesiones de alto grado en los próximos 5 años.<sup>102,105-107</sup>

Se detectó una elevada frecuencia de infecciones múltiples, del 9,4%, dicha frecuencia es mayor a la publicada por Mendoza *et ál.*, 2011, en mujeres no indígenas con NSIL (4,3%). Esta diferencia podría atribuirse en parte a las diferencias en las medianas de edad en ambas poblaciones, siendo de 35 años en la población estudiada por Mendoza *et ál.*, 2011 y de 30 años en el presente trabajo.<sup>76</sup> Se ha observado que la frecuencia de infección múltiple por HPV disminuye a medida que aumenta la edad de la mujer.<sup>108</sup>

Al mismo tiempo, la frecuencia de infecciones múltiples encontradas en las mujeres participantes es mayor a la publicada por Rousseau *et ál.*, 2003, la cual fue de 3%, en 2059 mujeres brasileras con citología normal. Este hecho podría atribuirse a las diferencias en cuanto a las metodologías utilizadas. En el estudio realizado por Rousseau *et ál.*, 2003, se

utilizó PCR MY09/11 seguida de hibridación o cortes con enzimas de restricción y en el presente estudio se utilizó la PCR PGMY09/11biot seguida de hibridación lineal reversa, la cual es más sensible.<sup>91,109</sup> Por otro lado, la frecuencia encontrada fue menor a la publicada por Picconi *et ál.*, 2002, en donde observaron que un 18% (19/108) de mujeres quechuas con citología normal presentaban infecciones múltiples por HPV, lo cual podría deberse a las diferencias existentes en las características sexuales de las mujeres en ambos estudios, anteriormente citadas.<sup>81</sup>

Considerando sólo a las mujeres con infecciones por HPV, el 40,4% de las infecciones fueron múltiples. La frecuencia de infecciones múltiples reportada en el presente trabajo es mayor a la publicada por Pista *et ál.*, 2011, la cual fue de 19,4%, en mujeres caucásicas con citología normal y positivas para HPV.<sup>110</sup> Sin embargo, la frecuencia observada es comparable a la hallada en el trabajo realizado por Menegazzi *et ál.*, 2009 donde la frecuencia de infecciones múltiples en mujeres caucásicas positivas para HPV con y sin lesión fue de 41,7%.<sup>108</sup> Por otro lado, en un estudio que incluyó a 893 mujeres colombianas caucásicas e indígenas positivas para HPV la frecuencia de infecciones múltiples observada fue del 59,8%, la cual es mayor a la observada en las mujeres indígenas participantes.<sup>111</sup> Por tanto, las frecuencias detectadas de infecciones múltiples en los diferentes estudios citados son muy variables, lo cual al igual que las diferencias en frecuencias observadas por infección de HPV podrían deberse a varios factores como parámetros étnicos, demográficos, siempre y cuando las metodologías utilizadas para la detección sean comparables.<sup>100</sup>

Aún no es bien conocido el rol que cumplen las infecciones múltiples en el desarrollo de las lesiones cervicales, sin embargo a pesar de ello hay evidencia de que en una infección múltiple cada lesión cervical es desarrollada por un tipo de HPV.<sup>112</sup>

Existen controversias con respecto a si las infecciones múltiples por HPV tienen relación o no a un mayor riesgo de desarrollo de lesiones cervicales, en el estudio realizado por Gargulio *et ál.*, 2007, en 213 mujeres italianas no se encontró diferencias estadísticamente significativas con respecto a si las infecciones múltiples por HR-HPV son mejores predictoras que las infecciones simples por HR-HPV para el desarrollo de lesiones cervicales.<sup>113</sup> En cambio existen varios estudios que han observado que a medida que aumenta la severidad de la lesión cervical aumenta la frecuencia de las infecciones múltiples en mujeres positivas para HPV.<sup>110,114</sup>

Con respecto a los resultados citológicos todas las mujeres participantes del presente estudio presentaron NSIL, de las cuales un 13,4% presentó citología inflamatoria. La frecuencia de citología inflamatoria observada en las mujeres indígenas participantes es mucho menor a la observada por Tonon *et ál.*, 2004 en 207 mujeres indígenas guaraníes de Misiones-Argentina, la cual fue del 96%. Cabe destacar que, las diferencias existentes entre las frecuencias observadas en citologías inflamatorias e infecciones por HPV pueden deberse a las diferencias existentes entre las características socio-demográficas, de comportamiento sexual, entre otras, expuestas ya anteriormente.<sup>80</sup>

