



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

“DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS T
EN BIOPSIAS DE CÉRVIX DE
PACIENTES INFECTADOS O NO CON
VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 16”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN INMUNOLOGÍA

MILAGROS MARIANN PINTO DÍAZ

LIMA - PERÚ

2019

ASESOR:

Dr. José Luis Aguilar Olano

Dedicatoria:

A las personas que más amo: mis padres y hermanos, por ser la fuente de inspiración
y motivación para superarme cada día más.

A toda mi familia, son la fortaleza en mi desarrollo personal y profesional, gracias
por apoyarme siempre.

Al Laboratorio de Inmunología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia,
al Dr. José Aguilar por su constante apoyo y ejemplo, a mi compañera Sandra Jara
por hacer esta etapa más divertida. A los integrantes del LID-108.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), por brindarme las
facilidades para realizar mi trabajo en sus instalaciones y el apoyo de excelentes
profesionales.

Fuentes de financiamiento:

La presente tesis se realizó en el marco del proyecto

“Círculo para la investigación de agentes infecciosos endémicos causantes de cáncer
en Perú”, el cual se encuentra financiado por 204-2015-FONDECYT.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN:	1
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
3	MARCO TEÓRICO.....	8
3.1	CARACTERÍSTICAS DEL VPH	8
3.2	CLASIFICACIÓN DEL VPH	10
3.2.1	Tipos de VPH de bajo riesgo	10
3.2.2	Tipos de VPH de alto riesgo	11
3.3	CONTAGIO Y TRANSMISIÓN.....	12
3.4	PREVALENCIA DE VPH EN PERÚ	14
3.5	SISTEMA INMUNE Y VPH.....	15
3.5.1	Inmunidad Innata frente al VPH	16
3.5.2	Inmunidad adaptativa frente al VPH.....	17
3.6	LINFOCITOS T EFECTORES (CD4, CD8).....	17
3.6.1	Linfocitos T CD4	18
3.6.2	Linfocitos T CD8	19
3.7	LINFOCITOS T REGULADORES (Treg)	20
4	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	22
5	OBJETIVOS	23

5.1	Objetivo General.....	23
5.2	Objetivos Específicos.....	23
6	METODOLOGÍA:.....	24
6.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	24
6.2	POBLACIÓN.....	25
6.3	MUESTRA	25
6.4	PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS	26
6.4.1	GENOTIPIFICACIÓN DE VPH:.....	26
6.4.2	PCR CUANTITATIVA (qPCR) ó PCR EN TIEMPO REAL (rtPCR)	31
6.4.3	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	32
6.5	CONSIDERACIONES ÉTICAS	36
6.6	PLAN DE ANÁLISIS.....	36
7	RESULTADOS.....	38
7.1	Descripción general de la población en estudio.....	38
7.2	Extracción y cuantificación de ADN de la biopsia cervical.....	39
7.3	PCR convencional: Electroforesis	41
7.4	Genotipificación: Técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)	42
7.5	PCR CUANTITATIVA (qPCR) ó PCR EN TIEMPO REAL (rtPCR)	44
7.6	PCR convencional vs. PCR en tiempo real (rtPCR)	47

7.7 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES

48

7.7.1	Estado Civil vs. Presencia de VPH	48
7.7.2	Edad vs. Presencia de VPH.....	49
7.7.3	Edad vs. Estado civil.....	51
7.7.4	Informe Patológico vs. Presencia de VPH	52
7.7.5	Informe Patológico vs Estado Civil	53

7.8 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LT CD4, LT CD8 y LT reg:

INMUNOHISTOQUÍMICA..... 54

7.8.1	LT CD4 vs. Presencia de VPH.....	54
7.8.2	LT CD4 vs. Presencia de VPH (superficies).....	55
7.8.3	LT CD8 vs. Presencia de VPH.....	57
7.8.4	LT CD8vs. Presencia de VPH (superficies).....	58
7.8.5	LT reguladores vs. Presencia de VPH.....	59
7.8.6	LT reguladores vs. Presencia de VPH (superficies).....	60
7.8.7	Ratio Foxp3/CD4 vs. Presencia de VPH.....	61
7.8.8	Ratio Foxp3/CD4 vs. Presencia de VPH (superficies).....	61
7.8.9	LT CD4 vs. Informe patológico	63
7.8.10	LT CD4 vs. Informe patológico (superficies).....	64
7.8.11	LT CD8 vs. Informe patológico	65

7.8.12	LT CD8 vs. Informe patológico (superficies)	66
7.8.13	LT reguladores vs. Informe patológico	67
7.8.14	LT reguladores vs. Informe patológico (superficies)	68
7.8.15	Ratio Foxp3/CD4 vs. Informe patológico	69
7.8.16	Ratio Foxp3/CD4 vs. Informe patológico (superficies)	70
7.8.17	Presencia de LT reguladores vs. Presencia de VPH.....	71
7.8.18	Presencia de LT reguladores vs. Informe patológico	72
8	DISCUSIÓN	74
9	CONCLUSIONES	86
10	RECOMENDACIONES	87
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

GLOSARIO

- VPH = Virus Papiloma Humano
- NIC ó CIN = Neoplasia intraepitelial cervical
- CCU = Cáncer cérvico-uterino
- PAP = Papanicolaou, método de detección de células anormales en cérvix
- E = Genes de expresión en las etapas tempranas de la infección llamadas E (del inglés Early)
- E1, E2, E4, E5, E6 y E7 = Genes de expresión tempranos
- L = Genes de expresión durante las etapas tardías de la infección llamadas L (del inglés Late)
- L1 y L2 = Genes de expresión tardíos
- LT CD8 = Linfocito T citotóxico
- LT CD4 = Linfocito T helper o ayudador
- LTreg = Linfocito T regulador
- VPH-AR = VPH- Alto Riesgo
- VPH-BR = VPH- Bajo Riesgo
- LCs = Células de Langerhans
- APCs = Células presentadoras de antígenos
- DCs = Células dendríticas
- Foxp3 = Factor de transcripción que es responsable de la generación y función de las células T reguladoras

- ADN o DNA = Ácido desoxirribonucleico
- RFLP = Técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica. Genotipificación
- rtPCR ó qPCR= PCR en tiempo real ó PCR cuantitativa
- INEN = Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

TABLAS Y FIGURAS

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: Volumen de los componentes de la *master mix* para la amplificación del gen L1.

TABLA 2: Programa de amplificación para VPH

TABLA 3: Volumen de los componentes para la mezcla de reacción PCR – RFLP

TABLA 4: Cuantificación de ADN obtenido de los tejidos a evaluados

TABLA 5: Resultados de la técnica de rtPCR para VPH 16 y VPH 18

TABLA 6: Tabla de frecuencias de VPH positivo/ negativo en solteras y casadas

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Genoma del Virus Papiloma Humano

FIGURA 2. Electroforesis en gel de agarosa 3%. M: Marcador 100 pb ; 11-15: muestras de ADN con b-Globina (268 pb); 11-15 muestras de ADN evaluadas para VPH (450 bp). CP: Control positivo, CN: Control negativo.

FIGURA 3. Genotipificación. M: Marcador 100 bp; 13s y 15s: muestras de ADN sin enzima AFA. 13c y 15c muestras de ADN con enzima AFA. CPs: Control positivo sin enzima (450bp), CPc: Control positivo con enzima (310bp).

FIGURA 4. Genotipificación. M: Marcador 100 bp; 29s: muestras de ADN sin enzima AFA. 29c y muestras de ADN con enzima AFA. CPs: Control positivo sin enzima (450bp), CPc: Control positivo con enzima (310bp). FIGURA 6: Curva de amplificación para detección de VPH-16

FIGURA 5. Genotipificación. M: Marcador 100 bp; 74s: muestras de ADN sin enzima AFA. 74c muestras de ADN con enzima AFA. CPs: Control positivo sin enzima (450bp), CPc: Control positivo con enzima (310bp).

FIGURA 6. Curva de amplificación para detección de VPH-16

FIGURA 7. Relación entre Estado Civil vs. VPH positivo/ negativo

FIGURA 8. Relación entre Edad vs. VPH positivo/ negativo

FIGURA 9. Relación entre Edad vs. Estado Civil

FIGURA 10. Relación entre Informe Patológico vs. VPH positivo/ negativo

FIGURA 11. Relación entre Informe Patológico vs. Estado civil

FIGURA 12. Distribución de LT CD4 vs. VPH positivo/ negativo

FIGURA 13: Distribución de LT CD4 vs. VPH positivo/ negativo (superficies)

FIGURA 14. Distribución de LT CD8 vs. VPH positivo/ negativo

FIGURA 15: Distribución de LT CD8 vs. VPH positivo/ negativo (superficies)

FIGURA 16. Distribución de LT reguladores vs. VPH positivo/ negativo

FIGURA 17: Distribución de LT reg vs. VPH positivo/ negativo (superficies)

FIGURA 18: Distribución de Ratio Foxp3/CD4 vs. VPH positivo/ negativo

FIGURA 19: Distribución de Ratio Foxp3/CD4 vs. VPH positivo/ negativo
(superficies)

FIGURA 20. Distribución de LT CD4 vs. Informe patológico

FIGURA 21: Distribución de LT CD4 vs. Informe Patológico (superficies)

FIGURA 22. Distribución de LT CD8 vs. Informe patológico

FIGURA 23: Distribución de LT CD8 vs. Informe Patológico (superficies)

FIGURA 24. Distribución de LTreg vs. Informe patológico

FIGURA 25: Distribución de LTreg vs. Informe patológico (superficies)

FIGURA 26: Distribución de Ratio Foxp3/CD4 vs. Informe patológico

FIGURA 27: Distribución de Ratio Foxp3/CD4 vs. Informe patológico (superficies)

FIGURA 28: Frecuencia de Foxp3 positivo/negativo vs. VPH positivo/ negativo

FIGURA 29: Frecuencia de Foxp3 positivo/negativo vs. Informe patológico

RESUMEN:

La respuesta inmune es un elemento clave para la progresión o remisión de la infección por el Virus Papiloma Humano (VPH) en cérvix uterino. Este estudio tiene como objetivo la determinación de la frecuencia de Linfocitos T CD4+, CD8+ y Treg en biopsias de cérvix de pacientes que podrían tener una infección por VPH de alto riesgo (VPH-AR). Se evaluaron muestras de cérvix con diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), cervicitis crónica (Ccro) y sin alteraciones, las cuales se genotipificaron usando técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional y Real-Time PCR (rtPCR); las poblaciones linfocitarias se marcaron por inmunohistoquímica para el reconocimiento de las poblaciones linfocitarias. Se evaluaron las características poblacionales (estado civil, edad e informe patológico) con respecto a la presencia de VPH. Se encontró una tendencia a que las mujeres solteras tengan más posibilidades de presentar dicha infección y alteraciones patológicas como NIC 1 y Ccro. Sin embargo, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la edad y estado civil con la presencia o ausencia del VPH. También se evaluó la relación de linfocitos efectores (LT CD4, LT CD8) y linfocitos reguladores (LT reg) con respecto a la presencia de VPH. Existe una mayor cantidad de LT CD4 en biopsias positivas para VPH ($p = 0.027$), indicando una respuesta inmune activa, además en la evaluación de la frecuencia de LT CD4 e informe patológico se encontró mayor frecuencia en las biopsias con alguna alteración (NIC, Ccro). También se encontró una mayor presencia de LT CD8 en biopsias sin alteraciones ($p = 0.04$) comparadas a NIC o

Ccro. No se encontró una diferencia establecida entre LT CD8, LT reg y la presencia del VPH. En conclusión el presente estudio indicó que en las etapas tempranas de la infección, donde aún las células no presentan cambios de alto nivel (NIC1), existe la presencia de células causantes de la fase efectora (LT CD4) de la respuesta inmune. En cambio no se pudo distinguir la fase reguladora ya que se evaluaron eventos tempranos de NIC.

PALABRAS CLAVE:

Virus Papiloma Humano, Respuesta inmune, LTCD4, LTCD8, LTreg.

ABSTRACT:

The immune response is a key element for the progression or remission of infection by the Human Papilloma Virus (HPV) in the uterine cervix. The objective of this study is to determine the frequency of CD4 +, CD8 + and Treg T lymphocytes in cervical biopsies of patients who may have a high-risk HPV infection (HPV-AR). We evaluated cervical samples with histopathological diagnosis of cervical intraepithelial neoplastic (NIC), chronic cervicitis (Ccro) and without alterations, which were genotyped using conventional polymerase chain reaction (PCR) and Real-Time PCR (rtPCR); lymphocyte populations were labeled by immunohistochemistry for recognition of lymphocyte populations. The population characteristics (marital status, age and pathological report) with respect to the presence of HPV were evaluated. A tendency was found for single women to have more possibilities of presenting this infection and pathological changes such as Ccro and NIC. However, no statistically significant associations were found between age and marital status with the presence or absence of HPV. The relationship of effector lymphocytes (LT CD4, LT CD8) and regulatory lymphocytes (LT reg) with respect to the presence of HPV was also evaluated. There is a greater amount of CD4 LT in positive biopsies for HPV ($p = 0.027$), indicating an active immune response, in addition in the evaluation of the frequency of CD4 LT and pathological report was found higher frequency in biopsies with some alteration (NIC, Ccro). A greater presence of CD8 LT was also found in biopsies without alterations ($p = 0.04$) compared to Ccro or NIC. No established difference was found between LT CD8, LT reg and the presence of HPV. In

conclusion, the present study indicated that in the early stages of infection, where even the cells do not present high level changes (NIC1), there is the presence of cells that cause the effector phase (CD4 LT) of the immune response. On the other hand, the regulatory phase could not be distinguished since early NIC events were evaluated.

KEY WORDS:

Human papillomavirus, Immune response, CD4 LT, CD8 LT, LT

1 INTRODUCCIÓN:

La infección por el Virus Papiloma Humano (VPH) es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más comunes que afecta tanto a mujeres y hombres sin importar su preferencia sexual (1-3). El VPH forma parte de un grupo de virus de ADN de doble cadena que pertenecen a la familia papovaviridae. Estos virus causan crecimientos anormales en tejidos y cambios a nivel celular. Se han identificado más de 200 tipos del VPH, de los cuales más de 20 tipos están asociados a infecciones en humanos. (1,4).

Son denominados también papiloma virus porque algunos tipos pueden generar verrugas o papilomas, que son un tipo de tumor benigno no canceroso, ocasionados por VPH llamados VPH de bajo riesgo oncogénico (VPH – BR). Otros tipos de VPH se asocian con cánceres como el cervical, vaginal, vulvar, anal y orofaríngeo, a éstos se les conoce como de alto riesgo oncogénico (VPH – AR) (5).

En América, el 15% de mujeres alguna vez en su vida ha tenido una infección con VPH, y 70,7 % de cáncer cervical invasivo en América son atribuidos a los VPH 16 ó 18 (6-8). El Perú tiene una población de 11.42 millones de mujeres mayores de 15 años que están en riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino. Cifras actuales indican que cada año 4600 mujeres son diagnosticadas con cáncer cérvico uterino (CCU) y 1700 mueren por esta causa. Este padecimiento ocupa el primer lugar como el cáncer más habitual en mujeres peruanas entre 15 y 44 años. Se estima que el 6,6%

de las mujeres peruanas en general alberga infección cervical por VPH-16/18 en un momento dado (6).

Es trascendental detectar la infección por VPH – AR como el tipo 16. Métodos de detección como Papanicolaou (PAP) y evaluaciones histopatológicas, seguidos de una evaluación molecular por genotipificación son de gran utilidad para detección y prevención de la infección por VPH.

VPH puede generar diferentes tipos de lesiones en el aparato genital femenino. Por ejemplo cervicitis crónica, la cual es una irritación constante del cuello uterino, que aqueja frecuentemente a las mujeres en edad fértil. La cervicitis se origina por diversas causas, por ejemplo alergia a algún producto de uso íntimo, o por infecciones como clamidia o por VPH. Generando una inflamación del cuello uterino, siendo un lugar propenso para la generación de lesiones más complicadas (9). Por otro lado la presencia de células anormales en la superficie del cuello uterino, se denomina Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Esta lesión es causada, a menudo, por VPH. Se evalúa en una escala de 1 a 3, con base en la apariencia de las células al microscopio y de acuerdo al compromiso del cuello uterino. La NIC 1 tiene células levemente anormales y es menos propensa a volverse cáncer que la NIC 2 o la NIC 3. En la NIC 2 existe compromiso de las células del estrato intermedio del cuello uterino, donde las células se observan moderadamente anormales. Y por último la lesión de alto grado o NIC 3, donde se encuentran compromiso de las células del estrato superficial del cuello uterino. (10)

Cuando se habla de infecciones por cualquier agente es importante y esencial mencionar los mecanismos de defensa inmune. El VPH infecta células epiteliales del cuello uterino, este patógeno generará mecanismos de evasión inmune, disminución de la presentación de antígenos, entre otros (11,12). Existen diferentes estrategias de defensa por parte del huésped, presenta respuestas eficaces contra los antígenos, motivo por el cual varias infecciones se eliminan (11,13,14), con diferentes niveles de complejidad, como los eficientes mecanismos de barrera epitelial, las estrategias de inmunidad innata y la más sofisticada y moderna inmunidad adaptativa, comandada por los linfocitos T y B, con ayuda de otras células efectoras. Responsable de la respuesta inmune adaptativa tenemos a los linfocitos T efectores, células muy influyentes en el desencadenamiento de los mecanismos antivirales ejercidos por el LT helper o ayudador (CD4) y el LT citotóxico (CD8). El LT CD4 se encarga de estimular no sólo a los CD8, sino que a través de sus citoquinas es capaz de activar otros mecanismos antivirales y antitumorales en los que participan macrófagos, células NK (Natural Killer), Células NKT, entre otras. Como parte de esta respuesta, también cumplen un rol crítico la población de Linfocitos T reguladores (Treg) que, en su estrategia de evitar daño colateral al tejido propio, cumplen funciones de supresión inmune local. Sin embargo algunos patógenos biológicamente muy agresivos, utilizan esta función reguladora, inhibiendo el ataque sobre el agente infeccioso. El VPH es uno de estos patógenos inteligentes que usa este sistema. En las enfermedades asociadas con VPH, se observa un incremento de células Treg, contribuyendo a la tolerancia de antígenos virales y al desencadenamiento de la neoplasia y cáncer de cuello uterino (CCU) (15).

La infección por VPH debería de ser detectada por el sistema inmune, ya que es una infección intraepitelial. Dicha evasión se puede deber a que el ciclo de infección de VPH se realiza en las queratinocitos, donde el proceso de replicación y liberación del virus va a generar que las células mueran por la diferenciación, los queratinocitos son células que están programadas para morir por causas naturales. Entonces cuando el VPH infecta a estas células se vale de esta “muerte natural” para no alertar al sistema inmunológico con señales de daño. Estas señales son tan importantes para empezar con el proceso de inflamación y así liberar citoquinas para generar la activación de las células dendríticas, estas células son requeridas para que se produzca una respuesta inmune en el epitelio escamoso (16-18). Algunos estudios concluyen que en las fases iniciales de la infección, donde no hay todavía alteraciones celulares de alto grado, no existe la presencia de células que desencadenan la fase efectora de la respuesta inmune (19). Otros estudios sugieren que los subconjuntos de linfocitos CD4+ y CD8+ tienen un papel importante que cumplir durante la historia natural de las lesiones asociadas con el VPH (20).

