EVALUACIÓN DEL DAÑO CITOGENÉTICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN CON VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH), EN CÉLULAS DEL EPITELIO CERVICAL DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

LEIDY JACKELYNE MUESES MORENO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018

EVALUACIÓN DEL DAÑO CITOGENÉTICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN CON VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH), EN CÉLULAS DEL EPITELIO CERVICAL DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

LEIDY JACKELYNE MUESES MORENO

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

DIRECTORA
PhD. NOHELIA CAJAS SALAZAR

CODIRECTOR
PhD. CARLOS HERNÁN SIERRA TORRES

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018

NOTA DE ACEPTACIÓN

_____
_____
_____
_____

Directora: _____
PhD. Nohelia Cajas Salazar

Codirector: _____
PhD. Carlos Hernán Sierra Torres

Jurado: _____
PhD. Claudia Patricia Acosta Astaiza

Jurado: _____
PhD. Willian Orlando Castillo Ordoñez

Popayán, Noviembre de 2018

Dedicatoria

Mi trabajo de grado lo dedico con todo el amor y cariño a Dios, a quien le doy el honor y la gloria, mis padres, a mi hermana y a toda mi familia, por darme la fuerza para seguir adelante y brindarme la oportunidad de cumplir mis sueños.

Leidy Jackelyne Mueses Moreno

Agradecimientos

Agradezco a Dios por regalarme el don de la vida, a mis padres Javier Mueses y Alba Nelly Moreno Coral por ser mi apoyo y guía en cada momento de mi vida, por darme la oportunidad de tener un mejor futuro, por creer en mis capacidades, a mi hermana Yully Viviana Mueses Moreno, por todo su amor incondicional, por cuidarme como a la niña de sus ojos, por ser la mejor hermana del mundo y estar a mi lado de manera incondicional.

A toda mi familia la mayor riqueza que tengo, por estar ahí cuando las cosas se ponían difíciles, por ser mi principal soporte y a quienes les debo mis logros actuales y los futuros.

A la Universidad del Cauca y Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, a su directora PhD Luz Stella Hoyos Giraldo por haberme brindado todas las herramientas necesarias para formarme como persona y profesional.

A la Fundación InnovaGen IPS - Popayán con todo su equipo de trabajo, por facilitarme las muestras citológicas, abrir las puertas de su laboratorio, y hacerme sentir parte de esa hermosa familia.

A mi directora PhD. Nohelia Cajas Salazar y a mi Codirector PhD. Hernán Sierra Torres, por aceptarme y apoyarme incondicionalmente en este proceso de aprendizaje.

De manera especial a Aldair Rosero Caldon por ser un apoyo incondicional y enseñarme a superar los diferentes retos que se me presentaron, además de compartir sus conocimientos y experiencias profesionales.

A Albeiro Polanco por su generosa colaboración en la estandarización de las técnicas realizadas en este trabajo.

A Elsa Betty Velasco por su colaboración en el desarrollo del proyecto, además de su valiosa amistad y cariño recibido dentro y fuera de la universidad.

A mi mejor amiga Mónica Arias por su amistad sincera en el transcurso de mi vida escolar y universitaria y por acompañarme a superar los obstáculos cuando la vida me puso a prueba y compartir innumerables momentos de alegría.

Finalmente a mis amigos Gineth Coral y Wilmer Coral, a mis compañeros de carrera con quienes compartí experiencias inolvidables que me hicieron crecer como persona y disfrutar de la vida universitaria.

CONTENIDO

Pág.