Se observó que 71% de las mujeres indígenas participantes se realizaron el PAP por primera vez. Este resultado refleja lo observado por Kasamatsu *et ál.*, 2006 donde se menciona que el examen citológico cervicovaginal (PAP), método de prevención contra el cáncer de cuello uterino utilizado en el país, no supera el 10% de cobertura a nivel

nacional.<sup>115</sup> Además, según datos proporcionados (no publicados) por el Director del Laboratorio Central de Citodiagnóstico del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, al comparar los resultados del PAP de mujeres paraguayas de 2001 vs. 2006, en éste último año se observó un aumento del diagnóstico de PAP anormal (0.5% vs. 1,1%).<sup>115</sup> Estos datos sugieren que es preciso aumentar el tamaño de muestra del estudio para obtener datos más representativos con respecto a la frecuencia de lesiones de cuello uterino en mujeres indígenas.

En relación a la infección por HPV según edad se observó una mayor frecuencia de infección por HPV (27%) en mujeres menores a 30 y mayores a 50 años de edad, obteniéndose así una curva en forma de U, lo cual también fue observado en la mayoría de los estudios de América del Sur y América Central.<sup>71,116</sup> Estudios de Honduras,<sup>117</sup> México,<sup>118</sup> Colombia,<sup>119</sup> Costa Rica,<sup>120</sup> y Chile<sup>121</sup> han detectado una elevada frecuencia de infección por HPV en mujeres menores a 30 años, esta frecuencia decrece a medida que aumentan los años, sin embargo se observó un segundo pico en mujeres mayores. La edad del segundo pico difiere de región en región, por ejemplo en Honduras,<sup>117</sup> Chile,<sup>121</sup> y México<sup>118</sup> el segundo pico se observa en mujeres mayores a 40 años de edad. Por otro lado, en Costa Rica<sup>119</sup> y Colombia,<sup>119</sup> el segundo pico se observa en mujeres mayores a 50 años de edad. Sin embargo, en São Paulo-Brasil y en Concordia-Argentina, se ha demostrado una disminución consistente de la frecuencia de HPV a medida que aumenta la edad.<sup>122,123</sup> Se ha tratado de explicar este tipo de curva, probablemente la disminución de la frecuencia por HPV en mujeres mayores a 30 años de edad se deba a que la mayoría de las mujeres a esa edad ya han estado expuestas a la infección por HPV, la cual pudo resolverse a través de la propia inmunidad.<sup>37</sup>

Aún no está claro a qué podría deberse la aparición de un segundo pico, el mismo es observado normalmente en mujeres con edades cercanas a la menopausia.

Los argumentos que intentan explicar el segundo aumento en la frecuencia de infección por HPV son:

- Que pueda deberse a una reactivación de la infección latente tras una senescencia inmunológica y / o
- Cambios en la conducta sexual, adquisición de nuevas parejas sexuales, aumentando el riesgo de adquirir infecciones por HPV.

Estudios de seguimiento demuestran una elevada tasa de nuevas parejas sexuales en mujeres de 40 años edad, lo cual es más frecuente en poblaciones desarrolladas.<sup>124,125</sup>

Por otra parte, la diferencia de casi diez años en los intervalos de edad en la que se observa el segundo pico en los Estados Unidos (35-44 años) en comparación a Europa (45-54 años), sugiere un factor de comportamiento en lugar de un efecto biológico ligado a la menopausia o del envejecimiento.

En lo que respecta a las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos se observó una asociación estadísticamente significativa entre un número de parejas sexuales mayor a 2 y la adquisición de infección por HPV, corroborando lo observado por Almonte *et ál.*, 2011, donde mujeres con un elevado número de parejas sexuales poseían mayor probabilidad de adquirir la infección por HPV, e inclusive según el estudio realizado por Pista *et ál.*, 2012, dicha probabilidad era 5 veces mayor en mujeres con un número de parejas sexuales mayor a 5 en comparación a mujeres con una sola pareja sexual.<sup>96,126</sup> Además, al aumentar el número de parejas sexuales mayor es la probabilidad de que la infección por HPV sea persistente.<sup>96</sup>