En nuestra investigación hemos evaluado las poblaciones celulares de los pacientes con lesiones cérvico-uterinas ocasionadas por VPH, comparado con las poblaciones en lesiones inflamatorias sin presencia de VPH o en cuellos uterinos normales. Inicialmente demostramos la presencia o no de la infección viral mediante la genotipificación de VPH, evaluando luego las subpoblaciones linfocitarias T CD4, CD8 y Treg mediante la técnica de inmunohistoquímica. Buscamos determinar la frecuencia y asociaciones de Linfocitos T CD4+, Linfocitos T CD8+, LTreg

presentes en muestras para diagnóstico de cáncer de cuello uterino, utilizando también información social de la paciente (edad y estado civil).

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CCU sigue siendo un problema importante de salud pública entre las mujeres del mundo en desarrollo. América Latina y el Caribe tienen una de las tasas de incidencia y mortalidad por CCU más altas del mundo (21,20). De acuerdo al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), se estima que la incidencia de casos anuales de CCU en el Perú es de 150 casos cada 100 mil habitantes, lo que correspondería a 45 mil nuevos casos por año.

Los tipos de VPH 16 y 18 son responsables de alrededor del 70% de todos los casos de cáncer cervical en el mundo. En América, aproximadamente 15% de mujeres en la población general, alguna vez en su vida ha tenido la infección del VPH (19-21).

La infección por VPH es la enfermedad de transmisión sexual más común en personas sexualmente activas menores de 30 años. La mayoría de los casos de VPH son asintomáticos y desaparecen en unos meses o en unos pocos años. No obstante, la infección persistente por VPH puede dar lugar a lesiones pre-malignas, carcinoma in situ y cáncer invasivo del cuello uterino (22).

En el Perú, a pesar de ser una zona de alta prevalencia de cáncer cervical, se realizan pocos estudios epidemiológicos y en la mayoría de ellos sólo evalúan la presencia de los genotipos más comunes (VPH 6, VPH 11, VPH 16 y VPH 18). En nuestro país no se tiene información sobre la respuesta inmunológica que se desencadena frente a la infección por VPH ya que es probable que las respuestas inmunes desempeñen un

papel clave en la eliminación o persistencia y progresión de las lesiones cervicales asociadas con el VPH de alto riesgo. Resulta necesario conocer más sobre los mecanismos de ataque del virus y los mecanismos de defensa que pudieran ser exitosos en la erradicación del virus. Este trabajo busca evaluar poblaciones linfocitarias en muestras cervicales con o sin infección por VPH - AR.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL VPH

El VPH es una partícula viral sin envoltura con genoma circular de doble cadena, formado por una cápside de 72 capsómeros los cuales miden 52nm aproximadamente. Estos capsómeros envuelven el genoma facilitando el acoplamiento a proteínas virales de aproximadamente 8 Kb (23).

La alta especificidad que el VPH tiene para infectar epitelios planos estratificados queratinizados se debe a las proteínas de tipo histona a las que se asocia; causando el cambio e inmortalización de sus células blanco asociados con la aparición y persistencia de neoplasias benignas y malignas (26). El VPH tiene seis genes de expresión en las etapas tempranas de la infección llamadas E (del inglés Early) E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y dos genes de expresión durante las etapas tardías del ciclo de replicación denominadas L (del inglés Late) L1 y L2 y por último tiene una región larga de control no codificadora llamada LCR (Figura 1) (25).

La región temprana se encarga de codificar proteínas virales no-estructuradas, esta región está conformada por los genes E1 y E2 que se encargan de regular la replicación y transcripción viral y reconocen el origen de replicación. Los genes E5, E6 y E7 codifican proteínas con poder potencial oncogénico, además E6 y E7 dan estabilidad a los episomas virales y estimulan la diferenciación de las células,

regulando el ciclo celular. El gen E4 está implicado en las últimas etapas del ciclo del virus, interactúa con la queratina del citoesqueleto y facilita el ensamblaje del virus y su emisión (28). La región tardía se encarga de codificar las proteínas que forman la cápside. El gen L1 ocupa 80% del total de la proteína, siendo la principal proteína viral estructural; se autoensambla en capsómeros y cápsides. Los virus como partículas pueden ser producidos por expresión de L1 sólo o en combinación con el gen L2. El gen L2 es la proteína viral estructural menor; interactúa con el ADN y se cree que facilita el ensamblaje del virión (25-27).

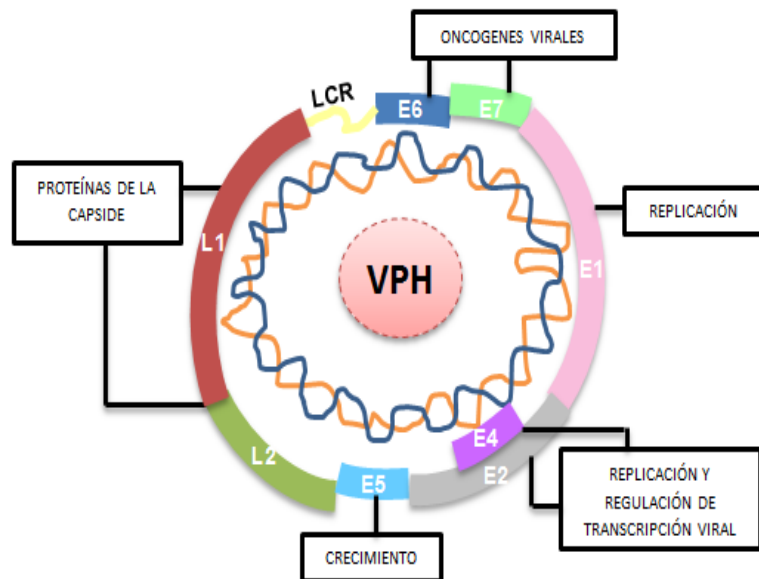


FIGURA 1. Genoma del Virus Papiloma Humano

3.2 CLASIFICACIÓN DEL VPH

El criterio de clasificación del VPH se establece en la secuenciación nucleotídica del gen L1 que codifica para la proteína principal. Una variación de 10% frente a la secuencia original (L1) de los tipos conocidos, indica un nuevo tipo viral; cuando la diferencia oscila entre 2% y 10%, se establece un subtipo nuevo del virus y cuando la diferencia es menor a 2% aparece una nueva variante del virus (28).

La familia Papilomaviridae está constituida por más de 200 tipos virales de los cuales 118 tipos se han aislado y caracterizado mediante la secuenciación del ADN de la región L1 del genoma viral (29,30). Se subdividen en función a su potencial oncogénico en dos grupos con diferente riesgo de desarrollo de cáncer: los VPH de bajo riesgo (VPH-BR) presentes en las lesiones benignas con mínimo riesgo de progresión maligna, y los VPH de alto riesgo (VPH-AR) los cuales, bajo la forma de infección persistente, pueden llevar a la transformación neoplásica (31).

3.2.1 Tipos de VPH de bajo riesgo

Los VPH-BR pueden causar verrugas en forma de coliflor en el área de los genitales, ano, cuello uterino y la vagina. Denominados también condilomas acuminados o verrugas genitales, estas lesiones muy rara vez se convierten en cáncer (32).

Los tipos de VPH-BR o no carcinógenos encierran al 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 71, 72, 81 responsables de lesiones benignas; siendo los tipos VPH-6 y VPH-11 responsables de la mayoría de las lesiones benignas o verrugas (33).

3.2.2 Tipos de VPH de alto riesgo

Los VPH-AR son llamados así debido a que pueden causar cáncer tanto en mujeres como en hombres y son transmitidos sexualmente. Además, causan cambios de bajo grado (LIE) y de alto grado en las células del cuello uterino. Los tipos VPH-AR incluyen al 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 82, 83, 84, 85 y 89 (34). Originan lesiones que usualmente son planas y prácticamente invisibles, en comparación con las lesiones causadas por VPH-BR. Sin embargo, es elemental señalar que la mayoría de infecciones por el VPH desaparecen y no causan ninguna lesión anormal pero una parte de VPH-AR ocasiona cáncer.

El VPH-16 y 18 son los virus oncogénicos más comunes, causan aproximadamente el 70 % de los cánceres cervicales en todo el mundo. El VPH-16 es detectado con mayor frecuencia en la neoplasia intraepitelial de alto grado y cáncer invasor. El VPH-18 está presente en aproximadamente el 5% de los cánceres cervicales invasores especialmente en mujeres jóvenes, y responsables del 5% de las lesiones de bajo grado (34,35).

3.3 CONTAGIO Y TRANSMISIÓN

Generalmente las infecciones por VPH se transmiten por contacto sexual, la transmisión sin coito no es frecuente pero puede suceder. Algunos tipos de VPH genitales se transmiten a otras áreas corporales mediante el contacto oral-genital, mano - genial, contacto piel - piel de tipo no sexual, uso de objetos contaminados e instrumentos médicos mal esterilizados (36).

El ciclo inicia cuando el VPH ingresa a las células del estrato basal por medio de microheridas, esto explicaría por qué una enfermedad de transmisión sexual facilita el contagio de VPH. Existen dos etapas virales: no-productiva y productiva.

- **Etapas No productiva:** sucede en el epitelio de la capa basal. El ADN viral ingresa e infecta a las células sin replicarse. Manteniendo un bajo número copias en las células infectadas. No hay cambios morfológicos identificables en la citología, por lo que la detección viral en este tipo de infecciones solo puede hacerse por métodos moleculares. En otros casos las proteínas E6 y E7 demoran la detención del ciclo celular y su diferenciación, estas células basales infectadas se dirigen hacia la parte superior de la membrana para convertirse en queratinocitos maduros, promoviendo un engrosamiento de la piel denominado condiloma o verruga, característica de algunas infecciones por el VPH-BR oncogénico (33).

- **Etapa productiva:** Ocurre en las capas suprabasales del epitelio, el VPH empieza a replicar, amplificar su ADN a un alto número de copias y sintetizar proteínas tardías de la cápside (L1 y L2). Ambas proteínas tardías son fundamentales en la fase de replicación, causantes del ensamble del virus. Cuando la capa superior del epitelio se desintegra como consecuencia del recambio natural en las capas superficiales del epitelio, los viriones maduros son liberados al medio ambiente. (33,37,38).

Las infecciones con VPH - AR algunas veces generan una integración del episoma viral entre ADN huésped, logrando una vida útil larga, reteniendo la capacidad de proliferar y desarrollar mutaciones en la línea de germinación del ADN, causadas por las acciones de las proteínas E6 y E7 las cuales proporcionan estabilidad a los episomas virales y estimulan la diferenciación de las células, regulando el ciclo celular (37,38).

La infección por VPH-AR tiene una duración mediana de 8 a 16 meses, en cambio la infección por VPH- BR está presente entre 4 y 5 meses. En más del 80% de los casos hay regresión espontánea, donde el sistema inmunitario elimina el virus y la infección no vuelve a aparecer. Entre el 3 al 10% de las mujeres no logran eliminar el ADN viral, ocasionando una carga persistente del ADN viral de los VPH - AR, si esta infección persiste por más de un año representa un riesgo en la progresión del desarrollo de la anomalía del tejido (39).

3.4 PREVALENCIA DE VPH EN PERÚ

La infección del VPH está reconocida como causa del cáncer de cuello uterino (CCU). Los tipos de VPH 16 y 18 están comprometidos en aproximadamente el 70% de todos los casos de CCU en el mundo. En América, el 80% de mujeres alguna vez en su vida ha tenido una infección con VPH, y 70,7 % de cáncer cervical invasivo en América son atribuidos a los VPH 16 ó 18 (40-42).

El Perú tiene una población de 11.2 millones de mujeres mayores de 15 años que están en riesgo de desarrollar cáncer (43). Evaluaciones actuales indican que cada año 4600 mujeres son diagnosticadas con CCU y 1700 mueren a consecuencia de esta infección. Este mal ocupa el primer lugar entre el cáncer más habitual entre mujeres de 15 y 44 años de edad en el Perú. Entre las ciudades con mayor tasa de CCU esta Loreto (29.4% de todos los cánceres en esa región), Ucayali (28.6%), Madre de Dios (28.5%) y Moquegua (28.4%). Se estima que el 6,6% de las mujeres peruanas en general alberga infección cervical por VPH-16/18 en un momento dado, y 65.9% de los CCU invasivos se atribuyen a los VPH 16 o 18 (44,45).

La infección por VPH es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en personas sexualmente activas menores de 35 años (44). Los casos de VPH mayormente no presentan síntomas y desaparecen en un tiempo corto. No obstante, la infección constante por VPH puede originar lesiones premalignas. Los hombres con

infección por VPH – BR pueden desarrollar condilomas acuminados y continuar transmitiendo la infección a sus parejas (44-47).

3.5 SISTEMA INMUNE Y VPH

El sistema inmune cumple un rol fundamental en la defensa contra la infección por VPH. El virus y el sistema inmunológico tienen un primer encuentro en el epitelio donde la primera línea de defensa del huésped son las células de Langerhans (LCs) quienes activan a los linfocitos T (34).

Aún hay preguntas en el comportamiento del ciclo de vida del virus y en algunos mecanismos biológicos que emplea el sistema inmune, diferentes estudios (48-50) han ayudado a obtener conclusiones y así poder concretar conductas precisas.

Se señalan algunos factores que contribuyen a la evasión inmune por parte del virus (51):

- a) Ausencia del proceso de citólisis o necrosis, inducidas por el VPH.
- b) Falta de proceso inflamatorio. Poca o ninguna liberación de citoquinas pro-inflamatorias locales.
- c) Ausencia total de fase de transmisión sanguínea o viremia.
- d) Cantidades mínimas del VPH en replicación son expuestas a mecanismos de defensa inmune. (no son percibidos).

- e) LCs no son activadas por la captación de cápsides VPH.
- f) Partículas libres del VPH se desprenden desde la superficie del epitelio escamoso con poco acceso a los canales linfáticos y vasculares, y a los ganglios linfáticos, donde se inician las respuestas inmunes.

3.5.1 Inmunidad Innata frente al VPH

Como primera defensa contra cualquier patógeno está la Inmunidad innata. Cuando un virus como el VPH ataca debería de ser detectado por las células dendríticas (DCs) intraepiteliales, pero existe evidencia que las DCs no detectan la cápside del VPH; generando así un papel restringido en la respuesta contra la infección (51).

La infección por VPH es únicamente intraepitelial, esta debería ser detectada por las células presentadoras de antígenos (APCs) del epitelio escamoso, es decir, las LCs. Cuando las LCs son incubadas con partículas L1 del VPH, no inician respuestas inmunes específicas contra antígenos derivados de L1, más bien son toleradas por la captación de cápside VPH. Se indica que lesiones NIC reducen de forma importante a las LCs; sin embargo, los mecanismos que ocasionan este agotamiento aún permanece sin aclarar (52). Mediante el proceso natural de descamación epitelial las partículas infecciosas de VPH serán liberadas de la superficie de la mucosa causando poco o ningún daño celular, esta destreza impide que se generen señales estimuladoras e

inflamatorias las cuales podrían activar potencialmente la respuesta inmune innata.

La activación inmune innata es el paso crítico para desencadenar la respuesta inmune adaptativa, la cual realizará la activación de los defensores inmunes innatos que no han logrado reconocer al VPH (53).

3.5.2 Inmunidad adaptativa frente al VPH

La inmunidad adaptativa se activará únicamente con las señales adecuadas y suficientes. Entonces frente a cualquier pérdida de efecto en el proceso de infección se originará una limitación en la activación inmune innata, la cual junto con los bajos niveles de expresión génica viral en las capas inferiores del epitelio, pueden prevenir o retrasar significativamente la respuesta inmune adaptativa contra la infección inicial de VPH, y de esta forma favorecer la persistencia viral (53). La inmunidad adaptativa ante una infección por VPH incluye respuesta por linfocitos B y anticuerpos específicos para antígenos de la estructura del virus pudiendo ser proteínas tardías o proteínas tempranas (53).

3.6 LINFOCITOS T EFECTORES (CD4, CD8)

Los Linfocitos T efectores se dividen en dos tipos, los cuales se diferencian por la expresión en membrana de dos moléculas de superficie diferentes (CD4+ o CD8+) las

cuales van a determinar sus funciones efectoras a continuación se describe los dos tipos de linfocitos efectores.

3.6.1 Linfocitos T CD4

LT colaboradores o helper, CD4+ (LTh), cuya principal función es la secreción de citoquinas, por medio de las cuales estimula la producción de anticuerpos por los Linfocitos B y las actividades microbidas de los macrófagos, que constituyen los dos mecanismos principales para la eliminación de microorganismos extracelulares o que viven en vesículas fagocíticas (54).

Los LT CD4 reciben señales para dirigirse al lugar infectado, es así como estas células inmunes pueden eliminar células infectadas por VPH. El VPH únicamente genera partículas virales en células muertas o totalmente diferenciadas ubicadas en la capa basal del cérvix, las cuales tienen la capacidad de detener el genoma viral. Si el LT CD4 capta el producto viral puede empezar a destruir células infectadas por VPH mediante mecanismos citotóxicos o indirectamente a través de la liberación de distintas citoquinas e interferones.

Otro mecanismo también utilizado se genera mediante las células T de memoria las cuales reconocen antígenos introducido al cuerpo durante alguna infección o vacunación anterior. Estas células T serán reactivada ante una infección recurrente. No obstante, en pacientes con infecciones persistentes por VPH y con lesiones NIC,

la cantidad de células-T se agota por la actividad de las proteínas E2 y E6 del virus, las cuales actúan en su contra (53).

Las células-T cervicales en mucosa normal tienen un fenotipo de memoria efectora y se encuentran ligeramente activadas. Los LT en las mucosas cervicales, tanto normal como displásica, expresan la integrina de superficie $\alpha 4\beta 7$ que ayuda en la unión de la célula y la matriz extracelular, y la cantidad de LT CD8+ infiltrados en la lesión se correlaciona directamente con la expresión de la direccionina también conocida como molécula de adhesión celular de la dirección en la mucosa vascular (MAdCAM-1) tiene como función determinar en qué tejido entrará el linfocito en el endotelio vascular epitelial de la lesión (52).

3.6.2 Linfocitos T CD8

LT citolíticos o citotóxicos, CD8+, lisan las células que presentan antígenos extraños en su membrana; es por ello que son útiles en la eliminación de virus y bacterias que infectan y viven en el interior de distintos tipos celulares, así como también de células neoplásicas.

Cuando se habla de infección por VPH la respuesta generada por LT CD8 es el mecanismo más importante para ejercer el control y despeje de esta infección. Se ha reportado que la respuesta por LT CD8 con respuesta específica para la proteína E6 del virus VPH es de suma importancia para el despeje viral (54). Se ha reportado también que LT CD8 específicos para la proteína E7 del VPH, cuenta con resultados

inmunoterapéuticos para cáncer cervical por sus promisorios resultados en la eliminación tumoral (53,54).

Las respuestas de LT CD4 y CD8 juegan un rol vital en el control de la patogénesis de VPH y lesiones cervicales asociadas en humanos. Por lo tanto, los LT CD8 son considerados el principal erradicador, tanto de células infectadas por VPH como de células de cáncer cervical a través de la respuesta inmune adaptativa (54).