LISTA DE TABLAS 8
LISTA DE FIGURAS 9
GLOSARIO 10
1. INTRODUCCIÓN 12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 14
3. JUSTIFICACIÓN 17
4. MARCO TEÓRICO 19
4.1 CÁNCER DE CUELLO UTERINO. 19
4.1.1 Factores de riesgo asociados al cáncer de cuello uterino 21
4.1.2 Biología de la infección por VPH 24
4.2 ALTERACIONES AL ADN 25
4.3 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD 26
4.3.1 Células con micronúcleos (MN). 26
4.3.2 Células con brotes nucleares (BR). 27
4.3.3 Células binucleadas (BN). 27
4.4 BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDAD 27
4.4.1 Células con cromatina condensada (CC). 28
4.4.2 Células cariorrécticas (CR). 28
4.4.3 Células con núcleo picnótico (PIC). 28
4.4.4 Células cariolíticas (CL). 28
5. ANTECEDENTES 29
6. OBJETIVOS 32
6.1 OBJETIVO GENERAL 32
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
7. MARCO METODOLÓGICO 33
7.1 GRUPO DE ESTUDIO 33
7.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS 33
7.3 CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH 34

7.4 PROCESAMIENTO Y TINCIÓN DE CÉLULAS CERVICALES 34
7.5 CRITERIOS PARA IDENTIFICACIÓN DE MICRONÚCLEOS Y ANOMALÍAS NUCLEARES 35
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 36
8. RESULTADOS 37
8.1 CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO 37
8.1.1 Características sociodemográficas de la población de estudio 37
8.1.2 Características clínicas de la población objeto de estudio 38
8.1.3 Hábitos alimenticios de la población 40
8.2 EFECTO GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO EN CÉLULAS CERVICALES INDUCIDO POR VPH 40
8.2.1 Frecuencia de biomarcadores en mujeres VPH negativas vs. positivas con citología negativa. 41
8.2.2 Frecuencia de biomarcadores genotóxicos y citotóxicos, de acuerdo a la presencia de lesiones pre neoplásicas en mujeres VPH positivas 42
8.2.3 Tendencia de la media de biomarcadores significativos en los diferentes tipos de lesiones cervicales respecto al genotipo de VPH 43
8.3 ASOCIACIÓN ENTRE FACTORES DE RIESGO, VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, ESTILOS DE VIDA Y LA FRECUENCIA DE LOS BIOMARCADORES GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO 47
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 48
10. CONCLUSIONES 57
11. RECOMENDACIONES 58
BIBLIOGRAFÍA 60

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Características sociodemográficas de la población de estudio…….37

Tabla 2. Características clínicas de la población…….....39

Tabla 3. Antecedentes familiares con CaCU…….....39

Tabla 4. Hábitos alimenticios de la población...……..40

Tabla 5. Frecuencia de biomarcadores en mujeres VPH negativas.....42

vs. positivas con citología negativa.

Tabla 6. Frecuencia de biomarcadores según resultado de citología en……...43
mujeres VPH negativas y positivas

Tabla 7. Frecuencia de biomarcadores en mujeres VPH negativas y……....47

positivas, ajustada por edad

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Anatomía del sistema reproductor femenino……..20

Figura 2. Epitelio cervical estratificado…….21

Figura 3. Modelo citómico de micronúcleos en células bucales.....29

Figura 4. Imágenes de biomarcadores vistas al microscopio en una.....41
magnificación de 100X

Figura 5. Media de los biomarcadores significativos en los diferentes tipos.....45
de lesiones cervicales respecto al genotipo de VPH