También, se observó una asociación estadísticamente significativa entre la media de edad de inicio de relaciones sexuales y la adquisición de infección por HPV. La infección por HPV a menudo se produce poco después del inicio de las relaciones sexuales. La edad de inicio de relaciones sexuales es una aproximación a la edad de la primera exposición al HPV.<sup>127</sup> Se ha postulado que la misma es un factor de riesgo para la adquisición de la infección por HPV. Almonte *et ál.*, 2011, describen que mujeres con un inicio de relaciones sexuales menor a 18 años poseen prácticamente dos veces mayor probabilidad de adquirir infección por HPV de alto riesgo, pero a su vez en el trabajo realizado por Deacon *et ál.*, 2000, observaron que mujeres con un inicio de relaciones sexuales temprano (16 años o menos) y positivas para HPV poseen tres veces mayor probabilidad a desarrollar lesiones de alto grado en comparación a mujeres positivas para HPV cuyas edades de inicio de relaciones sexuales fueron a mayor edad.<sup>53,95</sup> Al mismo tiempo, se observó que tanto el inicio temprano de relaciones sexuales como el número de parejas sexuales se encuentran independientemente asociados a la adquisición de infección por HPV. En contraposición a otros estudios que sugieren que la edad de inicio de relaciones sexuales es una predictora del número de parejas sexuales, ya que al tener un inicio temprano de las relaciones sexuales, mayor es la probabilidad de tener un mayor número de parejas sexuales.<sup>31,128</sup>

En relación al nivel educativo se observó una elevada frecuencia de mujeres indígenas sin escolaridad (39%), la cual es similar a los datos publicados por la Dirección General de Estadísticas, Encuestas y Censos (DGEEC), siendo el 39% de la población de 15 años o más analfabeta.<sup>78</sup> La misma es mayor al porcentaje de la población sin escolaridad a nivel país (5,4%), pero por otro lado es menor a la frecuencia de analfabetismo observada en 207 mujeres guaraníes de Misiones Argentina (87%).<sup>78,80</sup>

Estudios demuestran que el bajo nivel de educación está asociado a una mayor probabilidad de infección por HPV y al desarrollo de cáncer de cuello uterino.<sup>96,129</sup> En el presente trabajo a pesar de la alta frecuencia de analfabetismo no se observó asociación estadísticamente significativa entre el bajo nivel educativo y la presencia de infección por HPV. Esto podría atribuirse a que, la población analizada es muy homogénea en cuanto a esta característica, donde el 93% de las mujeres participantes posee como máximo 6 años de escolaridad. La mediana de años de escolaridad observada fue de 2 años (IC<sub>25%-75%</sub> 0-4 años de escolaridad), siendo semejante a los datos en indígenas publicados por la DGEEC en el 2003 (2,2 años de escolaridad).<sup>77</sup>

La mediana del número de embarazo observada en la población fue de 3 embarazos por mujer (IC<sub>25%-75%</sub> 2-6 embarazos por mujer), lo cual difiere con lo publicado por la DGEEC en el 2003, donde se observó una tasa de fecundidad de 6 hijos/mujer. Esta disminución en el número de embarazos por mujer puede deberse a que un gran porcentaje de las mujeres incluidas en el estudio utilizaban como método anticonceptivo los hormonales (60%). La frecuencia de utilización de anticonceptivos hormonales por las mujeres indígenas fue mayor a la observada por Mendoza *et ál.*, 2011, en mujeres no indígenas con citología normal (29%).<sup>76</sup> Cabe destacar que, en las visitas realizadas se observó que las mujeres indígenas guardaban una planilla de vacunación, donde se anotaba la fecha en la cual se aplicaron el anticonceptivo y la fecha correspondiente a la próxima aplicación.

Existen discrepancias sobre la asociación del uso de anticonceptivos hormonales con el desarrollo de cáncer de cuello uterino en mujeres positivas para HPV, sin embargo, en el trabajo realizado por Smith *et ál.*, 2003, se observó que mujeres positivas para HPV

con un uso de 10 o más años de anticonceptivos hormonales poseen dos veces mayor probabilidad de desarrollar cáncer de cuello uterino en comparación a mujeres que no lo han utilizado.<sup>54</sup>