3.7 LINFOCITOS T REGULADORES (Treg)

Las células Treg desempeñan un rol fundamental en la mantención de la tolerancia a antígenos propios, evitan la aparición de enfermedades autoinmunes, controlando el desarrollo de una respuesta inmune exagerada frente a agentes patógenos y alérgenos. Las poblaciones celulares que son suprimidas por estos linfocitos Tregs, incluyen linfocitos TCD4+, linfocitos TCD8+, células dendríticas, monocitos/macrófagos, linfocitos B y células natural killer. Siendo usualmente parte del control homeostático de las respuestas inmunes, ayudando a reducir los niveles de inmunidad celular específica del virus cuando el peligro ha pasado.

Se indica que el incremento de Tregs en enfermedades asociadas con VPH, puede contribuir a la tolerancia de antígenos virales y al desencadenamiento de la neoplasia, esta población celular puede suprimir la actividad de células citotóxicas directamente o mediante la producción de citoquinas, tales como IL-10 y TGF β (55).

Las células T reguladoras (Treg), parecen jugar un rol en la supresión inmune local en enfermedades asociadas con VPH, en las cuales se observa una incrementada población de células Treg. En lesiones pre-malignas CIN2/CIN3, se observa la expresión de Foxp3, un marcador específico de células Treg, en niveles más altos que en infecciones VPH sin cambios pre-malignos. El agotamiento local de células Treg a partir de enfermedades asociadas con VPH humano puede ayudar a restaurar una efectiva respuesta anti-tumoral (56).

La alta expresión de células Treg en la mucosa se asocia con una disminución de la inmunidad celular, y con el progreso de lesiones NIC. Además, estas células son implicadas en el fracaso del sistema inmune para controlar el desarrollo de numerosos cánceres. Se indica que una alta frecuencia de Treg en cánceres asociados al VPH podría contrarrestar la respuesta inmune humana, por lo cual se sugiere como estrategia terapéutica (57).

4 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El CCU asociado VPH sigue siendo una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel nacional, y aunque su diagnóstico es de carácter citológico (PAP), es necesario mejorar las estrategias de control y diagnóstico de la infección incluyendo técnicas para saber qué tipo de VPH está implicado. Además que es importante saber el comportamiento de las poblaciones celulares linfocitarias que desempeñan el papel de control o eliminación del agente viral, así como células neoplásicas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Determinar la frecuencia de Linfocitos T CD4+, CD8+ y Treg en biopsias de cérvix para tamizaje de cáncer de cuello uterino, según infección o no con VPH-16.

5.2 Objetivos Específicos

- Genotipificar y evaluar la frecuencia de VPH-16 y VPH-18 en biopsias de cérvix obtenidas en un centro detector de Lima, para tamizaje de cáncer de cuello uterino.
- Determinar la frecuencia y asociaciones de LT CD4, LT CD8 y LT reg y sus relaciones con VPH - 16 en biopsias de cérvix para tamizaje de cáncer de cuello uterino.

6 METODOLOGÍA:

6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente trabajo consiste en la evaluación de resultados secundarios, a partir de la evaluación de biopsias tomadas para el Proyecto Fondecyt 204-2015 “Círculo para la investigación de agentes infecciosos endémicos causantes de cáncer en Perú”, y de las fichas de datos generales de cada paciente codificadas en este proyecto, desarrollado en el departamento de Investigación del Instituto de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en Lima, Perú, cuyo objetivo principal fue analizar mutaciones, perfiles de expresión, respuesta inmunológica, entre otros para permitir obtener mayor información y conocimiento del proceso de carcinogénesis asociada a agentes infecciosos y así poder evaluar la implementación de métodos de detección temprana y blancos terapéuticos.

El presente estudio busca determinar la frecuencia y asociaciones de Linfocitos T CD4+, Linfocitos T CD8+ y Linfocitos T reguladores presentes en muestras para tamizaje de cáncer de cuello uterino, y utilizará información obtenida por el estudio original, de manera anónima. Este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética de UPCH, código 102756 con constancia N° 596-25-18.

6.2 POBLACIÓN

Se incluirán los resultados de las biopsias de cérvix de 74 pacientes que acudieron a una campaña de tamizaje de cáncer de cuello uterino, así como los datos generales, incluidos en el estudio original, cuyos criterios de inclusión y exclusión fueron:

A. Criterios de Inclusión:

- Biopsia de cérvix de pacientes que hayan firmado el consentimiento informado
- Biopsia de cérvix de pacientes entre 18 a 65 años.

B. Criterios de Exclusión:

- Pacientes embarazadas
- Muestras de pacientes inmunocomprometidas

6.3 MUESTRA

Se solicitaron los resultados de las pruebas de genotipificación e inmunohistoquímica realizadas en las 74 biopsias de cérvix disponibles en el estudio original, para los

cuales los procedimientos de recolección, medición y control de calidad se detallan en procedimientos y técnicas.

6.4 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

6.4.1 GENOTIPIFICACIÓN DE VPH:

6.4.1.1 Extracción de ADN de la biopsia cervical

Todo el trabajo se realizó en cabina de flujo laminar y con implementos de bioseguridad (guantes, mandilón, barbijo y gorra desechable). Se usó el kit PureLink® Genómic DNA Mini Kit (Invitrogen). Las muestras fueron disgregadas en tampón de lisis y posterior adición de proteinasa K en placas libres de ADNasa y RNAasa. Luego pasó por un proceso de incubación en un termobloque a 65°C por 1h y 95 °C por 10min.

El lisado se traspasó a una columna de extracción, se agregaron 500uL de etanol y se centrifugó por 3 minutos a 14000 rpm. Se lavó dos veces para purificar el ADN con 200uL del buffer de lavado I y se centrifugó por 1 minuto a 14000 rpm. Se descartó el tubo colector y la columna de extracción. Se colocó a un nuevo tubo donde se agregó 200uL del buffer de lavado II y se centrifugó por 1min a 14000 rpm.

La columna se colocó en otro microtubo, se agregó 30uL del buffer de elución y se centrifugó por 3 min a 14000 rpm. Se descartó la columna de extracción y los tubos que contenían el ADN purificado fueron almacenados a -20 °C.

6.4.1.2 Cuantificación de ácidos nucleicos

Para determinar la concentración y pureza de ADN obtenido se realizó la cuantificación por espectrofotometría mediante el fluorómetro Qubit (v2.0 Invitrogen by Life Technologies, EE.UU). Es un espectrofotómetro que utiliza fluorocromos específicos para medir ácidos nucleicos y proteínas. Se usó el kit Qubit de Alta sensibilidad dsDNA Assay kit (lifetechnologies).

Se preparó una Solución de trabajo compuesta por QubitdsDNA HS Buffer y el Fluorocromo QubitdsDNA HS en una proporción 199µL: 1µL. La solución de trabajo (199uL) se mezcló con 1µL de muestra de ADN. Se obtuvieron las lecturas de las muestras de ADN en el fluorómetro Qubit (260nm).

6.4.1.3 PCR convencional

La detección de VPH en las muestras de cérvix provenientes de los preventorias mencionados se realizó por medio de la amplificación del gen L1 del virus. Se

preparó una *master mix* tomando los siguientes componentes que se muestran en la **tabla 1**.

Después de preparar la *master mix* se dispersó la muestra en microtubos para PCR de 200 uL. Se colocaron 5 uL. de muestra de ADN cuantificado posteriormente y 20 uL de la *master mix*. Cada tubo se pasó por el vortex por 5 segundos y se centrifugó a 1500 rpm durante 1 minuto. Se colocaron las muestras en el termociclador Mastercycler (EPPENDORF) para llevar a cabo el programa de amplificación del material genético. Las condiciones de reacción se dividieron en cuatro etapas programadas en el termociclador. (Tabla 2)

TABLA 1: Volumen de los componentes de la *master mix* para la amplificación del gen L1.

REACTIVOS	VOLUMEN (uL)
Buffer	2.5
dNTPs	2.0
MgSO ₄	1.3
Taq polimerasa	0.13
Agua	12
My09*	1
My11**	1

*MY09 5' -CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC- 3'

**MY11 5' -GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG- 3'

TABLA 2: Programa de amplificación para VPH

Programa de amplificación para VPH	Temp (°C)	Tiempo (seg)
Preincubación (1 ciclo)	95	600
3 pasos de amplificación (35 ciclos)	94	15
	57	45
	68	45
Melting (1 ciclo)	95	10
	65	60
	97	1
Cooling (1 Ciclo)	40	∞

6.4.1.4 Electroforesis

Los resultados obtenidos tras las extracciones de ADN se evaluaron cualitativamente realizando una corrida electroforética. Es una técnica que realiza la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico, dependiendo de la carga eléctrica y el peso molecular. Se evaluó la integridad del material genético corriendo las muestras en geles de agarosa al 3%, donde se dejó polimerizar el gel por 20 minutos en una cubeta para electroforesis.

La preparación de las muestras consistió en 5 uL de ADN disueltos en 2 uL de loading buffer Invitrogen™. Se cargaron las muestras (7 uL) en gel de agarosa. También se cargó 7 uL de un marcador de peso molecular conocido (100 bp) de Invitrogen™. Se trabajó en un equipo para electroforesis y el programa de corrida

consistió en 100 voltios por 35 minutos. Los geles se observaron utilizando un transiluminador UV y fueron documentados con una cámara fotográfica.

Además se evaluó la viabilidad del material genético mediante una sección del gen constitutivo humano de la β -globina utilizando los iniciadores GH20 y PC04, como control interno de los posteriores ensayos. Las muestras de ADN que no marcaron la banda para la β -globina (268 pb) se les realizó nuevamente la extracción de ADN y se volvió a evaluar la calidad de ADN.

6.4.1.5 Genotipificación: Técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

Esta técnica sirve para la genotipificación de muestras que dieron resultado positivo para la presencia del VPH. Consiste en la fragmentación de lugares específicos de ADN, para posteriormente diferenciar los fragmentos tomando en cuenta el tamaño que comprende cada uno.

Se utilizó la enzima de restricción llamada endonucleasa AFA-I en aquellos casos donde se detectó amplificación del genoma viral del VPH.

En baño de hielo se colocaron los viales que contienen las muestras de ADN, enzimas de restricción y tampones de ensayo. Se configuró las mezclas de reacción para cada muestra de ADN por separado descritos en la tabla 3.

**TABLA 3: Volumen de los componentes para la mezcla de reacción PCR -
RFLP**

REACTIVOS	VOLUMEN(uL)
ADN	15.0
10X Assay Buffer	3.0
Agua Milli Q	10.0
Enzima AFA I	2.0
TOTAL	30

Después de preparar los tubos de reacción para cada muestra, se mezclaron los componentes pipeteando suavemente. Se incubó los tubos a 37 °C por 3 horas. Después de la incubación, se agregó inmediatamente 5 µl de 6X Dye a cada tubo y se cargó el total de la muestra en geles de agarosa al 3% y se realizó electroforesis. Se visualizó las bandas de ADN usando transiluminador UV.

6.4.2 PCR CUANTITATIVA (qPCR) ó PCR EN TIEMPO REAL (rtPCR)

Para comprobar la fiabilidad se realizó la corroboración de la técnica de PCR convencional utilizando una técnica más sensible: PCR cuantitativa (qPCR). Se hizo la detección de ADN viral de las muestras de cérvix para VPH-16 y VPH-18. Se trabajó con sondas específicas de hibridación incluidas el kit comercial para

genotipificación de VPH de la marca Primerdesign®. Para las reacciones se empleó la mezcla Mastermix que el kit trae.

Las reacciones de PCR en tiempo real (rtPCR) o PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron en el Termociclador LightCycler® 96 Instrument (ROCHE®). Cada mezcla de reacción contenía 10 µL de Mastermix; 1 µL de primer; ADN partiendo de una concentración de 100ng/µL de ADN y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20 µL. La mezcla se colocó en el termociclador con programa integrado de ciclos de amplificación, según las instrucciones para cada equipo.

Los resultados se reportaron como positivos o negativos dependiendo de las respectivas curvas de amplificación y tomando en cuenta los estándares internos que se incluyen en cada equipo, que asegura la correcta genotipificación de los virus.

6.4.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

6.4.3.1 Tinción Inmunohistoquímica y Determinación de Anti-CD4

Se analizaron 74 muestras de tejido. La detección de LT CD4+, LTCD8+ y Treg (FoxP3+) se realizó por inmunohistoquímica. Para esta técnica se hicieron cortes de 3 µm de grosor de las diferentes biopsias de cuello uterino parafinadas, tanto de las pacientes como de los controles mediante el uso de un micrótopo. Se dejó secar en estufa a 60°C por 1 hora. Luego se colocaron las láminas en la solución recuperadora

del epítoto del antígeno a pH 9.00 (Buffer EDTA), la cual debió ser precalentada a 65°C y llevada a 95°C por 20 minutos en baño maría. Se dejaron enfriar las láminas hasta 65°C. Luego se retiraron las láminas y se colocaron en buffer tris por 5 minutos. Se incubaron con peróxido de hidrogeno por 5-10 minutos. Las láminas se lavaron 3 veces con buffer tris salino y se dejaron en buffer 3 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario CD4, marca DAKO™ Flex Monoclonal Mouse Anti-Human CD4 por 25 minutos. Se lavó 3 veces con buffer tris salino. Luego se dejó en buffer 3 minutos y se incubó con EnVision™ Flex+ Mouse linker por 15 minutos. Se lavó 3 veces las láminas con buffer tris salino y se dejó en buffer 3 minutos. Se incubó con el polímero HRP por 25 minutos y nuevamente se lavó 3 veces con buffer tris salino. Se Incubó con el cromógeno DAB por 5-10 minutos y se lavó con agua destilada. Para el contraste se usó hematoxilina de Harris por 20 segundos. Se deshidrató en alcoholes y el aclarado de las láminas se realizó con xilol. Por último realizar el montaje de láminas con Entellan y se observó al microscopio.

6.4.3.2 Tinción Inmunohistoquímica y Determinación de Anti-CD8

Se realizaron los cortes de tejido parafinado de 3 µm y se dejó secar en una estufa a 60°C por 1 hora.

Se colocaron las láminas en la solución recuperadora del epítoto del antígeno a pH 9.00 (Buffer EDTA), la cual se precalentó a 65°C y a 95°C por 20 minutos en baño maría. Se dejó enfriar las láminas hasta 65°C. Se retiraron las láminas y se colocaron

en buffer tris por 5 minutos. Luego se incubaron con peróxido de hidrogeno por 5-10 minutos.

Las láminas se lavaron 3 veces con buffer tris salino y se dejaron en reposo por 3 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario CD8, marca DAKO™ Flex Monoclonal Mouse Anti-Human CD8 por 25 minutos. Se lavaron 3 veces con buffer tris salino y se dejaron las láminas en buffer 3 minutos. Se incubó con el polímero HRP por 25 minutos. Nuevamente se lavó 3 veces con buffer tris salino y se dejó en buffer por 3 minutos. Se incubó con el cromógeno DAB por 5-10 minutos. Se lavó con agua destilada.

Para el contraste se utilizó hematoxilina de Harris por 20 segundos. Se deshidrató en alcoholes y el aclarado de las láminas se realizó con xilol. Se realizó el montaje de láminas con Entellan y se observaron con ayuda de un microscopio.

6.4.3.3 Tinción Inmunohistoquímica y determinación de Anti-Foxp3

Se realizaron los cortes de tejido parafinado de 3 μm y se dejó secar en una estufa a 60°C por 1 hora. Se colocaron las láminas en la solución recuperadora del epítipo del antígeno a pH 9.00 (Buffer EDTA), la cual se precalentó a 65°C y a 95°C por 20 minutos en baño maría. Se dejó enfriar las láminas hasta 65°C. Se retiraron las láminas y se colocaron en buffer tris por 5 minutos. Luego se incubaron con peróxido de hidrogeno por 5-10 minutos.

Se lavaron 3 veces las láminas con buffer tris salino y se dejaron por 3 minutos con este buffer. Se incubaron con el anticuerpo primario FoxP3, marca DAKO™ Flex Monoclonal Mouse Anti-Human Foxp3, por 25 minutos.

Las láminas se lavaron 3 veces con buffer tris salino y se dejaron en reposo por 3 minutos. Se incubó con el polímero HRP por 25 minutos. Nuevamente se lavó 3 veces con buffer tris salino y se dejó en buffer por 3 minutos. Se incubó con el cromógeno DAB por 5-10 minutos. Se lavó con agua destilada.

Para el contraste se utilizó hematoxilina de Harris por 20 segundos. Se deshidrató en alcoholes y el aclarado de las láminas se realizó con xilol. Se realizó el montaje de láminas con Entellan y se observaron con ayuda de un microscopio.

6.4.3.4 Lectura de láminas

La lectura de las láminas fue realizada en el departamento de investigación del INEN por la M.C. Joselyn Sánchez S.

Se realizó con ayuda de un microscopio óptico marca Leits modelo Laborlux5, este conteo fue realizado de manera manual con la ayuda de un contador celular para laboratorio clínico. El conteo celular se realizó con el Objetivo de 40X en 10 campos por muestra a evaluar, se hizo una lectura en forma de zigzag para evitar lecturas dobles.

Se consideró marcación positiva a aquellas células que se tiñeron de un color dorado (desde dorado claro hasta marrón oscuro, debido a la reacción entre los anticuerpos y el cromógeno revelador). Además se realizó el conteo celular por superficies de tejido, considerando dos capas: epitelio y estroma. Los resultados se expresaron en número de células por campo (n°cél/campo).

6.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio se realizó con la información obtenida por el Proyecto Fondecyt 204-2015 “Círculo para la investigación de agentes infecciosos endémicos causantes de cáncer en Perú”, desarrollado en el departamento de Investigación del INEN y aprobado por su Comité de Ética con carta N° 190-2016-CIEI/INEN y aprobación de modificación al Consentimiento Informado con carta N° 270-2018-CIEI/INEN. Este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética de UPCH, código 102756 con constancia N° 596-25-18.

6.6 PLAN DE ANÁLISIS

Para la detección de VPH en muestras cervicales se consideró como positivo o negativo según fuese el caso. Para el análisis estadístico se empleó el software estadístico SPSS versión 24.0. Para cada variable categórica (VPH positivo/negativo, edad, estado civil, informe patológico) se realizará la evaluación estadística usando la

prueba no paramétrica de Chi cuadrado. Los valores de las variables cuantitativas (VPH vs. Poblaciones celulares) se analizarán, utilizando pruebas no paramétricas como la prueba de U de Mann-Whitney y prueba de la mediana para muestras independientes dependiendo cada uno de ellos. Se consideró un nivel de significación de 0,05

7 RESULTADOS

7.1 Descripción general de la población en estudio

Se analizaron 74 muestras, se obtuvieron además los siguientes datos, resultado de informe patológico, edad y estado civil. De ellas 44.59% correspondieron a pacientes con diagnóstico de NIC1 y NIC2, el 35.14% corresponde a cervicitis crónica y un 20.27 % a pacientes con epitelio sin alteraciones.

El 71.62 % de la población estudiada corresponde a mujeres solteras y 28.38 % a mujeres casadas.

La variable edad fue clasificada en dos grupos: de 18 a 29 años y de 30 a más. Se tomó en cuenta las recomendaciones de la American Cancer Society, donde establece y recomienda que a partir de los 30 años las mujeres se deben de realizar la prueba Papanicolau e identificación de VPH para detección de CCU (1)

La mayor frecuencia (79.73%) de las muestras correspondieron a mujeres con edades de 30 a más años con un rango de 30 a 62 años y un promedio de 44 años, mientras el 20.27 % correspondieron a mujeres con edades entre 18 y 29 años con un promedio de 25 años. Se observa también que la muestra de la paciente evaluada con menor edad tiene 22 años y la mayor edad corresponde a 62 años.