GLOSARIO

CaCU: Cáncer de cuello uterino

VPH: Virus del Papiloma Humano

ADN: Ácido desoxirribonucleico

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

OMS: Organización Mundial de la Salud

MN: Micronúcleos

BR: Brotes

BN: Binucleadas

PIC: Picnóticas

CR: Cariorrécticas

CL: Cariolíticas

CC: Cromatina condensada

mL: Mililitros

rpm: revoluciones por minuto

µL: Microlitros

DMSO: Dimetilsulfóxido

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino (CaCU) es una enfermedad multifactorial, asociada a factores genéticos, ambientales y estilos de vida, se ha reconocido que el principal factor de riesgo es la infección persistente con el Virus del Papiloma Humano (VPH). Estudios indican que la interacción del virus con el huésped puede generar inestabilidad genética y una posterior carcinogénesis; sin embargo, los métodos actuales de diagnóstico de CaCU no permiten identificar las mujeres VPH positivas que progresarán a CaCU; por ello, es importante evaluar estadios de lesiones a través de biomarcadores sensibles económicos y sencillos de aplicar. El objetivo fue evaluar el daño citogenético asociado a la infección por VPH en células del epitelio cervical de mujeres sanas y con lesiones intraepiteliales de cuello uterino. La población se constituyó de 184 mujeres quienes fueron agrupadas de acuerdo al diagnóstico citológico así: Grupo I citología negativa – VPH negativo (n= 69), Grupo II citología negativa – VPH positivo (n=47) y Grupo III citología anormal – VPH positivo (n=68). El procesamiento de las muestras cervicales en base líquida se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Thomas et al., 2009 para células bucales, con algunas modificaciones, y se realizó tinción específica para ADN con Feulgen Fast Green. La infección por VPH, incrementó en la frecuencia de MN en mujeres con citología negativa, aunque estadísticamente no fue significativo. La presencia de lesiones intraepiteliales incrementaron de manera significativa las frecuencias de los biomarcadores genotóxicos y disminuyeron las frecuencias de los biomarcadores citotóxicos. La edad tuvo asociación con el daño citogenético. Por tanto, MN es un biomarcador sensible para evaluar el daño citogenético causado por el VPH y podría ser utilizado como una herramienta adicional a la prueba de Papanicolaou, para identificar a las mujeres con mayor riesgo a desarrollar CaCU.

Palabras clave: cáncer, cuello uterino, Virus del Papiloma Humano, biomarcador, micronúcleos.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino (CaCU) es la tercera causa más común de cáncer en mujeres en el mundo. Alrededor del 80% de los casos se producen en países en vías de desarrollo como Colombia, donde hay acceso limitado a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento precoz (Jemal et al., 2011). La prueba de Papanicolaou (Pap) es el método de detección estándar para cáncer de cuello uterino (Peirson et al., 2013), sin embargo, su uso ha tenido poco impacto en la incidencia y mortalidad del CaCU, debido a la baja sensibilidad de la prueba (Murillo et al., 2010), con una tasa de 20% de falsos negativos y falsos positivos (Nanda et al., 2000; Sawaya et al., 2005; Hoda et al., 2013).

La infección crónica con el Virus del Papiloma Humano (VPH) es el factor de riesgo necesario, pero no suficiente para el progreso de lesiones neoplásicas a cáncer (Bosch et al., 2002). Estudios han demostrado que el VPH está presente en más del 99% de los casos de cáncer de uterino y una infección persistente con tipos oncogénicos de alto riesgo principalmente 16 y 18 se asocia a una lesión cervical con una posible evolución maligna (Herrigton, 1994). La expresión de proteínas virales transforma a las células que infecta mediante la interacción de oncoproteinas virales (E6 y E7), con proteínas del huésped (p53 y Retinoblastoma) causando alteración en funciones de regulación del crecimiento celular, replicación celular y reparación de daños, que pueden desencadenar el proceso carcinogénico (Laughlin y Munger, 2009). Una de las principales características de este proceso es la pérdida de la estabilidad del genoma, incluida la estabilidad cromosómica (Cortés et al., 2010). El uso de biomarcadores citogenéticos podría ser de gran utilidad para evaluar la ocurrencia de este mecanismo importante en la etiología de la enfermedad.