En el estudio realizado por la Colaboración Internacional de estudios epidemiológicos de cáncer de cuello uterino (*International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer*) incluyendo más de 30.000 mujeres se observó que, el riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino aumentaba con el uso prolongado de anticonceptivos orales. Mujeres con un uso por más de 5 años poseían el doble de riesgo en comparación a mujeres que no lo han utilizado.<sup>130</sup> El mecanismo propuesto para la actuación de los anticonceptivos hormonales como factores de riesgo para el desarrollo de lesiones o cáncer de cuello uterino es que, los estrógenos o progestágenos aumentan la expresión génica del HPV en el cuello uterino a través de receptores de progesterona, y elementos de respuesta a hormonas en el genoma viral.<sup>33</sup>

Finalmente, se pudo observar que en la población estudiada existen factores de riesgo predisponentes al desarrollo de lesiones cervicales, por ende es de suma importancia el control ginecológico en forma periódica.

# **6. Conclusiones**

- Todas las mujeres presentaron citología NSIL, siendo el 13,8% de ellas inflamatorias.
- La frecuencia de infección por HPV fue de 23,2%, detectándose 17 tipos de HR-HPV en el 19,9% de las mujeres indígenas y 6 tipos de LR-HPV en el 9,4%.
- El tipo viral más frecuente fue el HPV 16 (4,4%) seguido por el HPV 58 (3,3%), HPV 45 (3,3%) y HPV 53 (2,8%), HPV 11 (2,8%).
- La frecuencia de infecciones múltiples en la población total fue del 9,4%.
- Considerando sólo a las mujeres positivas para HPV, en el 57,1% de las mismas se observó infección simple, en el 40,4% infección múltiple, y en el 2,4% infecciones con tipos indeterminados de HPV.
- En relación a la edad y la frecuencia de infección por HPV, se observó una mayor frecuencia en mujeres menores a 30 años (27%) y en mujeres de 50 o más años (27%).
- Con respecto a las características socio-demográficas y antecedentes ginecológicos en relación a la infección por HPV se observó una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de infección por HPV, un inicio de relaciones sexuales a una edad menor o igual a 16 años ( $p=0,018$ ) y un número de parejas sexuales mayor a 2 ( $p=0,028$ ).
- Finalmente estos datos contribuyen a la vigilancia de tipos de HPV circulantes, siendo de suma importancia a fin de comparar los tipos de HPV circulantes en la era pre y post introducción de la vacuna contra el HPV. Además, se logró establecer lazos entre instituciones nacionales e internacionales con miras a mejorar la

detección y prevención de cáncer de cuello uterino, lo cual optimizará la atención primaria de esta patología en el país.

# **7. Perspectivas**

- Secuenciar la muestra de cuello uterino positiva para HPV de tipo indeterminado.
- Determinar la variabilidad genética de HPV 16 y de otros tipos de HR-HPV, detectados en el presente trabajo.
- Implementar en el Laboratorio del Departamento de Salud Pública y Epidemiología la técnica de PCR PGMY09/11biot seguida de RLB para realizar la tipificación de HPV.
- Determinar la frecuencia de tipos de HPV y de otras infecciones de transmisión sexual en mujeres de otras comunidades indígenas y en poblaciones de riesgo para la adquisición de infección viral y desarrollo de cáncer de cuello uterino.

## **8. Referencias Bibliográficas**

1. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol.* 1976 Nov-Dec;20(6):505-9.
2. Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol.* 1977 May-Jun;21(3):379-90.
3. Della Torre G, Pilotti S, de Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori.* 1978 Oct 31;64(5):549-53.
4. Hills E, Lavery CR. Electron microscopic detection of papilloma virus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smear. *Acta Cytol.* 1979 Jan-Feb;23(1):53-6.
5. Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol.* 1982 Oct;44(1):393-400.
6. Gissmann L, deVilliers EM, zur Hausen H. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int J Cancer.* 1982 Feb 15;29(2):143-6.
7. Zachow KR, Ostrow RS, Bender M, Watts S, Okagaki T, Pass F, Faras AJ. Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. *Nature.* 1982 Dec 23;300(5894):771-3.
8. Green M, Brackmann KH, Sanders PR, Loewenstein PM, Freel JH, Eisinger M, Switlyk SA. Isolation of a human papillomavirus from a patient with epidermodysplasia verruciformis: presence of related viral DNA genomes in human urogenital tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Jul;79(14):4437-41.
9. 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 Apr 1;124(7):1626-36. doi: 10.1002/ijc.24116.
10. 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 Oct;62(10):870-8. doi: 10.1136/jcp.2008.063149. Epub 2009 Aug 25.
11. Trottier H, Burchell AN. Epidemiology of Mucosal Human Papillomavirus Infection and Associated Diseases. *Public Health Genomics.* 2009;12:291–307.
12. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics* 2009;12:281–90.

13. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27.
14. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen Hz, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010 May 25;401(1):70-9. Epub 2010 Mar 5.
15. Muñoz N, Bosch FX, Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et ál. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
16. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et ál. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group A review of human carcinogens – Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009;10:321–322.
17. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et ál. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):12-9.
18. Egawa K. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 2003;207:251–4.
19. Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, et ál. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J Virol* 1996;70:1912–22.
20. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007 Sep 8;370(9590):890-907.
21. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 2002;24:275–90.
22. 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
23. De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, Hudson JB, Laimins LA, Wilbanks GD. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 1993;49:303–10.
24. Stanley MA, Browne HM, Appleby M, Minson AC. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer* 1989;43:672–6.
25. Madison KC. Barrier function of the skin: “la raison d’etre” of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003;121:231–41.

26. Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, Stoppler MC, Koval D, Schlegel R. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology* 1997;237:296–306.
27. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;20:7888–98.
28. Middleton K, Peh W, Southern SA, Griffin HM, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003;77:10186–201.
29. Ozbun MA, Meyers C. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 1998b;72:2715–22.
30. Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf E, Hartley O, Prospero T, et al. Characterisation of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high affinity synthetic fabs to E4. *Virology* 1997;238:40–52.
31. Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL. Chapter 6: epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006; 24 (suppl 3): S52–61.
32. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, et al. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med.* 2007 Jul;13(7):857-61. Epub 2007 Jul 1.
33. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24 (suppl 3): S1–10.
34. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003; 157:218–26.
35. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32 (suppl 1): S16–24.
36. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357(9271):1831–6.
37. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006; 24 (suppl 1): S16–22.

38. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; (31): 14–9.
39. Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Apr 20;97(8):577-86.
40. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch M, Wheeler CM. A 2-year prospective study of HPV persistence among women with ASCUS or LSIL cytology. *J Infect Dis* 2007; 195: 1582–89
41. Kjør SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Oct 6;102(19):1478-88. Epub 2010 Sep 14.
42. Cox JT, Schiffman M, Solomon D. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 1406–12.
43. Pretorius RG, Peterson P, Azizi F, Burchette RJ. Subsequent risk and presentation of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 3 or cancer after a colposcopic diagnosis of CIN 1 or less. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Nov;195(5):1260-5.
44. Östör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:186–92.
45. Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: an ALTS report. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 805–15.
46. von Knebel DM. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229–42
47. Gustafsson L, Ponten J, Zack M, Adami HO. International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer Causes Control* 1997; 8: 755–63.
48. Chang AR. Carcinoma in situ of the cervix and its malignant potential. A lesson from New Zealand. *Cytopathology* 1990; 1: 321–28.

49. Kinlen LJ, Spriggs AI. Women with positive cervical smears but without surgical intervention. A follow-up study. *Lancet* 1978; 2: 463–65.
50. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et ál. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005; 337: 76–84.
51. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et ál. 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):1072-9.
52. Castle PE, Solomon 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
53. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, et ál. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer.* 2000 Dec;83(11):1565-72.
54. Smith JS, Green J, Berrington de González A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et ál. Cervical cancer and the use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003;361:1159–67.
55. Bonanni P, Boccalini S, Bechini A. Efficacy, duration of immunity and cross protection after HPV vaccination: a review of the evidence. *Vaccine.* 2009 May 29;27 Suppl 1:A46-53. Review.
56. Barr E, Tamms G. Quadrivalent human papillomavirus vaccine. *Clin Infect Dis* 2007;45(5):609–17.
57. Carvalho ND, Roteli-Martins C, Teixeira J, Naud P, de Borba P, et ál. Immunogenicity and safety of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 7.3 years. 25th International Papillomavirus Conference. 14-5-2009.
58. Taira AV, Neukermans CP, Sanders GD. Evaluating human papillomavirus vaccination programs. *Emerg Infect Dis* 2004;10(11):1915–23.
59. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H, Unger ER. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2007;56 (RR02):1–24.
60. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and mortality weekly report. Recommended Adult Immunization Schedule- United States, 2009. [www.cdc.gov/mmwr](http://www.cdc.gov/mmwr) 57[53], Q1-Q4. 2009. 27-3-2009.

61. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJLM, Hoyer H, Ratnam S, et ál. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006;119:1095—105.
62. Pretorius RG, Belinson JL. Colposcopy. *Minerva Ginecol.* 2012 Apr;64(2):173-80.
63. International Agency for Research on Cancer. Cervix Cancer Screening. IARC Handbooks on Cancer Prevention. Volume 10. Lyon, France: IARC Press; 2006.
64. Sankaranarayanan R, Gaffikin L, Jacob M, Sellors J, Robles S. A critical assessment of screening methods for cervical neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;89 (suppl 2):S4---S12.
65. Coutlée F, Mayrand MH, Provencher D, Franco E. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diag Virol* 1997; 8: 123–141.
66. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:80–88
67. Lorincz A, Anthony J. Advances in HPV detection with hybrid capture. *Papillomavirus Rep* 2002; 12: 145–154.
68. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D; 2006 ASCCP-Sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. *J Low Genit Tract Dis.* 2007 Oct;11(4):201-22.
69. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 12–17.
70. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
71. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et ál. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul;7(7):453-9.
72. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007 Aug 1;121(3):621-32.

73. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et ál. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010 Nov;11(11):1048-56. Epub 2010 Oct 15.
74. Kasamatsu E, Cubilla AL, Alemany L, Chaux A, Tous S, et ál. Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in Paraguay. A study of 432 cases. *J Med Virol*. 2012 Oct;84(10):1628-35. doi: 10.1002/jmv.23373.
75. Rolón PA, Smith JS, Muñoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et ál. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer*. 2000 Feb 15;85(4):486-91.
76. Mendoza LP, Arbiza J, Paez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G, et ál. Distribution of human papillomavirus genotypes in Paraguayan women according to the severity of the cervical lesion. *J Med Virol*. 2011 Aug;83(8):1351-7. doi: 10.1002/jmv.22112. Epub 2011 May 26.
77. Dirección General de Encuestas, Estadística y Censo (DGEEC). Características sociodemográficas de la población indígena. En: II Censo Nacional Indígena de población y viviendas 2002. Pueblos indígenas del Paraguay. Resultados finales. Fernando de la Mora-Paraguay: DGEEC; 2003. pag.11-30.
78. DGEEC. Principales resultados EHI/2008. Encuesta de Hogares de Indígenas. DGEEC; 2008. Disponible en: <http://www.dgeec.gov.py/>
79. Moreno AR, Gini L. Reproducción matrimonial y familia de los aborígenes del Paraguay. Sin editorial. Asunción. 1987.
80. Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB, Nardari W, Mampaey M, Badano I, et ál. Human papillomavirus cervical infection in Guarani Indians from the rainforest of Misiones, Argentina. *Int J Infect Dis*. 2004 Jan;8(1):13-9.
81. Picconi MA, Gronda J, Alonio LV, Villa LL, Sichero L, Miranda S, et ál. [Human Papilloma virus in Quechua women from Jujuy with high frequency of cervical cancer: viral types and HPV-16 variants]. *Medicina (B Aires)*. 2002;62(3):209-20.
82. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady BG, Newman TB. *Designing clinical research*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
83. Sijvarger CC, González JV, Prieto A, Messmer AG, Mallimaci MC, Alonio VL, et ál. Epidemiología de la infección cervical por virus Papiloma humano en Ushuaia: Argentina. *Rev. argent. Microbiol* 2006 Mar; 38(1): 19-24.

84. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Brocker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.
85. [http://www.who.int/biologicals/areas/human\\_papillomavirus/WHO\\_HP\\_V\\_LabNet/en/index.html](http://www.who.int/biologicals/areas/human_papillomavirus/WHO_HP_V_LabNet/en/index.html)
86. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994 Nov;17(5):914-21.
87. Wanderlei-Silva D, Nobre M, Silva Gonzaga R, Silva Viana L, and Ármalo Neto E. High quality DNA from human papillomavirus (HPV) for PCR/RFLPs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2005 Jan;48(1):37-4.
88. Human Papillomavirus Laboratory Manual, WHO HPV LabNet, First Edition 2009
89. Eklund C, Zhou T, Dillner J, and for the WHO Human Papillomavirus Laboratory Network Global Proficiency Study of Human Papillomavirus Genotyping *J Clin Microbiol*. 2010 November; 48(11): 4147–4155.
90. Eklund C, Forslund O, Wallin KL, Zhou T, Dillner J; WHO Human Papillomavirus Laboratory Network. The 2010 global proficiency study of human papillomavirus genotyping in vaccinology. *J Clin Microbiol*. 2012 Jul;50(7):2289-98. doi: 10.1128/JCM.00840-12. Epub 2012 Apr 25
91. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):357-61.
92. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98
93. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
94. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriaty A, O'Connor D, Prey M, et al. For the Forum Group Members and the Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System. Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*. 2002;287:2114-9.
95. Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Dec;21(9):1654-63.