7.2 Extracción y cuantificación de ADN de la biopsia cervical

Se realizó la extracción de ADN de las 74 muestras estudiadas, encontrándose algunas dificultades operativas debido a las características que presentaban las muestras. Arbitrariamente las muestras presentaron 3 aspectos distintos: deshidratadas y poco viables (28); muestras grandes y viables (35) y muestras pequeñas y viables (11). Esto pudo ocasionar que la cuantificación del ADN sea tan variable respecto a cada muestra. Las muestras grandes y viables tuvieron una cuantificación promedio de 49.17 ug/mL., en cambio las muestras pequeñas y viables tuvieron un promedio de 11.02 ug/ mL. y las muestras con características poco viables y deshidratadas tuvieron como promedio en la cuantificación 6.11 ug/mL. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4: Cuantificación de ADN obtenido de los tejidos evaluados

Nº	CÓDIGO	CUATIFI CACIÓN ADN (ug/mL)	Nº	CÓDIGO	CUATIFI CACIÓN ADN (ug/mL)
1	MRV - 2178	9,75	38	TGF - 2562	1,85
2	RCV - 2211	3,52	39	NPM - 2563	51,4
3	RJS - 2212	7,22	40	TVT - 2566	9,55
4	MPP - 2213	6,67	41	LTT - 2834	2,96
5	JRL - 2214	6,17	42	VCS - 2957	7,49
6	LCL - 2215	86	43	YRL - 2958	2,26
7	MPC - 2261	26,1	44	SMR-3062	10,9
8	MSO - 2262	56,9	45	LMB-3061	23,5
9	JIM - 2263	28,6	46	MCA-3060	2,37
10	GBC - 2264	1,57	47	LRV-3059	10,7
11	AMM - 2266	10,3	48	CCQ-3057	14

12	MPF - 2290	29,9	49	YMS-2959	27,2
13	VMD - 2461	>600	50	LMV-2961	5,2
14	GEC - 2564	71,1	51	DAL-2962	8,8
15	MFM - 2565	67,9	52	STT-2963	4,42
16	CAT - 2291	3,24	53	MCV-2964	7,27
17	CGE - 2405	56,6	54	JZF-3055	3,62
18	MFC - 2406	62,7	55	YRA-2557	4,33
19	CHL - 2407	0,9	56	RAT-2524	3,56
20	GOZ - 2265	9,73	57	MFC-2525	38,2
21	YCO - 2410	13,6	58	MPR-2523	4,81
22	ELV - 2452	8,92	59	GSH-2267	11
23	MMF - 2450	4,2	60	LHF-2288	27,6
24	TCM - 2412	5,58	61	RLY-2289	2,5
25	MCZ - 2558	65,5	62	YMG-2408	13,8
26	KMP - 2833	0,44	63	MMO-2409	10,6
27	NRE - 2835	0,74	64	LQV-2411	5,21
28	JSM - 2455	79,4	65	SPR-2451	16,4
29	MGG - 2456	31,5	66	EGB-2453	11,8
30	MMA - 2462	54,2	67	DSY-2454	1,28
31	RGC - 2520	59,3	68	RCC-2458	21.4
32	JSL - 2321	13,8	69	SCA-2459	0.498
33	MAR - 2522	2,84	70	KTV-2460	7.42
34	YAS - 2457	24,1	71	GRS-2960	0.9
35	JAM -2574	4,08	72	AQQ-3056	7.74
36	NVH - 2560	16,1	73	AHP-2293	3.09
37	APC - 2561	16,5	74	ETN-2294	0.759

	PROMEDIO
Muestra Viable - Grande	49.17
Muestra Viable - Pequeña	11.02
Muestras Deshidratadas	6.11

7.3 PCR convencional: Electroforesis

Se llevó a cabo el programa de amplificación en el termociclador Mastercycler (EPPENDORF) durante el cual tuvo una duración de 90 minutos. Se evaluó el material genético corriendo las muestras de ADN en geles de agarosa al 3% (Figura 2).

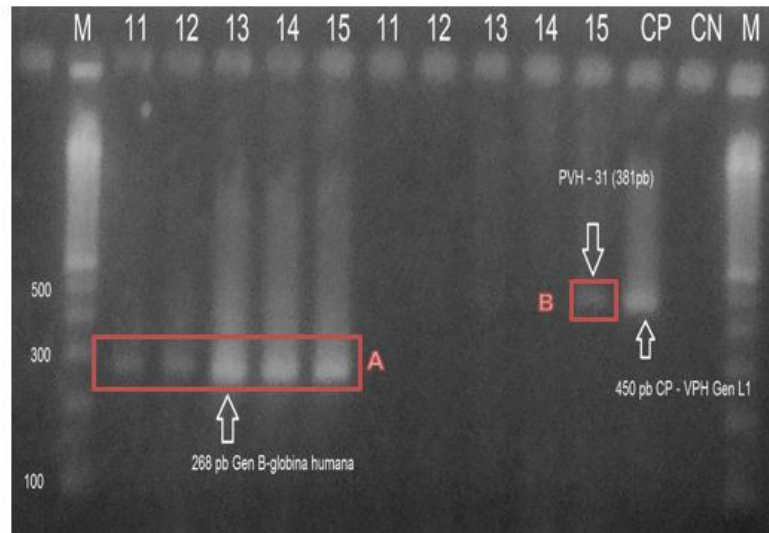


FIGURA 2: Electroforesis en gel de agarosa 3%. M: Marcador 100 pb ; 11-15: muestras de ADN con b-Globina (268 pb); 11-15 muestras de ADN evaluadas para VPH (450 bp). CP: Control positivo, CN: Control negativo.

A: Bandas a 268 pb que indican calidad e integridad de ADN obtenido

B: Banda que indica Presencia de VPH (450 pb)

En el estudio 19 muestras de las 74 muestras evaluadas no marcaron la banda para la β -globina. Se realizó la re-extracción de ADN en donde 1 muestra de las 19 muestras no marcó la banda de la β -globina indicando una mala calidad del ADN y el procedimiento. Esta muestra se descartó.

Se obtuvieron solo 3 resultados positivos para presencia de VPH, mostrando una banda a 450 pb, es decir el 4.05 % de la población estudiada presenta positividad por PCR convencional para VPH. Los resultados que dieron positivo para la presencia de VPH se genotipificaron usando la técnica RFLP.

7.4 Genotipificación: Técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

Para los tres casos positivos que se encontraron se realizó la genotipificación utilizando la técnica RFLP, a continuación se muestran los resultados obtenidos en geles de agarosa:

- Para la muestra número 15 mostró una banda a 381 pb correspondiente a VPH – 31, considerado un genotipo de alto riesgo oncogénico (Figura 3).
- Para la muestra número 29 mostró una banda a 310 pb correspondiente a VPH – 16 considerado un genotipo de alto riesgo oncogénico (Figura 4).
- Para la muestra número 74 mostró una banda a 216 pb correspondiente a VPH – 11 considerado un genotipo de bajo riesgo oncogénico (Figura 5).

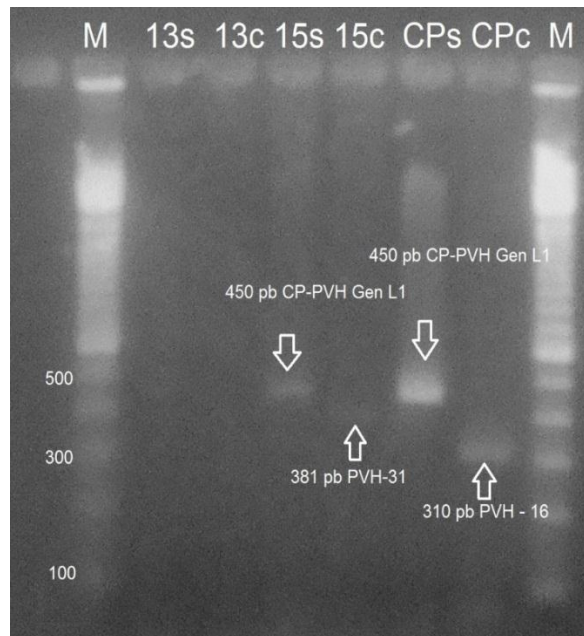


FIGURA 3 : Genotipificación. M: Marcador 100 bp; 13s y 15s: muestras de ADN sin enzima AFA. 13c y 15c muestras de ADN con enzima AFA . CPs: Control positivo sin enzima (450bp), CPc: Control positivo con enzima (310bp).

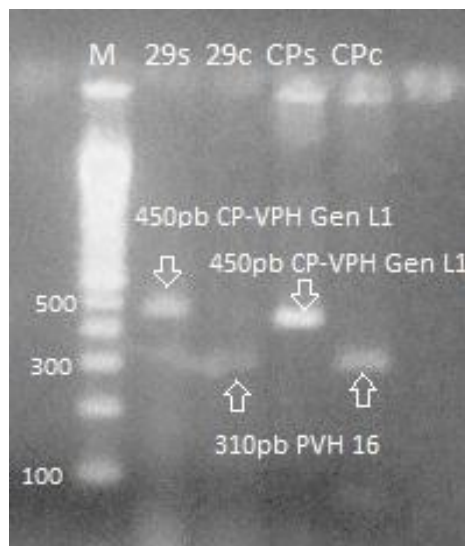


FIGURA 4: Genotipificación. M: Marcador 100 bp; 29s : muestras de ADN sin enzima AFA. 29c y muestras de ADN con enzima AFA . CPs: Control positivo sin enzima (450bp), CPc: Control positivo con enzima (310bp).

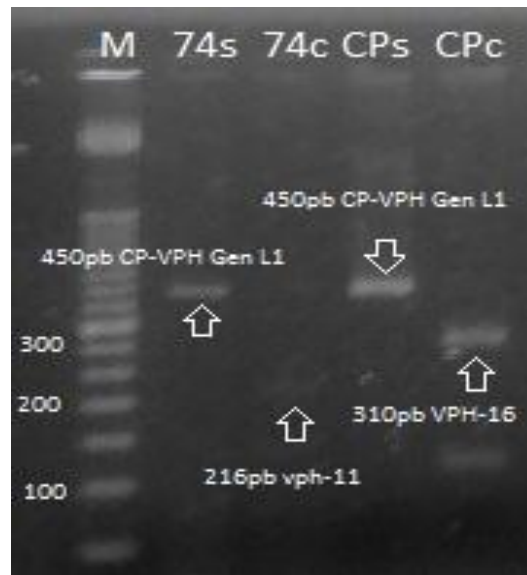


FIGURA 5: Genotipificación. M: Marcador 100 bp; 74s: muestras de ADN sin enzima AFA. 74c muestras de ADN con enzima AFA . CPs: Control positivo sin enzima (450bp), CPc: Control positivo con enzima (310bp).

7.5 PCR CUANTITATIVA (qPCR) ó PCR EN TIEMPO REAL (rtPCR)

Los resultados se reportan como positivos o negativos dependiendo de las respectivas curvas de amplificación y tomando en cuenta los estándares internos que se incluyen en cada equipo, que asegura la correcta genotipificación de los virus.

Para la detección de VPH-16 y VPH 18 se obtuvieron curvas de amplificación la cual indicó las muestras positivas para el VPH. (Figura 6)

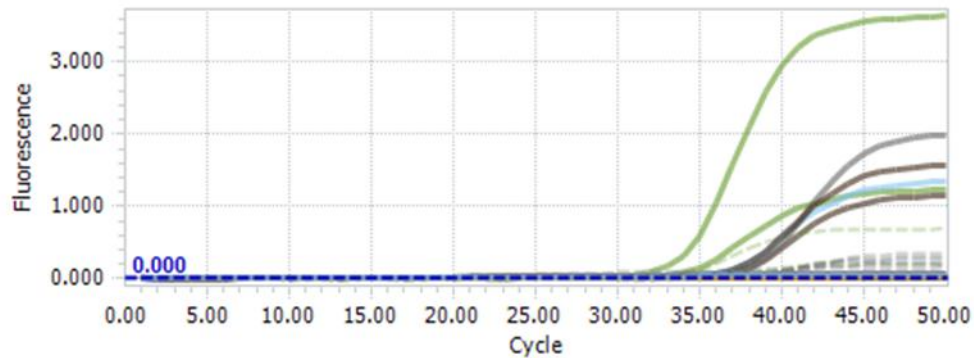


FIGURA 6: Curva de amplificación para detección de VPH-16

En la tabla 5 se muestran los resultados para la detección de VPH-18 y VPH-16. En el caso de VPH-18 solo la muestra VHD- 2461 dio resultado positivo (1.4%) Las 73 muestras restantes no presentaron infección por VPH 18 (98.6%).

Para la detección de VPH-16 se observó que el 52.3% del total de muestras dio resultado positivo para este tipo de infección.

TABLA 5: Resultados de la técnica de rtPCR para VPH 16 y VPH 18

Código de muestra	VPH 16	VPH 18
MRV - 2178	positivo	negativo
RCB - 2211	negativo	negativo
RJS - 2212	negativo	negativo
MPP - 2213	negativo	negativo
JRL - 2214	negativo	negativo
LCL - 2215	negativo	negativo
MPC - 2261	positivo	negativo
MSO - 2262	positivo	negativo

Código de muestra	VPH 16	VPH 18
KTV - 2460	positivo	negativo
VHD - 2461	positivo	positivo
MMA - 2462	positivo	negativo
RGC - 2520	negativo	negativo
JSL - 2521	positivo	negativo
MAR - 2522	positivo	negativo
MPR - 2523	positivo	negativo
RAT - 2524	positivo	negativo

JIM - 2263	positivo	negativo
GBC - 2264	negativo	negativo
GOZ - 2265	positivo	negativo
AMM - 2266	negativo	negativo
GSH - 2267	negativo	negativo
LHF - 2288	positivo	negativo
RLY - 2289	negativo	negativo
MPF - 2290	positivo	negativo
CAT - 2291	positivo	negativo
AHP - 2293	negativo	negativo
ETN - 2294	positivo	negativo
CGE - 2405	positivo	negativo
MFH - 2406	positivo	negativo
CHL - 2407	negativo	negativo
YMG - 2408	positivo	negativo
MMO - 2409	negativo	negativo
YCO - 2410	positivo	negativo
LQV - 2411	negativo	negativo
TCM - 2412	negativo	negativo
MMF - 2460	negativo	negativo
SPR - 2451	negativo	negativo
ELV - 2452	negativo	negativo
EGB - 2453	negativo	negativo
DSY - 2454	positivo	negativo
JSM - 2455	positivo	negativo
MGG - 2456	positivo	negativo
YAS - 2457	negativo	negativo
RCC - 2458	positivo	negativo
SCA - 2459	positivo	negativo

MFC - 2525	negativo	negativo
YRA - 2557	positivo	negativo
MCZ - 2558	negativo	negativo
JMA - 2559	positivo	negativo
NVH - 2560	positivo	negativo
APC - 2561	positivo	negativo
TGF - 2562	negativo	negativo
NPM - 2563	negativo	negativo
GEC - 2564	positivo	negativo
MFM - 2565	positivo	negativo
TVT - 2566	positivo	negativo
KMP - 2833	negativo	negativo
LTT - 2834	positivo	negativo
NRE - 2835	negativo	negativo
VSC - 2957	positivo	negativo
YRL - 2958	positivo	negativo
YMY - 2959	negativo	negativo
GRS - 2960	positivo	negativo
LMV - 2961	negativo	negativo
DAL - 2962	positivo	negativo
STT - 2963	negativo	negativo
MCV - 2964	negativo	negativo
JZF - 3055	negativo	negativo
AQQ - 3056	negativo	negativo
CCQ - 3057	negativo	negativo
LRV - 3059	positivo	negativo
MCA - 3060	negativo	negativo
LMB - 3061	negativo	negativo
SMR - 3062	positivo	negativo

7.6 PCR convencional vs. PCR en tiempo real (rtPCR)

Con respecto a PCR convencional para la presencia del Virus Papiloma Humano: Se evaluaron 74 muestras de las cuales se obtuvo un 96% de resultados negativos para la prevalencia de VPH en las muestras preventorias de cérvix estudiadas. Se obtuvo un 4% de resultados positivos para presencia de VPH en las muestras evaluadas.

Se detectaron tres muestras positivas para VPH. Usando la técnica de RFLP para genotipificación dando como resultado los genotipos VPH - 31 y VPH - 16 denominados de alto riesgo oncogénico. Una de ellas mostró como resultado el genotipo VPH - 11 considerado de bajo riesgo oncogénico, el cual se conoce que causa en un 90% verrugas genitales.

Con respecto a PCR cuantitativa se evaluaron 74 muestras de las cuales se obtuvo un 53% de resultados positivos para VPH-16 denominada de alto riesgo oncogénico y 1.4 % de resultados positivos para la infección por VPH-18

La única muestra VPH 16 encontrada por la técnica de PCR convencional fue corroborada por la técnica de qPCR. Las dos muestras positivas restantes por PCR convencional (VPH-31 y VPH-11) arrojaron resultado positivo con la técnica qPCR para la evaluación de VPH-16. Es decir estas muestras al parecer tienen una infección múltiple ocasionada por uno o más genotipos de VPH, para realizar la corroboración se debería utilizar qPCR para los genotipos VPH-11 y VPH-31.

7.7 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES

7.7.1 Estado Civil vs. Presencia de VPH

En la Figura N° 7 se observa la relación entre estado civil y la presencia del VPH en las muestras evaluadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba Chi cuadrado en donde se observa que no existe una relación estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p = 0.113$). Es decir no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre muestras con VPH positivo /negativo en relación al Estado Civil. Sin embargo hay una tendencia a que las mujeres solteras presenten el VPH en comparación a las mujeres casadas.

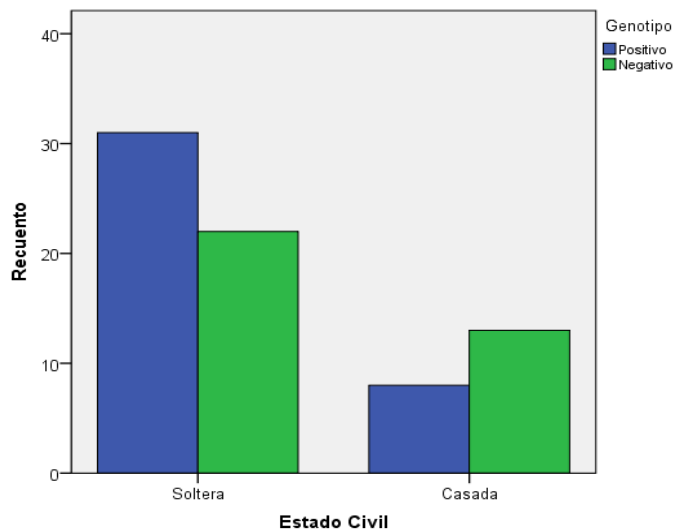


Figura 7: Relación entre Estado Civil vs. VPH positivo/ negativo

De las 39 muestras con resultado positivo para VPH, 31 fueron solteras y 8 fueron casadas, mientras que las muestras negativas para VPH fueron 35, donde 22 fueron solteras y 13 fueron casadas. (Tabla 6). Esto indica que la infección por VPH está más frecuente en mujeres solteras que en casadas.