El ensayo de micronúcleos es un método citogenético que permite detectar alteraciones clastogénicas o aneugénicas, originadas a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros respectivamente, que no se incluyeron en el núcleo principal durante la división celular y que se observan como micronúcleos (Bhat et al., 2016). La prueba de micronúcleos es un biomarcador de riesgo a cáncer validado en linfocitos de sangre periférica (Bonassi et al., 2011; Holland et al., 2008), adicionalmente, se han realizado estudios en células exfoliadas del cuello uterino, cavidad oral, esófago y vejiga, para la detección temprana del daño del ADN en los individuos y a futuro se espera validar la prueba en éste tipo de tejidos (Cortes y Dávila, 2014). El ensayo permite además identificar biomarcadores de muerte celular a través de la evaluación de la frecuencia de células picnóticas, cariorrexis, cromatina condensada y cariólisis (Thomas et al., 2009).

El presente estudio caso control, evaluó el biomarcador de MN en citologías de base líquida en tres grupos de mujeres procedentes del Departamento del Cauca, distribuidas en tres grupos de estudio así: con citología negativa - VPH negativo, citología negativa - VPH positivo, con citología anormal - VPH positivo. Los resultados descritos aquí sugieren que el biomarcador de MN podría incorporarse en los procedimientos de detección de rutina junto con el Papanicolaou, como criterio adicional para la detección temprana de daños citogenéticos, para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba en la detección y reducción de la tasa de falsos negativos. Sin embargo, se necesitan más estudios que permitan confirmar esta sugerencia.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCU es una de las principales causas de muerte en la población femenina en países en vía de desarrollo (Eluf y Nascimento, 2001). En 2018 se diagnosticaron 569.847 casos nuevos de CaCU en todo el mundo, de los cuales hubo un estimado de 311.365 muertes por esta enfermedad, representando el 7,5% de todas las muertes por cáncer femenino. En América Latina y el Caribe es el tercer tipo de cáncer más común, con un estimado de 56.187 casos nuevos y 28.318 decesos que corresponden al 8.7% de todas las muertes por éste cáncer. En Colombia es el tercer cáncer más común con 3.853 casos nuevos, de los cuales se han registrado 1.775 decesos correspondientes al 7.6% de todas las muertes por éste cáncer (GLOBOCAN, 2018). En el Departamento Cauca en el año 2014 se reportaron 48 muertes por CaCU, y en 2018 se han reportaron hasta el momento 62 casos nuevos de CaCU, sin ninguna muerte registrada (SECRETARIA DE SALUD DEL CAUCA, 2018). El CaCU tiene mayor incidencia y morbilidad en las mujeres jóvenes entre los 30 a 50 años, que al diagnosticarse representa en el mundo casi un billón de dólares en pérdidas económicas por la muerte prematura o discapacidad, por lo que la prevención debe considerarse una prioridad de salud pública (Ciapponi et al., 2011).

Los factores de riesgo como tabaquismo, uso de anticonceptivos, inicio temprano de relaciones sexuales, asociados al CaCU son muy prevalentes en poblaciones en vía de desarrollo como Colombia; sin embargo, el factor de riesgo más importante es la infección persistente por VPH (Herrigton, 1994). La mayoría de las personas sexualmente activas de ambos sexos, la adquieren en algún momento de su vida y pueden transmitirla sin saberlo (Dunne et al., 2007). Se estima que el 5% de las mujeres infectadas por VPH de alto riesgo contraen infecciones persistentes y progresan a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL siglas en inglés), mientras que cerca del 90% en el transcurso de 12 a 36 meses no tienen evidencia del tipo

viral adquirido, debido a la interacción de múltiples factores como el tipo viral, carga viral, estado inmunitario y factores genéticos (Hildesheim et al., 1994).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los últimos 30 años las tasas de CaCU han disminuido considerablemente, debido a la implementación de la prueba diagnóstica convencional para detección conocida como prueba de Papanicolaou o frotis de Pap (De Guglielmo y Rodríguez, 2010; OMS, 2018), siendo hasta el momento la prueba más exitosa en la detección y prevención del cáncer; sin embargo no es infalible, debido a la baja sensibilidad, que oscila entre el 30 y 60% (Murillo et al., 2010).