96. Almonte M, Silva Idos S, Asare A, Gilham C, Sargent A, Bailey A, et ál. Sexual behavior and HPV infection in British women, by postal questionnaires and telephone interviews. *J Med Virol*. 2011 Jul;83(7):1238-46. doi: 10.1002/jmv.22085. Epub 2011 Apr 22.
97. 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 Sep 1;119(5):1108-24.
98. 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.
99. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008 Aug 19;26 Suppl 11:L16-36.
100. Ripabelli G, Grasso GM, Del Riccio I, Tamburro M, Sammarco ML. Prevalence and genotype identification of human papillomavirus in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Molise, Central Italy. *Cancer Epidemiol*. 2010 Jan 14. [Epub ahead of print]
101. Girianelli VR, Azevedo E Silva G, Thuler LC. Factors associated with the risk of progression to precursor lesions or cervical cancer in women with negative cytologic findings. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009 Dec;107(3):228-31. Epub 2009 Aug 28.
102. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et ál; Joint European Cohort Study. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ*. 2008 Oct 13;337:a1754. doi: 10.1136/bmj.a1754.
103. Franceschi S, Clifford GM. A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 938–39
104. Muñoz N, Hernandez-Suarez G, Méndez F, Molano M, Posso H, Moreno V, et ál; Instituto Nacional de Cancerología HPV Study Group. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*. 2009 Apr 7;100(7):1184-90. Epub 2009 Mar 17
105. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, et ál. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst*. Jan 1; 2003 95(1):46–52. [PubMed: 12509400]

106. Meshner D, Szarewski A, Cadman L, Cubie H, Kitchener H, Luesley D, et ál. Long-term follow-up of cervical disease in women screened by cytology and HPV testing: results from the HART study. *Br J Cancer*. Apr 27; 2010 102(9):1405–10. [PubMed: 20354519]
107. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, et ál. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol*. 2011 Jul;12(7):663-72. Epub 2011 Jun 16. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2011 Aug;12(8):722
108. Menegazzi P, Barzon L, Palù G, Reho E, Tagliaferro L. Human papillomavirus type distribution and correlation with cyto-histological patterns in women from the South of Italy. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2009;2009:198425. Epub 2010 Jan 24.
109. Rousseau MC, Villa LL, Costa MC, Abrahamowicz M, Rohan TE, Franco E. Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. *Sex Transm Dis*. 2003 Jul;30(7):581-7.
110. Pista A, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jun;17(6):941-6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03387.x. Epub 2010 Dec 3.
111. Soto-De Leon SC, Camargo M, Sanchez R, Leon S, Urquiza M, Acosta J, et ál. Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jan;15(1):100-2. Epub 2008 Dec 19.
112. Quint W, Jenkins D, Molijn A, Struijk L, van de Sandt M, Doorbar 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 May;227(1):62-71. doi: 10.1002/path.3970. Epub 2012 Feb 17.
113. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, et ál. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res*. 2007 May;125(2):176-82. Epub 2007 Jan 25.
114. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M, et ál; CVT Group. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis*. 2011 Apr 1;203(7):910-20.