Tabla 6: Tabla de frecuencias de VPH positivo/ negativo en solteras y casadas

		Genotipo		Total	
		Positivo	Negativo		
Estado Civil	Soltera	Recuento	31	22	53
		% dentro de Estado Civil	58,5%	41,5%	100,0%
	Casada	Recuento	8	13	21
		% dentro de Estado Civil	38,1%	61,9%	100,0%
Total	Recuento	39	35	74	
	% dentro de Estado Civil	52,7%	47,3%	100,0%	

7.7.2 Edad vs. Presencia de VPH

En la Figura N° 8 se observa la relación entre la edad y la presencia del VPH en las muestras evaluadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba Chi Cuadrado en donde se observa que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p = 0.190$). Es decir que la infección por VPH no está asociada con ningún grupo etario.

De las 39 muestras con resultado positivo para VPH, 8 muestras estaban en el grupo etario entre 18 y 29 años y 31 están en el grupo de 30 años a más, mientras que las muestras negativas para VPH fueron 35, donde 7 tienen corresponden a edades entre 18 y 29 años y 28 son mayores a 30 años. La distribución no presenta ninguna tendencia entre los distintos grupos de edades.

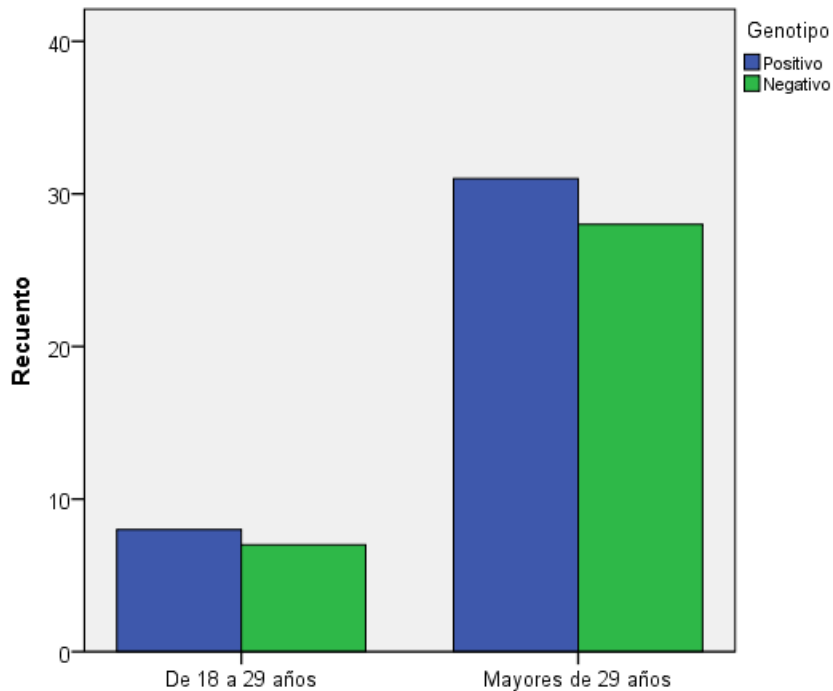


Figura 8: Relación entre Edad vs. VPH positivo/ negativo

Se realizó también la segmentación del grupo total por edades en grupo de cada 5 años y se realizó el análisis estadístico sin encontrar diferencia estadísticamente significativa.

7.7.3 Edad vs. Estado civil

En la Figura N° 9 se observa la relación entre la edad y estado civil de las muestras evaluadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba Chi Cuadrado en donde se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p = 0.0031$). Es decir que la condición de estado civil soltero y las edades por debajo de 30 años están asociadas.

De las 17 muestras con edades comprendidas entre 18 a 30 años dieron en su totalidad (17 muestras) que eran provenientes de mujeres solteras, sin embargo las 57 muestras comprendidas entre las edades de 31 años a más dio como resultado que 36 muestras eran provenientes de mujeres solteras y 21 muestras de mujeres casadas. Cabe mencionar que la totalidad de muestras provenientes de mujeres casadas estaban en el segundo grupo etario.

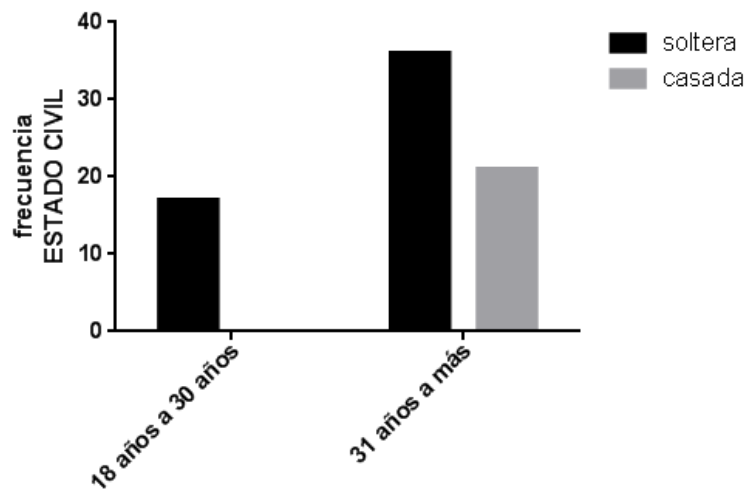


Figura 9: Relación entre Edad vs Estado Civil

7.7.4 Informe Patológico vs. Presencia de VPH

En la Figura N° 10 se observa la relación entre el informe patológico y la presencia del VPH en las muestras evaluadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba Chi cuadrado en donde se observa que no existe una relación estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p = 0.68$). Es decir no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre la positividad y negatividad del VPH en relación al Informe Patológico.

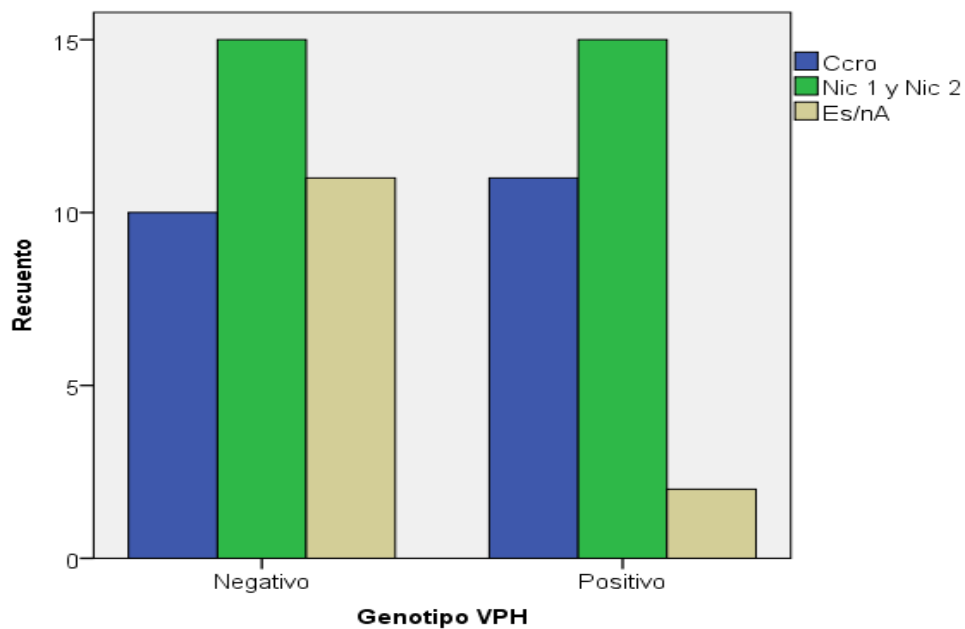


Figura 10: Relación entre Informe Patológico vs. VPH positivo/ negativo

Según el informe de patología de las 39 muestras con resultado positivo para presencia de VPH - 16, 15 muestras presentaban diagnóstico de cervicitis crónica

(Ccro), 20 muestras eran NIC 1y2, y 4 muestras pertenecían a Epitelio sin ninguna alteración (Es/nA). Las 35 muestras negativas para presencia de VPH se distribuyó de la siguiente manera: 11 muestras con Ccro, 13 muestras con NIC 1y2, y 11 muestras sin alteraciones (Es/nA). Sin embargo se observa que existe una tendencia a que las muestras sin ningún tipo de alteración no presenten el VPH - 16 en comparación a las muestras con lesiones.

7.7.5 Informe Patológico vs Estado Civil

En la Figura N° 11 se observa la relación entre informe patológico y estado civil. Se dividieron en dos grupos, Ccro y NIC1y 2 (con alteraciones) y Es/n A (sin alteraciones). Se realizó la evaluación estadística con la Prueba Chi cuadrado, en donde se observa que existe estadísticamente una asociación entre el estado civil y las muestras con alteraciones. Es decir las muestras con alteraciones en su mayoría corresponden a mujeres solteras ($p = 0.002$).

Según el estado civil las muestras se dividieron entre solteras y casadas. Donde 53 muestras fueron de mujeres solteras y 21 correspondían a mujeres casadas. Según el informe patológico en el grupo de solteras: 20 tenían Ccro, 28 NIC1y2, y 5 eran muestras con Es/n A. en el grupo de casadas. 6 tenían Ccro, 5 NIC1y2, y 10 eran muestras con Es/n A. Indicando que las muestras con alteraciones en su mayoría corresponden a mujeres solteras.

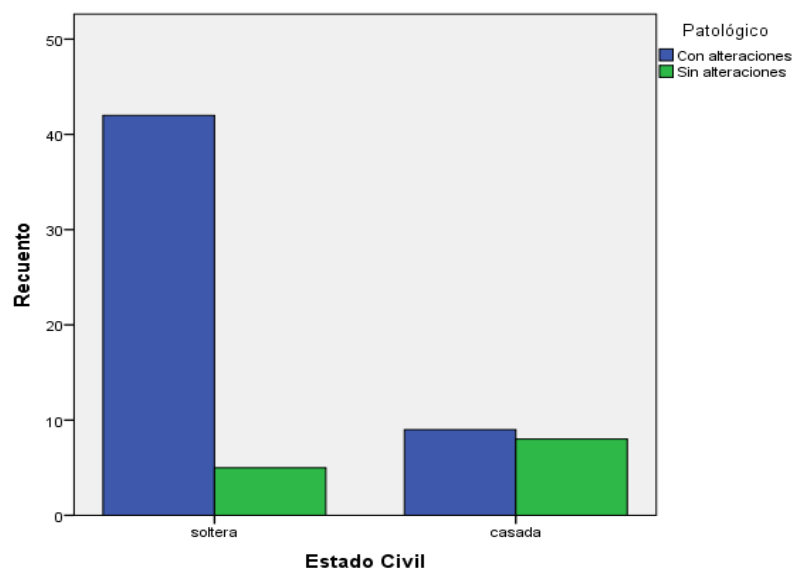


Figura 11: Relación entre Informe Patológico vs. Estado civil

7.8 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LT CD4, LT CD8 y LT reg: INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la evaluación de las poblaciones linfocitarias por la técnica de Inmunohistoquímica se analizaron 64 muestras de las 74 muestras totales, esto se debió a que 10 muestras no presentaban taco parafinado.

7.8.1 LT CD4 vs. Presencia de VPH

En la Figura N° 12 se observa la distribución de los LT CD4 con respecto a la presencia del VPH en las muestras evaluadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba de U de Mann-Whitney en donde se observó mayor cantidad de LT CD4 en biopsias que tienen la presencia del VPH ($p = 0.06$), es decir la distribución de los

valores de LT CD4 son diferentes en las muestras con VPH positivo en comparación de las muestras con VPH negativo.

Se analizaron 64 muestras que según la técnica por qPCR se observó que 28 dieron resultado positivo para VPH (43.75 %) y 36 dieron resultado negativo (56.25 %). El promedio de la cuantificación de LT CD4 para las muestras VPH positivas es de 38.29%, y para muestras VPH negativas el promedio de LT CD4 es de 28%.

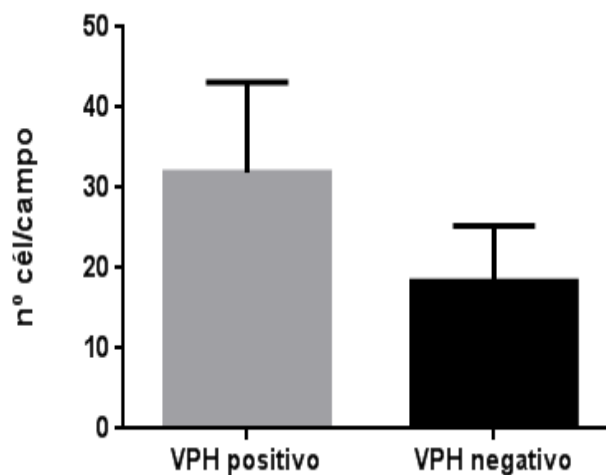


Figura 12: Distribución de LT CD4 vs. VPH positivo/ negativo

7.8.2 LT CD4 vs. Presencia de VPH (superficies)

En la Figura N° 13 se observa la distribución de los LT CD4 con respecto a la presencia del VPH en las muestras evaluadas, se realizó la lectura en diferentes

superficies: Epitelio y Estroma. Se realizó la evaluación estadística a nivel epitelial con la prueba de U de Mann-Whitney en donde se observó mayor cantidad de LT CD4 en biopsias que tienen la presencia del VPH ($p = 0.0009$), es decir la distribución de los valores de LT CD4 son diferentes en las muestras con VPH positivo en comparación de las muestras con VPH negativo. En cambio a nivel de estroma se observa una tendencia a que exista mayor cantidad de LT CD4 en biopsias con presencia de VPH. Independientemente de la presencia del virus existe mayor cantidad de LT CD4 a nivel de estroma.

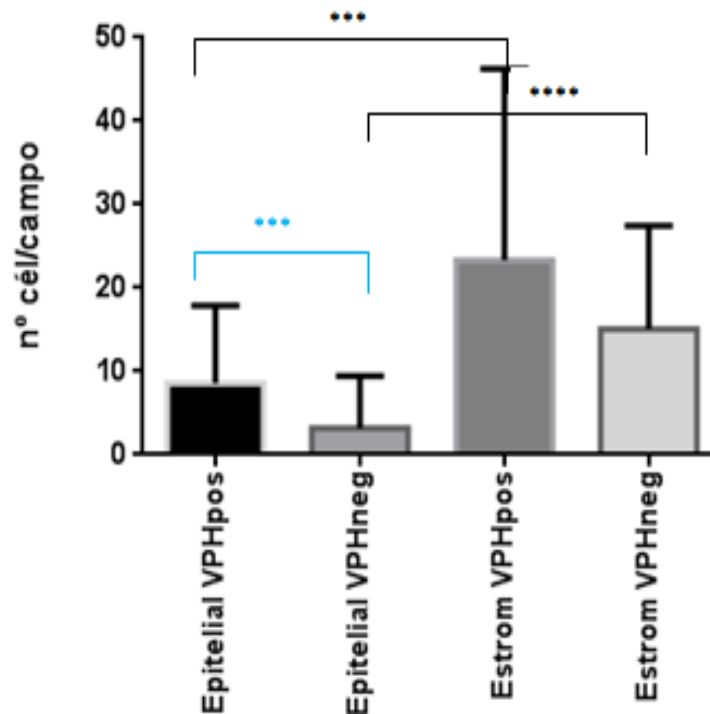


Figura 13: Distribución de LT CD4 vs. VPH positivo/ negativo (superficies)

7.8.3 LT CD8 vs. Presencia de VPH

En la Figura N° 14 se observa la distribución de los LT CD8 con respecto a la presencia del VPH en las muestras evaluadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba de U de Mann-Whitney en donde se observó que la distribución de los valores de LT CD8 no son diferentes en las muestras con VPH positivo en comparación de las muestras con VPH negativo ($p = 0.3938$).

Se analizaron 64 muestras de las cuales 28 son positivas para VPH (43.75 %) y 36 dieron resultado negativo (56.25 %). El promedio de la cuantificación de LT CD8 para las muestras VPH positivas es de 31.98%, y para muestras VPH negativas el promedio de LT CD8 es de 32.9%.

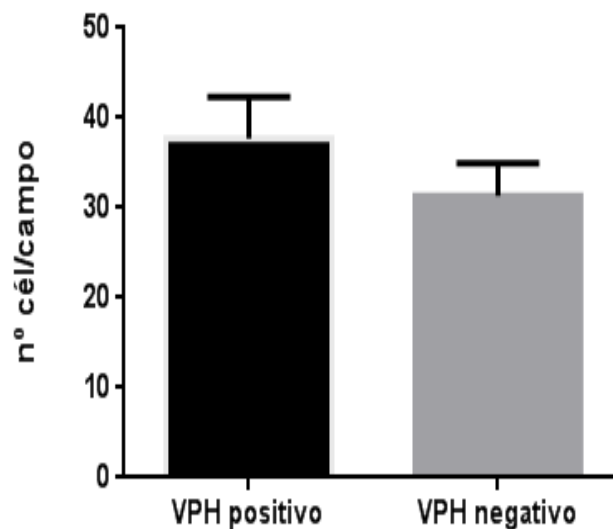


Figura 14: Distribución de LT CD8 vs. VPH positivo/ negativo

7.8.4 LT CD8vs. Presencia de VPH (superficies)

En la Figura N° 15 se observa la distribución de los LT CD8 con respecto a la presencia del VPH en las muestras evaluadas, se realizó la lectura en diferentes superficies: Epitelio y Estroma. Se realizó la evaluación estadística a nivel epitelial con la prueba de U de Mann-Whitney en donde no existe diferencia significativa entre la cantidad de LT CD8 a nivel epitelial cuando hay presencia o ausencia de VPH (0.088). A nivel de estroma tampoco se encontró diferencia significativa (0.6819). Se observó que existe diferencia significativa entre la cantidad de LT CD8 a nivel de estroma (VPH+) y a nivel epitelial (VPH+) (0.0002) y a nivel de estroma (VPH-) y a nivel epitelial (VPH-) (0.0021). Hay mayor cantidad de LT CD8 en el estroma independientemente de la presencia del VPH.

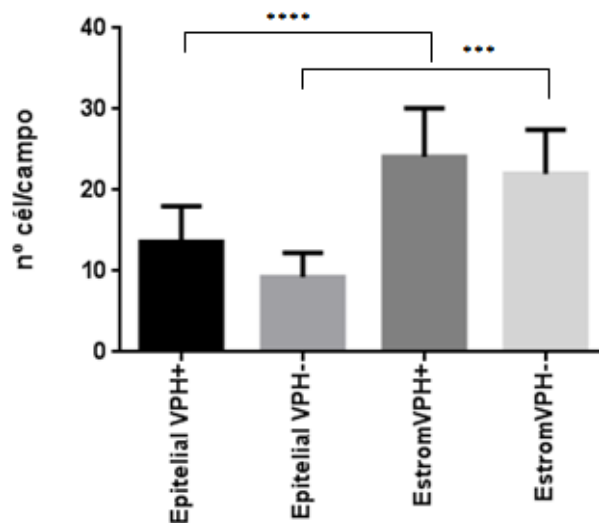


Figura 15: Distribución de LT CD8 vs. VPH positivo/ negativo (superficies)

7.8.5 LT reguladores vs. Presencia de VPH

En la Figura N° 16 se observa la distribución de los LT reguladores con respecto a la presencia del VPH en las muestras evaluadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba de U de Mann-Whitney en donde se observó que la distribución de los valores de LT reg no son diferentes en las muestras con VPH positivo en comparación a las muestras con VPH negativo. ($p = 0.8048$).