En Colombia la cobertura de la citología es cercana al 76% (Piñeros et al., 2007), sumado a que los rubros asignados para implementar y mantener la infraestructura sanitaria necesaria, incluidos los recursos humanos y de laboratorio no son suficientes, dificultan el acceso a un diagnóstico temprano del CaCU en la población femenina (OMS, 2007). Así mismo, existen limitaciones inherentes a la naturaleza de la prueba, por ejemplo, cuando la fijación de la muestra es de baja calidad, permanecen restos celulares en el extendido celular (flujo vaginal, eritrocitos, leucocitos) que dan lugar a una coloración alterada, además, al transferir las células desde la espátula o la escobilla al portaobjetos, la muestra adherida en las cerdas del cepillo puede perderse, debido a que estos son descartados (Martínez, 2005; Almonte et al., 2010).

Debido a las limitantes de la citología convencional para la detección del CaCU, se han desarrollado nuevas tecnologías como la prueba de citología en base líquida, que garantiza mayor representatividad de la población celular del tejido del endocérvix, exocérvix y zona de transformación, y por tanto hay un aumento en la sensibilidad de la prueba a un 65% (Ricci et al., 2004). De igual manera, la muestra se preserva en un medio líquido logrando una mayor limpieza de las células lo que facilita su análisis en el microscopio. Además, de la misma muestra se pueden

realizar otras pruebas como el diagnóstico del VPH (Weintraub y Morabia, 2000). Sin embargo, la citología en base líquida tiene un costo económico tres veces mayor que la prueba convencional, lo que dificulta que las mujeres en países en vía de desarrollo como Colombia tengan acceso a ella (Zambrano y González, 2015).

La falta de información de la población sobre el impacto que genera el CaCU, especialmente en áreas rurales donde el nivel de escolaridad es bajo y se desconocen los principales factores de riesgo, y esto hace que ésta problemática tenga mayor relevancia (Hulka, 1982; Jansen y Shaw 2004). Por tal razón, instituciones internacionales como la OMS y nacionales como el Ministerio de Salud y Protección Social, resaltan la necesidad de implementar estrategias eficaces dirigidas a controlar factores de riesgo y disminuir la incidencia y mortalidad por esta enfermedad. Para este fin, se elaboran planes para el control del cáncer donde se establecen los componentes para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de lesiones cervicales precancerosas y cáncer (OMS, 2007). Además la realización de investigaciones aplicando biomarcadores contribuye al mejoramiento de estos planes.

No obstante, hay carencia de estudios que incluyan biomarcadores sensibles y económicos para identificar cambios en la morfología celular del epitelio cervical, daños al ADN, aneuploidías o muerte celular asociados a la presencia de VPH. Por lo tanto, el ensayo citómico de MN tiene un gran potencial para ser utilizado en estudios epidemiológico-moleculares, para evaluar la sensibilidad del biomarcador. Con base en lo anterior se plantearon las siguientes preguntas de investigación: **¿La inestabilidad genómica causada por la infección por VPH puede ser evidenciada con los biomarcadores del ensayo citómico de micronúcleos en células del epitelio cervical? Si es así, la presencia de lesiones pre neoplásicas afecta la frecuencia de los biomarcadores? ¿Existe asociación entre factores de riesgo, variables sociodemográficas, estilos de vida y la frecuencia de los biomarcadores genotóxicos y citotóxicos?**

3. JUSTIFICACIÓN

La OMS entre los “Objetivos de Desarrollo del Milenio” ha incluido mejorar la salud materna y promover la igualdad entre los sexos y la autonomía de la mujer. La importancia de la mujer en el núcleo familiar y social radica en los diferentes aportes en sus funciones tales como reproductivas, productivas y económicas. La detección temprana de problemas de salud en la mujer es importante para fortalecer su estabilidad social y emocional, la economía familiar y los sistemas de salud (Naciones Unidas, 2015).