115. Kasamatsu, E, Páez, M. Cáncer de cuello uterino y virus del papiloma humano en Paraguay. Perspectivas para la prevención primaria. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, dic. 2006, vol.4, no.2, p.58-63. ISSN 1812-9528.
116. Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J Adolesc Health*. 2008 Oct;43(4 Suppl):S5-25, S25.e1-41.
117. Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA, Claros JM, et ál. Human papillomavirus infection, cervical dysplasia and invasive cervical cancer in Honduras: a case-control study. *Int J Cancer*. 1999 Sep 9;82(6):799-803.
118. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*. 2001 Feb 1;91(3):412-20.
119. Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S, et ál; HPV Study Group HPV Study. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*. 2002 Jul 29;87(3):324-33.
120. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, Balmaceda I, Greenberg MD, Alfaro M, Burk RD, Wacholder S, Plummer M, Schiffman M. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Mar 15;92(6):464-74.
121. Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, Ampuero SL, Snijders PJ, Meijer CJ, et ál. Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Dec;13(12):2271-6.
122. Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer*. 1994 Jan;69(1):114-9.
123. Matos E, Loria D, Amestoy GM, Herrera L, Prince MA, Moreno J, et ál; Proyecto Concordia Collaborative Group. Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study. *Sex Transm Dis*. 2003 Aug;30(8):593-9.
124. Muñoz N, Mendez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, et ál. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004;190(12):2077-87.

125. Wellings K, Collumbien M, Slaymaker E, Singh S, Hodges Z, Patel D, et ál. Sexual behaviour in context: a global perspective. *Lancet* 2006;368(9548): 1706–28.
126. Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O; CLEOPATRE Portugal Study Group. Risk factors for human papillomavirus infection among women in Portugal: The CLEOPATRE Portugal Study. *Int J Gynaecol Obstet.* 2012 Aug;118(2):112-6. Epub 2012 May 16.
127. Plummer M, Peto J, Franceschi S; International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. *Int J Cancer.* 2012 Jun 1;130(11):2638-44. doi: 10.1002/ijc.26250. Epub 2011 Aug 12.
128. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, et ál. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer* 2001;84(9):1219–26.
129. Franceschi S, Plummer M, Clifford G, de Sanjose S, Bosch X, Herrero R, et ál; International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study Groups; International Agency for Research on Cancer Human Papillomavirus Prevalence Surveys Study Group. Differences in the risk of cervical cancer and human papillomavirus infection by education level. *Br J Cancer.* 2009 Sep 1;101(5):865-70. Epub 2009 Aug 4.
130. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, et ál. 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 Nov 10;370(9599):1609-21

# **9. Anexos**

**ANEXO 1: CUESTIONARIO APLICADO A LAS MUJERES A FIN DE OBTENER DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS DE LAS PACIENTES SELECCIONADAS.**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA Y EPIDEMIOLOGÍA**

**FICHA CLÍNICA Y EPIDEMIOLÓGICA**

**I. DATOS DE LAS MUJERES**

Ficha: 

--	--	--

Nombre y Apellido de la paciente.....Comunidad:.....

Dirección.....Teléfonos.....

Nacionalidad..... 4. Edad.....años

Fecha de toma de muestra 

--	--	--

 Fecha de recepción de muestra 

--	--	--

 Firma.....

Material Colectado por: Dr/a<sup>1</sup>..... Lic<sup>2</sup>: .....

**II. PERCEPCIÓN DE LA PACIENTE: ANTECEDENTES GINECOLÓGICOS**

Citología (PAP) anterior:  Si<sup>1</sup>                       No<sup>2</sup>    Fecha...../...../.....                      Resultado.....  
 No recuerda<sup>9</sup>

¿Recibió tratamiento?                       Si<sup>1</sup>                       No<sup>2</sup>

¿Qué tratamiento?.....

Colposcopia:                       Si<sup>1</sup>                       No<sup>2</sup>    Fecha...../...../.....

Resultado.....

Histopatología:                       Si<sup>1</sup>                       No<sup>2</sup>    Fecha...../...../.....

Resultado.....

No recuerda<sup>9</sup>

**III. ANTECEDENTE GINECOLOGICO / OBSTETRICO / CLINICO**

FUM.....    Vida Sexual     Activa<sup>1</sup>     Inactiva<sup>2</sup>

Inicio de relaciones sexuales: .....años    Número de Embarazo:.....    Nacidos Vivos.....

Edad 1er.Embarazo.....    Aborto     Si<sup>1</sup>                       No<sup>2</sup>

Número de parejas sexuales desde el inicio de sus relaciones sexuales .....

**IV. FACTORES ASOCIADOS (Marque con cruz(x) la opción que corresponda)**

¿Utiliza o utilizó anticonceptivos?:  Oral<sup>1</sup>                      Duración en años.....

Inyectable<sup>2</sup>                      Duración en años.....

¿Fuma?     Si<sup>1</sup>     No<sup>2</sup>    Tiempo de fumadora (días, meses, años).....    N° de cigarrillos por día.....