Se analizaron 64 muestras de las cuales 28 son positivas para VPH (43.75 %) y 36 dieron resultado negativo (56.25 %). El promedio de la cuantificación de LT reg para las muestras VPH positivas es de 34.62%, y para muestras VPH negativas el promedio de LT reg es de 30.85%.

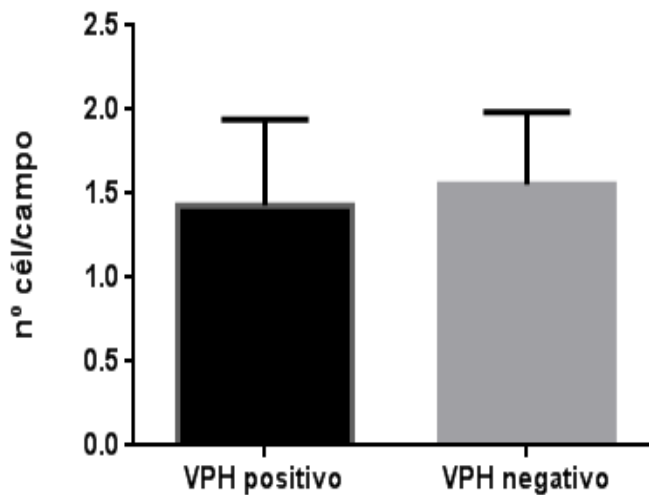


Figura 16: Distribución de LT reguladores vs. VPH positivo/ negativo

7.8.6 LT reguladores vs. Presencia de VPH (superficies)

En la Figura N° 17 se observa la distribución de los LT reguladores con respecto a la presencia del VPH en las muestras evaluadas, se efectuó la lectura en diferentes superficies: Epitelio y Estroma. Se realizó la evaluación estadística a nivel epitelial con la prueba de U de Mann-Whitney en donde no existe diferencia significativa entre la cantidad de LT reg a nivel epitelial cuando hay presencia o ausencia de VPH (0.8023). A nivel de estroma tampoco se encontró diferencia significativa (0.9186). Se observó que existe diferencia significativa entre la cantidad de LT reg a nivel de estroma (VPH+) y a nivel epitelial (VPH+) (0.0492) y a nivel de estroma (VPH-) y a nivel epitelial (VPH-) (0.0123). Hay mayor cantidad de LT reg en el estroma independientemente de la presencia del VPH.

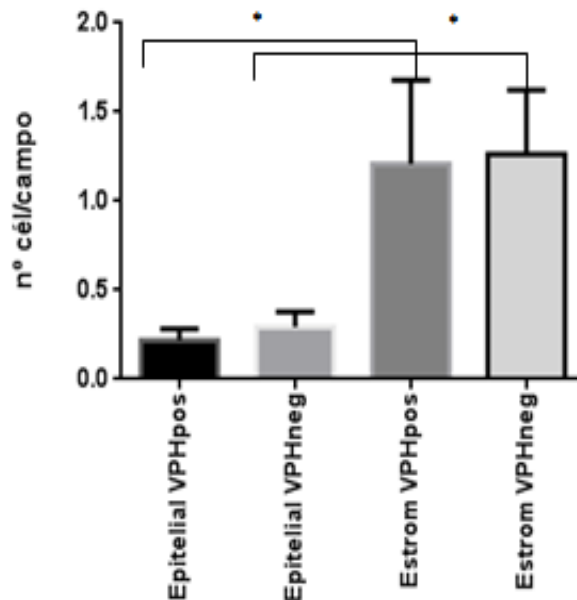


Figura 17: Distribución de LT reg vs. VPH positivo/ negativo (superficies)

7.8.7 Ratio Foxp3/CD4 vs. Presencia de VPH

En la Figura N° 18 se observa la distribución del ratio entre Foxp3/CD4 con respecto a la presencia del VPH en las muestras evaluadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba de U de Mann-Whitney en donde se observó que la distribución de los valores de LT reg no son diferentes en las muestras con VPH positivo en comparación a las muestras con VPH negativo. ($p = 0.9184$).

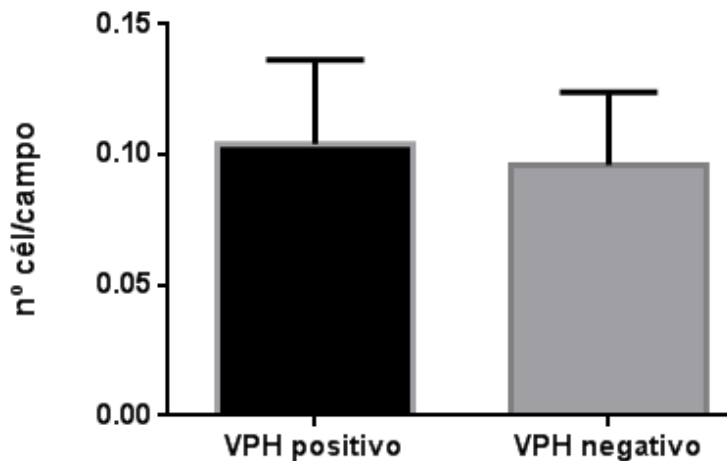


Figura 18: Distribución de Ratio Foxp3/CD4 vs. VPH positivo/ negativo

7.8.8 Ratio Foxp3/CD4 vs. Presencia de VPH (superficies)

En la Figura N° 19 se observa la distribución de los LT reguladores con respecto a la presencia del VPH en las muestras evaluadas, se efectuó la lectura en diferentes superficies: Epitelio y Estroma. Se realizó la evaluación estadística a nivel epitelial

con la prueba de U de Mann-Whitney en donde no existe diferencia significativa entre la cantidad de LT reg a nivel epitelial cuando hay presencia o ausencia de VPH (0.6029). A nivel de estroma tampoco se encontró diferencia significativa (0.4681). No se observa diferencia significativa entre la cantidad de LT reguladores a nivel de estroma (VPH+) y a nivel epitelial (VPH+) (0.2602) y a nivel de estroma (VPH-) y a nivel epitelial (VPH-) tampoco existe dicha diferencia (0.1431). Hay mayor cantidad de LT reg en el estroma independientemente de la presencia del VPH.

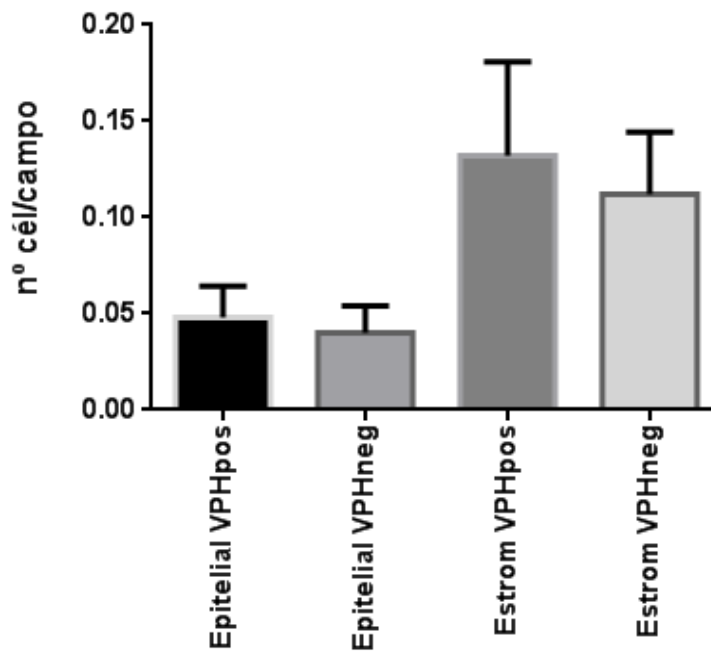


Figura 19: Distribución de Ratio Foxp3/CD4 vs. VPH positivo/ negativo (superficies)

7.8.9 LT CD4 vs. Informe patológico

En la Figura N° 20 se observa la distribución de los LT CD4 según los hallazgos histopatológicos de las muestras analizadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba de Kruskal-Wallis, en donde se observó que la distribución de los valores de LT CD4 no es diferente en los tipos de tejido según el Informe Patológico. ($p = 0.2131$). Sin embargo se observa una tendencia a mayor cantidad de LT CD4 en muestras con algún tipo de lesión (Ccro y NIC1 y NIC2) y menor cantidad de LT CD4 en muestras sin ninguna alteración.

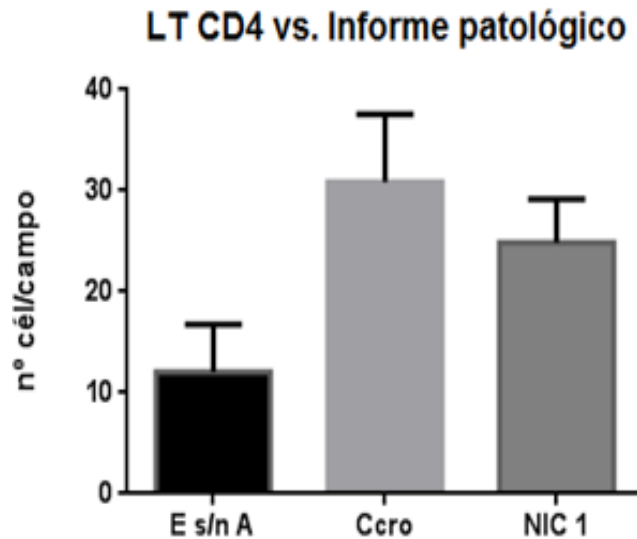


Figura 20: Distribución de LT CD4 vs. Informe patológico

7.8.10 LT CD4 vs. Informe patológico (superficies)

En la Figura N° 21 se observa la distribución de los LT CD4 con respecto al informe patológico de las muestras evaluadas, se realizó la lectura en diferentes superficies: Epitelio y Estroma. Se realizó la evaluación estadística a nivel epitelial con la prueba Kruskal-Wallis en donde se observó diferencia significativa a nivel epitelial ($p=0.0001$), se realizó la evaluación para saber entre que grupos patológicos existe la diferencia significativa y se encontró que entre que entre el epitelio con presencia NIC1 existe mayor cantidad de LT CD4 que en el epitelio sin ninguna alteración ($p = 0.002$).

A nivel de estroma se observa una tendencia a que exista mayor cantidad de LT CD4 en biopsias con presencia de alguna alteración (NIC1 o Ccro). Independientemente de la característica que otorga el informe patológico existe mayor cantidad de LT CD4 a nivel de estroma. Se encontró diferencia significativa entre el nivel epitelial con Ccro y estroma con Ccro ($p = 0.0009$), y entre el nivel epitelial con NIC1 y estroma con NIC1 ($p = 0.0036$).

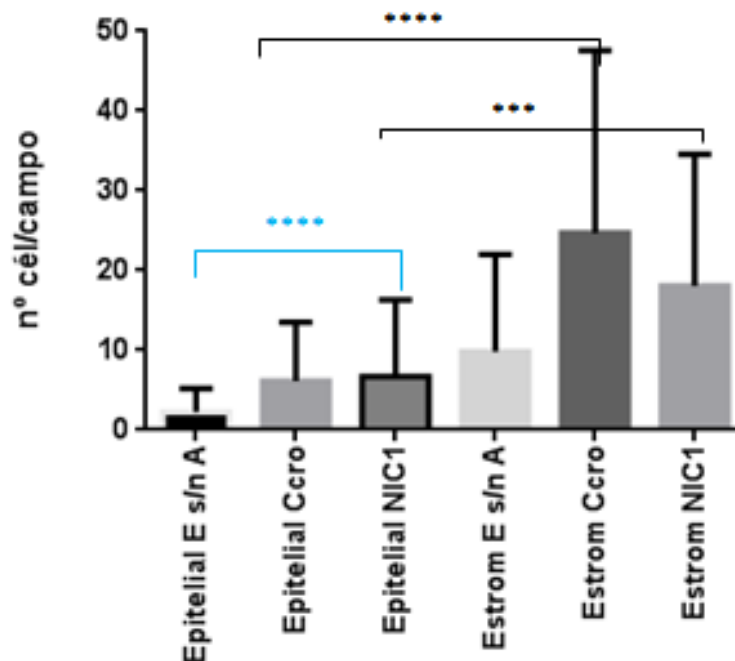


Figura 21: Distribución de LT CD4 vs. Informe Patológico (superficies)

7.8.11 LT CD8 vs. Informe patológico

En la Figura N° 22 se observa la distribución de los LT CD8 según los hallazgos histopatológicos de las muestras analizadas. Se realizó la evaluación estadística con la prueba de Prueba de Kruskal-Wallis, en donde se observó que la distribución de los valores de LT CD8 no es diferentes en los tipos de tejido según el Informe Patológico. ($p = 0.6925$). Aun así se observa menor cantidad de LT CD8 en las muestras donde no hay ninguna lesión.

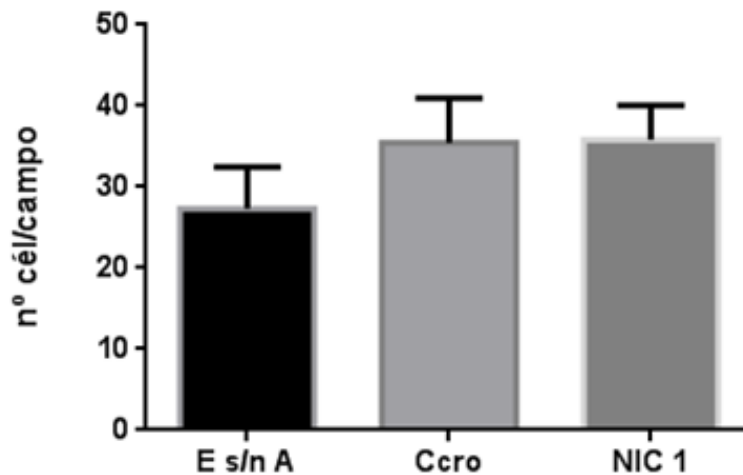


Figura 22: Distribución de LT CD8 vs. Informe patológico

7.8.12 LT CD8 vs. Informe patológico (superficies)

En la Figura N° 23 se observa la distribución de los LT CD8 con respecto al informe patológico de las muestras evaluadas, se realizó la lectura en diferentes superficies: Epitelio y Estroma. Se realizó la evaluación estadística a nivel epitelial con la prueba Kruskal-Wallis en donde no se observó diferencia significativa a nivel epitelial ($p=0.3588$). A nivel de estroma tampoco se observa diferencia significativa ($p = 6689$). Independientemente de la característica que otorga el informe patológico existe mayor cantidad de LT CD8 a nivel de estroma.

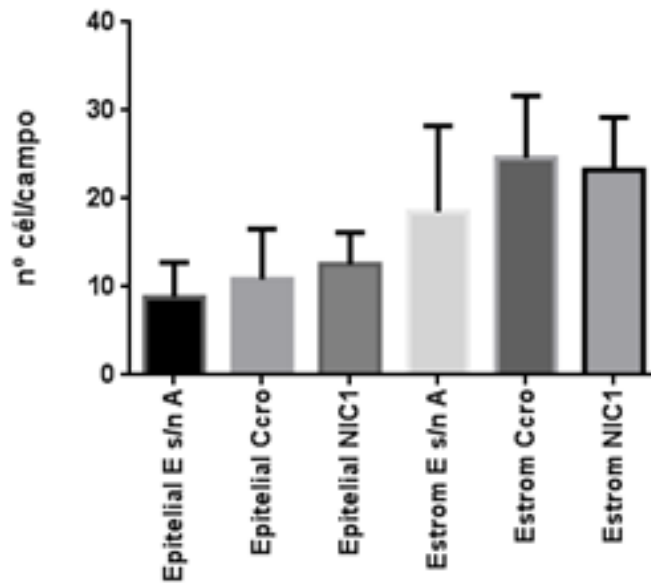


Figura 23: Distribución de LT CD8 vs. Informe Patológico (superficies)

7.8.13 LT reguladores vs. Informe patológico

En la Figura N° 24 se observa la distribución de los LT reguladores según los hallazgos histopatológicos de las muestras analizadas Ccro y NIC1 (con alteraciones) y Es/n a (sin alteraciones). Se realizó la evaluación estadística con la prueba de Kruskal-Wallis, en donde se observó que la distribución de los valores de LT reg es diferente en los tipos de tejido según el Informe Patológico ($p = 0.0382$). Hay una mayor cantidad de LT reg en muestras con alteraciones (Ccro y NIC1) y menor cantidad de LT reg en muestras sin alteraciones.

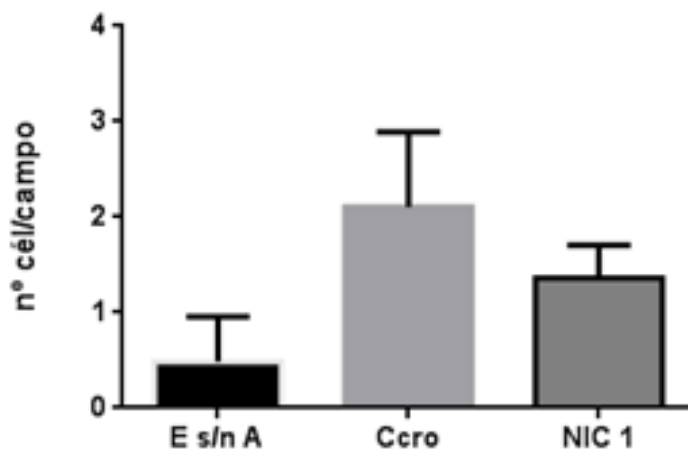


Figura 24: Distribución de LTreg vs. Informe patológico

7.8.14 LT reguladores vs. Informe patológico (superficies)

En la Figura N° 25 se observa la distribución de los LT reg con respecto al informe patológico de las muestras evaluadas, se realizó la lectura en diferentes superficies: Epitelio y Estroma. Se evaluó estadísticamente el nivel epitelial con la prueba Kruskal-Wallis en donde no se observó diferencia significativa a nivel epitelial ($p=0.2271$). A nivel de estroma tampoco se observa diferencia significativa ($p = 0.0533$), pero se observa que las muestras con alteraciones (Ccro y NIC1) tienen mayor presencia de LT reg. Independientemente de la característica que otorga el informe patológico existe mayor cantidad de LT reg a nivel de estroma.

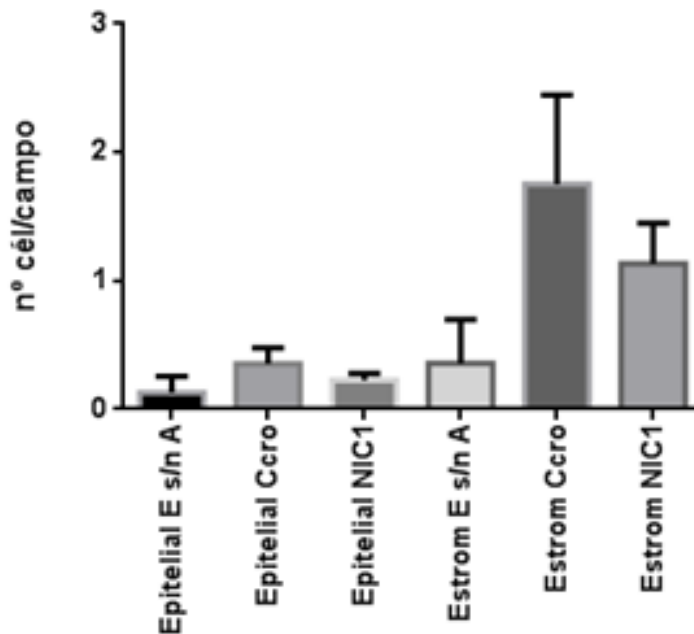


Figura 25: Distribución de LTreg vs. Informe patológico (superficies)

7.8.15 Ratio Foxp3/CD4 vs. Informe patológico

En la Figura N° 26 se observa la distribución de los LT reguladores según los hallazgos histopatológicos de las muestras analizadas Ccro y NIC1 (con alteraciones) y Es/n a (sin alteraciones). Se realizó la evaluación estadística con la prueba de Kruskal-Wallis, en donde se observó que la distribución de los valores de LT reg es diferente en los tipos de tejido según el Informe Patológico ($p = 0.0446$). Hay una mayor cantidad de LT reg en muestras con alteraciones (Ccro y NIC1) y menor cantidad de LT reg en muestras sin alteraciones.

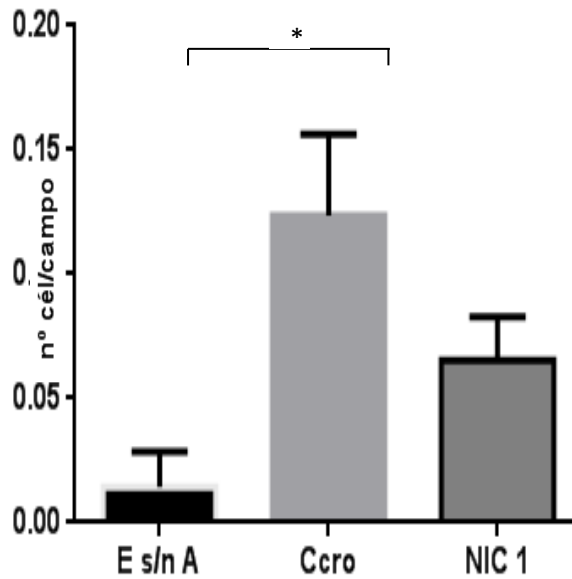


Figura 26: Distribución de Ratio Foxp3/CD4 vs. Informe patológico

7.8.16 Ratio Foxp3/CD4 vs. Informe patológico (superficies)

En la Figura N° 27 se observa la distribución de los LT reg con respecto al informe patológico de las muestras evaluadas, se realizó la lectura en diferentes superficies: Epitelio y Estroma. Se evaluó estadísticamente el nivel epitelial con la prueba Kruskal-Wallis en donde no se observó diferencia significativa a nivel epitelial ($p=0.6554$). A nivel de estroma tampoco se observa diferencia significativa ($p=0.9427$), pero se observa que las muestras con alteraciones (Ccro y NIC1) tienen mayor presencia de LT reg. Independientemente de la característica que otorga el informe patológico existe mayor cantidad de LT reg a nivel de estroma.

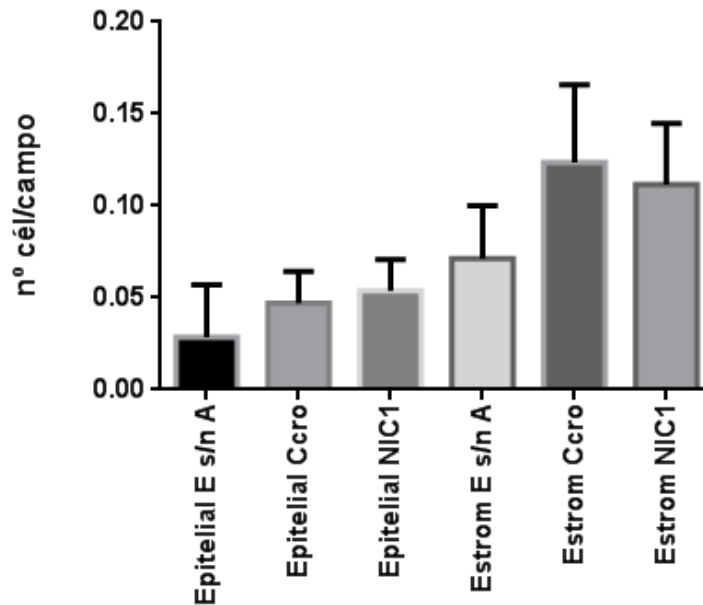


Figura 27: Distribución de Ratio Foxp3/CD4 vs. Informe patológico (superficies)

7.8.17 Presencia de LT reguladores vs. Presencia de VPH

En la figura N° 28 se observa la frecuencia de la población de linfocitos T reg cuando están presentes (Foxp3 positivo) y cuando están ausentes (Foxp3 negativo) frente a la infección por VPH. Se realizó la evaluación estadística con la prueba Chi cuadrado en donde se observa que no existe una relación estadísticamente significativa entre grupos ($p = 0.773$). No se encontró ninguna asociación, siendo los valores de LT reg iguales cuando existe presencia o ausencia del virus.

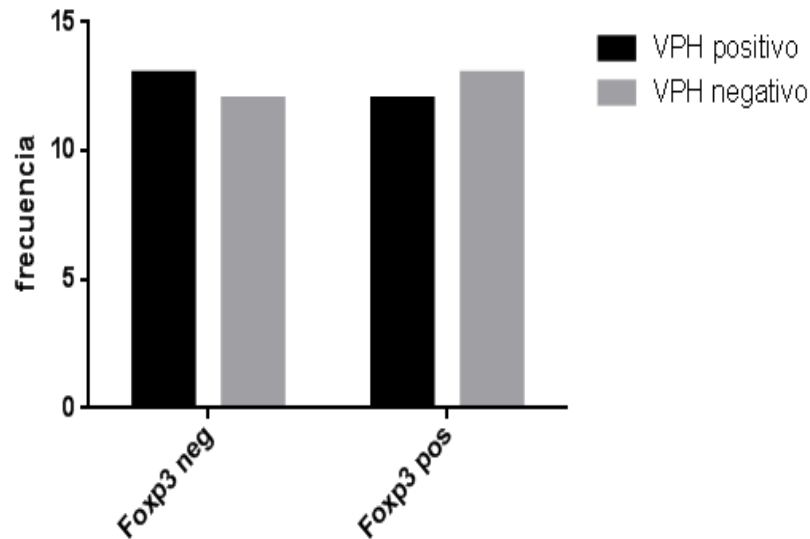


Figura 28: Frecuencia de Foxp3 positivo/negativo vs. VPH positivo/ negativo

7.8.18 Presencia de LT reguladores vs. Informe patológico

En la figura N° 29 se observa la frecuencia de la población de linfocitos T reg cuando están presentes (Foxp3 positivo) y cuando están ausentes (Foxp3 negativo) frente al diagnóstico que muestra el informe patológico. Se realizó la evaluación estadística con la prueba Chi cuadrado en donde se observa que no existe una relación estadísticamente significativa entre grupos ($p = 0.0553$). Pero se puede describir una asociación entre la presencia de LT reg (Foxp3 positivo) y muestras con alteraciones (NIC1, Ccro). En cambio cuando las muestras no presentan alteraciones (E s/n A) no existe presencia de LT reg (Foxp3 negativo).

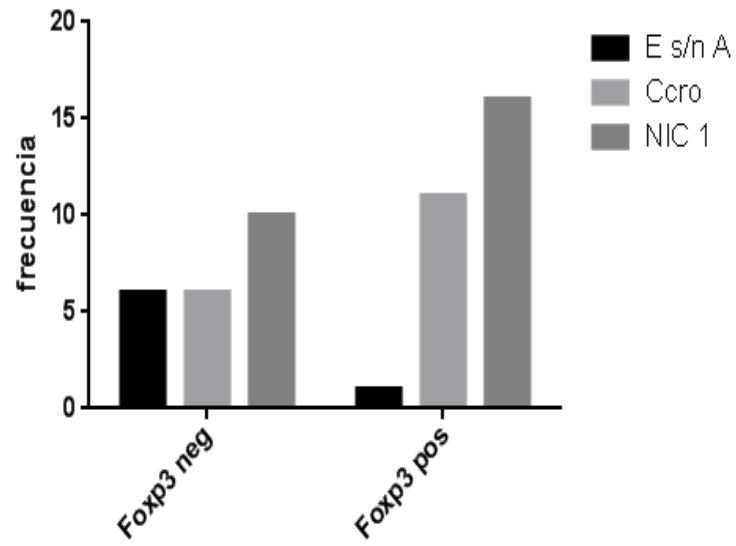


Figura 29: Frecuencia de FoXP3 positivo/negativo vs. Informe patológico

8 DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio ha sido determinar la frecuencia y asociaciones epidemiológicas de Linfocitos T efectores (CD4+ y CD8+) y Linfocitos T reguladores (Foxp3+) en biopsias de cérvix, obtenidas para tamizaje de cáncer de cuello uterino (CCU), según se detecte la infección o no con VPH-16, de donantes peruanas provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) y así poder hacer la primera descripción de estos parámetros en la población peruana.

Como se puede ver en este estudio, la mayoría de nuestras muestras (71.62 %) procedían de mujeres solteras. Llama la atención que a una campaña de despistaje de Papanicolaou acudan mayoritariamente mujeres solteras, con respecto a la edad el 79.73% corresponde a mujeres de 30 años a más y el 20.27 % correspondieron a mujeres con 18 a 29 años. Sin embargo, el estado civil y edad sirven como importantes marcadores de riesgo de exposición de VPH y otras infecciones de transmisión sexual. Sullcahuaman-Allende et al 2015 (58) reportaron una campaña realizada en la ciudad de Lima, donde el 64.7% de asistentes fueron mujeres solteras.

Del total de muestras, la mayoría (44.59%) correspondieron a pacientes con diagnóstico de NIC1 y NIC2, el 35.14 % correspondió a cervicitis crónica y sólo un 20.27 % a pacientes con epitelio sin alternaciones. Lo cual muestra que la mayoría de las muestras evaluadas presentan una lesión o alteración en los estudios histopatológicos. Alves et al, 2010 (19) reportaron que el 39.2 % correspondían a muestras negativas para lesiones intraepiteliales, el 46.4 % correspondía a lesiones

NIC 1,2y3 y el 14.2 % a muestras con carcinoma. Los distintos resultados mostrados en ambos estudios se pueden deber básicamente al tipo de población estudiada y sus hallazgos histopatológicos.

Los resultados con respecto a la extracción y cuantificación del ADN fueron muy variables ya que presentaron 3 aspectos distintos: deshidratadas y poco viables, muestras grandes y viables, y muestras pequeñas y viables, posiblemente estas diferencias se debieron al método que se utilizó al momento de tomar la biopsia. Las muestras grandes y viables tuvieron una cuantificación promedio alta en comparación con las muestras pequeñas y viables, las cuales estuvieron muy por encima de los valores de ADN obtenidos de las muestras poco viables y deshidratadas. Indicando que la viabilidad y tamaño de las muestras es un factor importante en los resultados de extracción y cuantificación del ADN. Leiro-Fernández et al 2013 (59) han demostrado e indicado que la extracción y concentración de ADN mostraron diferencias en función del aspecto y viabilidad de las muestras histológicas de muestras ganglionares. Este parámetro debe resaltarse, dado que se demuestra la importancia de una adecuada preservación y viabilidad de la muestra para una mejor obtención del DNA.

La evaluación de la presencia del VPH en las 74 muestras se realizó por dos técnicas: PCR convencional y PCR en tiempo real. Por PCR convencional se obtuvieron 3 resultados positivos para presencia de VPH, mostrando una banda a 450 pb, es decir el 4.05 % de la población estudiada presenta positividad para el VPH según esta técnica. Por rtPCR se obtuvo que el 52.3% del total de muestras dio resultado

positivo para esta esta misma infección. Sullcahuaman-Allende et al 2015 (58) en un estudio transversal de 465 pacientes, evaluaron las características sociodemográficas de mujeres peruanas con VPH detectado por PCR-RFLP, encontrando el 32.5 % de los casos con presencia del virus. Por otro lado Reyna et al, 2016 (60), realizaron la detección y genotipificación de VPH por PCR-RFLP en pacientes de ciudad de La Libertad en el año 2015, evaluaron 34 muestras donde se reportó 9% de positividad para el VPH. Este trabajo reporta una mayor frecuencia de infección cervical, esta diferencia puede deberse al tipo de selección de la población estudiada y factores sexuales no descritos. Estos casos podrían pertenecer a una población de mayor riesgo de infección que la población promedio.

La genotipificación viral se llevó acabo por dos técnicas, la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) mostró resultados para VPH – 31, VPH - 16 consideradas de alto riesgo oncológico y VPH – 11 considerada de bajo riesgo oncológico. La otra técnica empleada solo detectó genotipos VPH - 16 y VPH - 18 por rtPCR. Dando como resultado que el 52.3% de las muestras fue positivo para VPH – 16 y 1.4 % de resultados dio positivo para la infección por VPH-18. García, 2008 (61) reportó la detección del Genoma del VPH aplicando la técnica PCR en tiempo real vs. Análisis histopatológico. Donde la prevalencia de casos detectada en 52 muestras fue de un 93.33% en una población de Guayaquil. Concluyendo que ambas técnicas se complementan y son de gran utilidad en investigación, detección y decisión terapéutica.

La única muestra VPH 16 encontrada por la técnica de RFLP fue corroborada por la técnica de rtPCR. Las dos muestras positivas restantes por RFLP (VPH-31 y VPH-11) arrojaron resultado positivo con la técnica rtPCR para el diagnóstico de VPH-16. Es decir estas muestras al parecer tienen una infección múltiple ocasionada por más de un genotipo de VPH, para realizar la corroboración se deberían utilizar rtPCR para los genotipos VPH-11 y VPH-31. Sulcahuaman-Allende et al 2015 (58) encontraron, por PCR-RFLP, que de los casos VPH positivos, el más frecuente fue VPH-16 (23,8%); VPH-31 en 8,0%; VPH-18 en 3,3%; VPH-33 en 3,3%; VPH-6 en 11,9%, y VPH-11 en 5,3% de los casos positivos. Este mismo trabajo reportó que el 6% de los casos positivos presentó dos genotipos de VPH simultáneamente (tres casos VPH 6 y VPH 16; tres casos VPH 16 y VPH 31; un caso VPH 11 y VPH 33, y un caso VPH 16 y VPH 33). Un caso presentó tres genotipos de VPH 6, 16 y 31.

Berger et al 2018 (62) evaluaron y compararon la técnica PCR convencional y PCR en tiempo real para la detección de *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas. Ellos mostraron que la PCR en tiempo real tuvo un mejor rendimiento y una mayor tasa de detección de colonización por *S. agalactiae* en comparación con el ensayo de PCR convencional, concluyendo que con el uso de la técnica de rtPCR se obtiene resultados rápidos y adecuados para exámenes de rutina, contribuyendo a la optimización de los enfoques preventivos para esta infección. Nuestro trabajo demuestra que la sensibilidad de la técnica de rtPCR es superior a la técnica de PCR convencional, comprobando que la rtPCR tiene una alta sensibilidad, parámetro principal cuando el objetivo es la detección.

En la evaluación de las características poblacionales, con respecto al estado civil y la relación que existe con la presencia del VPH, no se encontró diferencia significativa. Sin embargo hay una tendencia a que las mujeres solteras presenten el VPH en comparación a las mujeres casadas. Sullcahuaman-Allende et al 2015 (58), en un estudio con 465 mujeres, demuestra que ser soltera tiene asociación con la presencia de infección de VPH-AR. Probablemente esta característica está relacionada con la falta de educación sexual y métodos de protección contra ETS, además que la vida sexual de una persona soltera puede ser mucho más amplia que la de una persona casada.

Con respecto a la edad y la relación que existe con la presencia de VPH tampoco se encontró dicha relación. Se trabajaron diferentes grupos etarios y aun así no se pudo encontrar relación alguna. Esto demuestra que la infección con VPH se puede dar a cualquier edad, este trabajo incluyó personas de 20 años hasta 62 años. Del mismo modo Sullcahuaman-Allende et al 2015 (58) tampoco encontró dicha relación pero concluye que esta característica es importante cuando se habla de exposición frente al VPH además se debería de tomar en cuenta la edad de inicio de vida sexual.

Para mayor conocimiento se realizó la evaluación entre el estado civil y grupos etarios, en donde se pudo encontrar una relación entre el estado civil soltero y las edades por debajo de 31 años, dando mayor realce a los resultados encontrados en la evaluación de estado civil vs. presencia del VPH. Nuevamente indicando que las personas "jóvenes" y solteras tienen mayor riesgo de contraer esta infección, ya sea por la vida sexual, a veces amplia, de una persona soltera o que el VPH aún no está

siendo eliminado por el sistema inmune. En cambio cuando se evaluó a personas casadas la infección no expreso significancia, indicando que una persona "mayor" y casada tiene menos probabilidades contraer la infección por VPH, ya sea por la vida sexual con una sola pareja o por que pudo haber expresado la infección en una edad temprana, generando respuesta inmunológica, eliminando el virus y forjando memoria inmunológica.

Se evaluó también el informe histopatológico y la relación que pueda existir con la presencia de VPH. Donde se observa que existe una tendencia a que las muestras sin ningún tipo de alteración (Es/n a) no presenten el VPH en comparación a las muestras con lesiones (Ccro y NIC1y2). Del mismo modo Alves et al, 2010 (19) realizo un estudio con 56 muestras donde se describe la frecuencia de los hallazgos histopatológicos y el presencia del VPH, indicando que todas las muestras con algún tipo de alteración (NIC 1,2y3, Carcinoma) era VPH positivo. Dejando en claro que mientras exista una lesión cervical es más probable que la infección por VPH se origine. De la misma forma este trabajo evaluó la relación que existe entre el informe patológico y el estado civil, en donde se encontró una asociación, las muestras con alteraciones histopatológicas corresponden en su mayoría a pacientes solteras. Lo cual explica que el comportamiento sexual es diferente en personas solteras de casadas, siendo estas más propensas a sufrir de alteraciones cervicales y por consiguiente la infección con el VPH.

Con respecto a la distribución de los LT CD4 y la presencia del VPH en las muestras evaluadas los hallazgos son interesantes. Se observó una mayor cantidad de LT CD4

en biopsias que tienen la presencia del VPH ($p = 0.06$). Alves et al, 2010 encontraron que hubo una tendencia a que los LT CD4 predominaron en las muestras positivas para VPH, sin embargo no encontraron significancia estadística. Esta asociación encontrada en el presente trabajo está acorde con hallazgos de Alves. Estas frecuencias de LT CD4 podrían deberse a que las muestras infectadas por VPH-16 han recibido la señal de los queratinocitos para dirigirse al sitio de infección y así ordenar la eliminación de las células infectadas por el virus. Los queratinocitos juegan un papel importante en esta condición, ya que el VPH infecta principalmente células del estrato basal que luego se transforman en queratinocitos. Los queratinocitos trabajan colaborativamente con el sistema inmune y son también responsables de presentar antígenos y con la capacidad de inducir la expresión de citoquinas tipo Th1/Th2 y respuestas de los LT (19,63).

Mientras, en la distribución de los LT CD8 y la presencia del VPH en las muestras evaluadas no se encontró diferencia significativa. Este hallazgo también guarda correlación con lo reportado por Alves et al, 2010 no encontraron una relación significativa entre LT CD8 y la presencia del VPH. Lo cual sugiere que la respuesta dada por la activación de LT CD4 está recién en curso, permitiendo quizá después la activación y proliferación de los LT CD8 los cuales tienen la capacidad de actuar frente a la infección viral establecida (19,64).

Uno de los componentes más novedosos de nuestro trabajo fue la determinación de la distribución de LT reguladores en relación al tipo de condición del paciente (NIC1, cervicitis crónica o epitelio sin alteraciones) y a la presencia del VPH.

1) Primero: Se evaluó la presencia de LTreg en relación a la presencia de infección o no por HPV. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa. Indicando que tanto en las muestras con y sin el VPH la frecuencia de LTreg no difirió. Visser et al, 2007, evaluaron la frecuencia y papel de las células T reguladoras en pacientes con lesiones cervicales pre-malignas y malignas. Demostrando que los pacientes con lesiones graves (cáncer cervical) presentan frecuencias altas de LTreg. Los LTreg son activados para realizar el control homeostático de las respuestas inmunes. Nuestro trabajo evaluó muestras de cérvix con lesiones consideradas no graves (NIC 1) y Cervicitis crónica. No se evaluaron lesiones cancerosas o pre cancerosas. Este puede ser el motivo de que las frecuencias halladas de LTreg sean bajas. Esto nos permite argumentar que en fases iniciales de la infección, aún el HPV no ha montado su mecanismo de evasión a través de la atracción de LTreg, siendo entonces estos mecanismos de evasión más dependientes del momento de la infección (y por lo tanto la capa epitelial comprometida) que de la infección misma por VPH (65).

2) Se evaluó también la relación que existe entre las poblaciones de LT CD4, CD8 y LTreg con respecto al hallazgo patológico. En la población de LT CD4 se encontró que las muestras donde los hallazgos histopatológicos indican “sin alteración” existe una baja presencia de estas células, en cambio cuando se habla de lesiones como “NIC1” hay una mayor frecuencia de LT CD4, en lesiones “Cervicitis crónica” la frecuencia sigue siendo mayor en comparación

a un epitelio “sin alteración”. Lo cual quiere decir que la fase efectora está siendo activada en lesiones como NIC (neoplasia) o Ccro. Con respecto a LT CD8 no hay diferencia significativa entre frecuencias de LT CD8 de las muestras donde hay lesión (NIC1 o Ccro) y las muestras donde no hay lesión. Alves et al, 2010, demostró que existe un predominio de LT CD8 en las alteraciones NIC II / III. Demostrando que su manifestación sucede en la fase efectora, después de la existencia de la replicación viral y en la presencia de linfocitos T CD4, los cuales son necesarios para la activación de LT CD8. El resultado reportado en este trabajo se considera esperado, ya que los valores de CD8 en muestras sin alteraciones deberían ser ligeramente menores que biopsias con alteraciones (NIC, Ccro). Por último la evaluación realizada a los LTreg reportó que hay una mayor frecuencia de LTreg ($p= 0.0382$) en muestras con alteraciones (Ccro y NIC1 y menor cantidad en muestras sin alteraciones. Indicando que los LTreg empiezan a actuar a medida que se desencadena la respuesta inmune mediada por LT efectores (19,62,63).

Se realizó la evaluación de poblaciones linfocitarias por superficies, dividiendo la biopsia en epitelio y estroma. Se sabe que el epitelio cervical es rico en células inmunes las cuales pueden ser activadas en respuesta a una infección viral, la población de células inmunes que predomina está constituida por las células de Langerhans (LC), las cuales han mostrado que pertenecen a la respuesta innata, siendo responsables del reconocimiento, el procesamiento y la presentación antigénica. Sin embargo, a nivel del estroma se encuentran importantes mediadores

de la respuesta inmune, predominando la población de Linfocitos T, los cuales son parte de la respuesta adaptativa y están implicados en el inicio de la eliminación del virus (66,67). Primero: A nivel epitelial se encontró diferencia significativa entre las poblaciones linfocitarias correspondientes a LT CD4, el epitelio con presencia de VPH tiene mayor cantidad de estos linfocitos de la respuesta efectora, este hallazgo nos indica que la labor ejercida por los LT CD4 se ve activada cuando hay presencia de infección, migrando del estroma al epitelio para la eliminación viral. Con respecto a la frecuencia de LT CD8 no se encontró diferencia significativa entre un epitelio con presencia de VPH o ausencia de este. En la evaluación de la respuesta reguladora frente a la presencia del VPH no se encontró diferencia significativa, podría deberse a que la respuesta efectora se empezando a activarse y así desencadenar la respuesta reguladora más adelante. Segundo: A nivel de estroma se evaluó la frecuencia de poblaciones linfocitarias y la presencia de VPH donde no se encontró diferencia significativa, tanto en las poblaciones de LT CD4, LT CD8 y LT reg. Independientemente de la infección por VPH existe una mayor cantidad de LT efectores (LT CD4, LT CD8) y LT reguladores en el estroma, esto va de acuerdo a la teoría encontrada frente a la distribución celular del tejido cervical (67).

Con respecto al informe patológico que presentaban las muestras se realizó la evaluación por superficies: epitelio y estroma, donde se encontró lo siguiente: Primero: Con respecto a LT CD4 se encontró diferencia significativa indicando una mayor frecuencia de células en las muestras que tienen alteraciones de tipo NIC1, lo que indica que la fase efectora está siendo activada en lesiones neoplásicas,

igualmente se observa una mayor frecuencia celular en las muestras con Cervicitis crónica. Con respecto a LT CD8 no se observa mayor cantidad de células entre un epitelio sano y epitelio con alteraciones, posiblemente porque la respuesta efectora se esté iniciando y seguidamente se producirá la activación de LT citotóxicos. Por ultimo con respecto a LT reg la frecuencia celular no varía en epitelio sin alteraciones frente a un epitelio con alteraciones (NIC1 o Ccro). De la misma manera independientemente de las características que muestre el informe patológico (sin alteraciones o con alteraciones) existe una mayor cantidad de LT efectores (LT CD4, LT CD8) y LT reguladores en el estroma, esto va de acuerdo a la teoría encontrada frente a la distribución celular del tejido cervical (67).

Las células T reg presentan marcadores de tipo CD4 y FoxP3, este último es un marcador importante para identificar las LT reg activas. En la técnica de IHQ no se pueden marcar y diferenciar ambos marcadores, por tal motivo se decidió realizar una relación entre el marcador FoxP3 y el marcador CD4 (Ratio Foxp3/CD4). Esta evaluación nos permitió definir exactamente nuestra población de LT reg. Se realizó la evaluación estadística donde se observó que los resultados de las frecuencias de los ratios Foxp3/CD4 no difieren de lo descrito en las frecuencias de LT reg (solo marcados con Foxp3) y la relación que presenta con VPH +/- o Informe patológico.

Se realizó la evaluación de la presencia o ausencia de LT reguladores y su asociación con la infección o no por VPH. No se observa dicha asociación, indicando que tanto en las muestras infectadas o no con el VPH la presencia de LTreg es igual. Además se evaluó la presencia o ausencia de LT reguladores y su asociación con el reporte

patológico, donde se obtuvo una asociación de la presencia de LTreg en muestras con alteraciones (Ccro y NIC). Esto puede indicar que la presencia de esta población celular reguladora puede favorecer y desencadenar lesiones más graves (65).

9 CONCLUSIONES

- La técnica de rtPCR mostró una mejor y alta sensibilidad frente a la técnica de PCR convencional, parámetro importante cuando el objetivo es la detección del virus.
- Con respecto al informe patológico las muestras con alteraciones (NIC1, Ccro) presentan una asociación con la presencia del VPH. Se observa también una asociación entre estado civil (soltera) y presencia del virus.
- Con respecto a las Poblaciones linfocitarias:
 - Con respecto a LT CD4, existe una mayor frecuencia cuando hay una infección por VPH y cuando las muestras presentan alteración (NIC1, Ccro).
 - Con respecto a LT CD8, no existe una asociación con respecto a la infección por VPH ni al informe patológico.
 - Con respecto a LT reguladores, hay una mayor cantidad de LT reg en muestras con alteraciones (NIC1, Ccro), sin embargo no difiere con respecto a la infección por VPH. Además se observa que la frecuencia de LT reguladores es baja en comparación a LT efectores.
 - A nivel de superficies (epitelio y estroma) tanto en la comparación de poblaciones linfocitarias efectoras (LT CD4, LT CD8) y reguladoras (LT reg) vs. VPH+/- o Informe patológico no hay diferencia significativa, en cambio independientemente de la presencia o ausencia del virus o de las alteraciones que el tejido presenta existe mayor frecuencia celular (LT CD4, LT CD8, LT reg) a nivel de estroma.

10 RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el seguimiento clínico de los casos VPH positivos con la finalidad de determinar el riesgo de desarrollar CCU.
- Realizar el seguimiento de todos los casos para saber si la frecuencia de LT CD4 encontrada en este trabajo está relacionada con la remisión de la infección.
- Se recomienda recopilar información como: edad de inicio de vida sexual y número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos, drogas, etc. Factores que están asociados con la presencia de VPH. Además de incrementar tamaño de la muestra incluyendo lesiones de tipo NIC 2, NIC3 y carcinoma. En un proyecto de dimensiones más grande se recomienda incluir todos estos datos para una mejor evaluación.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Cancer Society (ACS). Cancer prevention and early detection facts and figures 2015-2016. Atlanta: American Cancer Society
2. Fernández IAMEa. Conocimiento del virus del papiloma humano y su vacuna por parte de mujeres de una zona rural de Querétaro, México. *Revista Enfermería Actual en Costa Rica*. 2017; 32(2).
3. Concha P X, Urrutia S T, Riquelme H G. Creencias y virus papiloma humano. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2012; 2(77)
4. Fernades V, Araújo J, Fernades M.. Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access J Clin Trials*. 2013;(5):1-12.
5. Cruz L, Cala L, Infante I, Hernández T. Gynecobstetric risk factors for cervical cancer in primary health care. *MEDISAN*. 2011; 5(15).
6. Lewis, Merle J. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud; 2004; Washington.
7. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in America's .World Health Organization; 2017.

8. Luciani, S, Winkler, J. Prevención del cáncer cervicouterino en el Perú: lecciones aprendidas del proyecto demostrativo tamizaje y tratamiento inmediato (TATI) de las lesiones cervicouterinas. In Organización Panamericana de la Salud; 2006; Washington.
9. Hernández Barragán L. Conocer la proporción de cervicitis en mujeres con factores de riesgo en una población de 145 mujeres del municipio de Asunción Ixtaltepec Lucía. Enfermedades del Tracto Genital Inferior. 2007 septiembre; 1(1).
10. Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU. (NCI). Diccionario de cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol>
11. Sales KJ, Katz AA. Inflammatory pathways in cervical cancer – the University of Cape Town’s contribution. SAMJ 2012;102(6):493-496.
12. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. NatRev Cancer. 2002;2: 59–65.
13. Barashi N, Weiss ID, Wald O, et al. Inflammation induced hepatocellular carcinoma is dependent on CCR5. Hepatology. 2013; 58(3):1021–1030.
14. Lewis, Merle J. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud; 2004; Washington.

15. Bhat, P. Mattarollo, S.R., Gosmann, C., Frazer, I.H., Leggatt, G.R. Regulation of immune responses to HPV Infection and during HPVdirected immunotherapy.. Immunological Reviews. 2011;(239):85-98.
16. Carter, J.J., Koutsky, L.A., Hughes, J.P., Lee, S.K., Kuypers, J., Kiviat, N., Galloway. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. The Journal Infectious Diseases. 2000; 181(6):1911–1919.
17. Frazer I. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. Nature Reviews Immunology. 2004; 4(1):46-55.
18. Stanley, M. Immune responses to human Papillomavirus. Vaccine, 2006; 24 (1):16-22.
19. Alves B., Tozetti A., Teixeira A. CD4 and CD8 T lymphocytes and NK cells in the stroma of the uterine cervix of women infected. ev Soc Bras Med Trop. 2010 Agosto; 43(4):425-9.
20. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. 2007. Available at: www.who.int/hpvcentre
21. Jastreboff AM, Cymet T. Role of human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. Postgrad Med J. 2002; 78(918): 225-28.

22. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997; 102(5A): 3-8.
23. García Tamayo Jorge, Molina Julia. El VPH y el cáncer cervical. UNAM México. 2012
24. Consuegra C., Molina D., Egea B., Garavito G. El virus del papiloma humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.),* 2004;19: 3-13,.
25. Vanegas V., Rubio, A.I., Bedoya, A.M., Sánchez, G.I. Estructura molecular y antigénica de la vacuna contra el virus de papiloma humano tipo 16 (VPH 16). *Acta Biológica Colombiana.* 2008; 13(3).
26. Prabhu S, Wilson D. Human papillomavirus and oral disease emerging evidence: a review. *Aust Dental J.* 2013; 2(58).
27. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 110(3):4-7.
28. Picconi, M.A., Alonio, L.V., García-Carrancá,.A., Lizano, M., Cervantes-Vazquez, G., Distefano, A.L., Mural, J.Bazan, G.T., Teyssie, A.R. Molecular variants of human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in adenocarcinomas of the cervix. *Medicina,* 2000; 60(6):889-894.
29. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324(1):17-27.

30. Alaguero. C. Genotipado del Virus del papiloma Humano en CIN1. Primera ed.: Ciencias y Letras.; 2017.
31. Van Ranst M, Kaplan J, Burk R. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol.* 1992; 10(73).
32. Muñoz N, Bosch F X, Herrero R, Castellsague, Shah KV y cols. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N England J Med.* 2003; 348(6): 518-27.
33. Máiz C. El virus del papiloma humano. *Cuadernos de Atención Primaria,* 2008; 15(1): 72-74.
34. Carreras C, Xercavins M, Checa V. *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero: Editorial Médica Panamericana; 2007.*
35. Castro-Jiménez Miguel Ángel, Vera-Cala Lina María, Posso-Valencia Héctor Jaime. Epidemiología del cáncer de cuello uterino: estado del arte. *Rev Colomb Obstet Ginecol [serial on the Internet].* 2006; 57(3): 182-189.
36. HPV: A highly prevalent sexually transmitted disease agent among female sex workers from Mexico City. *Sex Transm Dis* 2001;28(3):125-130.
37. Frazer, I.H. 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology,* 4(1):46-55. doi:10.1038/nri1260

38. Flores, E., Hoffman, L., Lee, D., Sattler, C., Lambert, P.. Establishment of the Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Life Cycle in an Immortalized Human Foreskin Keratinocyte Cell Line. *Virology* 1999; 262(2): 344-354.
39. Olga L. Rincón, Luis René Pareja, Sergio Jaramillo, Beatriz H. Aristizábal, PhD. Human papillomavirus, immune response and cervical cancer: a complex relationship. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2007; 58 (3).
40. Lewis, Merle J. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud; 2004.
41. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Americas. World Health Organization; 2017. Disponible en www.who.int/hpvcentre
42. Luciani, S, Winkler, J. Prevención del cáncer cervicouterino en el Perú: lecciones aprendidas del proyecto demostrativo tamizaje y tratamiento inmediato (TATI) de las lesiones cervicouterinas. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2006.
43. Compañía Peruana de Estudios de Mercados y Opinión Pública S.A.C. Perú Población 2017; 7.
44. Guía Técnica: Guía de Práctica Clínica para la Prevención y Manejo del Cáncer de Cuello Uterino. Ministerio de Salud; 2017.

45. Análisis de la Situación del Cáncer en el Perú. Dirección General de Epidemiología, Ministerio de Salud; 2013.
46. Jastreboff AM, Cymet T. Role of human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J.* 2002; 78(918): 225-28.
47. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997; 102(5A): 3-8.
48. Deligeoroglou, E., Giannouli, A., Athanasopoulos, N., Karountzos, V., Vatopoulou, A., Dimopoulos, K., Creatsas, G.. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* 2013
49. Song, D., Li, H., Li, H., & Dai, J.. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer (Review). *Oncology Letters.* 2015; 10, 600-606.
50. Stanley, M., Pinto, L.A., Trimble, C. Human papillomavirus vaccines – immune responses. *Vaccine.* 2012; 30(5):83-87. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.106
51. Mariani, L., Venuti, A.. HPV vaccines: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *Journal of Translational Medicine.* 2010; 8:105. doi:10.1186/1479-5876-8-105.

52. Stanley, M.. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic Oncology*. 2008; 109(2): 15-21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.02.003
53. Stern, P.L., van der Burg, S.H., Hampson, I.N., Broker, T.R., Fiander, A., Lacey, C.J., Kitchener, H.C., Einstein, M.H.. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine*, 2012; 30 (5):71-82. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.091.
54. Yao, Y., Huang, W., Yang, X., Sun, W., Liu, X., Cun, W., Ma, Y.. HPV-16 E6 and E7 protein T cell epitopes prediction analysis based on distributions of HLA-A loci across populations: An in silico approach. *Vaccine*, 2013; 31(18):2289-2294.
55. Stern, P.L., van der Burg, S.H., Hampson, I.N., Broker, T.R., Fiander, A., Lacey, C.J., Kitchener, H.C., Einstein, M.H.. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine*, 2012; 30S(5):71-82.
56. Bhat, P. Mattarollo, S.R., Gosmann, C., Frazer, I.H., Leggatt, G.R.. Regulation of immune responses to HPV Infection and during HPVdirected immunotherapy. *Immunological Reviews*. 2011; 239:85-98.
57. Bergot, A.S., Kassianos, A., Frazer, I.H., Mittal, D.. New approaches to immunotherapy for HPV associated cancers. *Cancers (Basel)*, 2011; 3(3):3461-3495.

58. Sullcahuaman A, Castro M, Mejía F, et al. Demographic characteristics of human papillomavirus detected by PCR-RFLP in peruvian women. *Rev. Perú. Med. exp. salud pública*. 2015; 32 (3).
59. Leiro V., De Chiara L., Botana M., et al. Viability of Lymph Node Samples Obtained by Echobronchoscopy in the Study of Epigenetic Alterations in Patients With Lung Cancer. *Archivos de Bronconeumología*. 2014 ; 50(6):209-262.
60. Reyna L, Gonzalez J, Araujo A. Detection and genotyping of human papillomavirus by PCR-RFLP in patients treated at the district hospital Walter Cruz Vilca La Libertad- 2015. *Pueblo Continente Journal*. 2016; 27(2), 331-34.
61. Gracia L. Detección del Genoma del Papilomavirus humano aplicando la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real. Universidad de Guayaquil. 2008
62. Berger F, de Paris F, Minuto R, de Souza L. Assessment of conventional PCR and real- time PCR compared to the gold standard method for screening *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2018
63. Bernard, F-X., Morel, F., Camus, M., Pedretti, N., Barrault, C., Garnier, J., Lecron, J-C. Keratinocytes under Fire of proinflammatory cytokines: bona fide innate immune cells involved in the physiopathology of chronic

atopic dermatitis and psoriasis. Journal of Allergy, Article 2012; ID 18725.

64. Rincón, BSc,* Pareja L, Jaramillo S, Aristizábal B. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2007; 58.(3).
65. Visser J., Nijman H. W., Hoogenboom B. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. Clinical and Experimental Immunology. 2007; 50(2):199-209.
66. Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. Indian J Med Res. 2009;130:266-76.
67. Hibma MH. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. The Open Virology Journal. 2012;6:241-8.