El CaCU ha captado la atención de muchas organizaciones al cuidado de la salud debido a la mortalidad causada por esta enfermedad en la población femenina. Una de las razones es que las primeras fases de la enfermedad son asintomáticas y por eso su diagnóstico temprano es complejo (Civetta y Civetta, 2011). Las recomendaciones de investigadores en el tema, resaltan la importancia de conducir estudios de monitoreo y programas de intervención efectivos en poblaciones en riesgo (Campos et al., 2008; Sundararajan et al., 2017; Cassel et al., 2014). Por tanto, es necesario buscar opciones complementarias a las pruebas convencionales, que permitan realizar un diagnóstico acertado especialmente en las etapas tempranas de la enfermedad.

El presente estudio utilizó el ensayo citómico de MN, una técnica citogenética sensible, para evaluar parámetros citotóxicos y genotóxicos incluyendo alteraciones citocinéticas (células binucleadas), muerte celular (células con cromatina condensada, cariorrécticas, picnóticas y cariolíticas) y daños en el ADN (micronúcleos y brotes nucleares) (Didenko, 2011). Además, posee importantes ventajas en el proceso de preparación de extendidos celulares así como su tinción, ya que son rápidos, económicos y el conteo de los micronúcleos se lleva a cabo fácilmente en cualquier tejido que esté en continua proliferación (Heddle, 1991). El

biomarcador de Mn evaluado en este estudio está en proceso de ser validado como indicador temprano de riesgo a desarrollar cáncer por The HUMN (XL) Project, por lo tanto los resultados obtenidos, pueden contribuir a la validación del biomarcador debido a que se incluyó diferentes estadios de lesiones del cuello uterino que representan la progresión de la enfermedad.

Por otro lado, éste estudio utilizó muestras de citología en base líquida, lo que permite la obtención de una mayor representatividad de la población celular, correspondientes a las diferentes zonas del cuello uterino; y al mismo tiempo los extendidos celulares son más limpios, aspectos que favorecen a una visualización clara del biomarcador de MN y otras Anomalías Nucleares (AN), a diferencia de otros estudios realizados con la citología convencional, donde se reportó mayor cantidad de elementos que pudieron ser considerados como falsos positivos como células inflamatorias (eritrocitos, leucocitos) y cuerpos queratohialinos (Campos et al., 2008; Cortés et al., 2010; Aires et al., 2011; Bueno et al., 2014; Cassel et al., 2014; Bhat et al., 2016).

En los previos estudios del biomarcador de MN los métodos de tinción utilizados fueron Papanicolaou (Gayathri et al., 2012; Cassel et al., 2014; Shi et al., 2015; Makkar, 2018) o Giemsa (Sundararajan et al., 2017; Campos et al., 2008; Cassel et al., 2014), y hasta el momento un estudio empleó el método de tinción diferencial de Feulgen Fast Green (Cortés, Dávila et al., 2010), basado en la identificación altamente específica de ácidos nucleicos del ADN (Stowell, 1945), y por tanto este estudio utilizó Feulgen Fast Green, esencial para evitar la clasificación errada de elementos no nucleares como MN. La población en el único estudio que evaluó una asociación entre la frecuencia de MN y la infección por VPH en mujeres sanas (Cassel et al., 2014), y los estudios que evaluaron el biomarcador de MN en la progresión de lesiones intraepiteliales no superaron las 180 mujeres (Aires et al., 2011; Campos et al., 2008; Cortés et al., 2010; Gashi et al., 2018), por esto, éste estudio amplio el número de la población a conveniencia, teniendo en cuenta que al

aumentar el tamaño de la muestra, se incrementa el poder estadístico para detectar diferencias entre los grupos de estudio (Jiménez, 2012).

Finalmente, ninguno de los estudios realizados hasta el momento incluyen la combinación de metodologías utilizadas en este estudio con las cuales se buscó incrementar la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores evaluados a partir de células obtenidas por citología en base líquida, tinción diferencial de Feulgen Fast Green específico para ADN, genotipificación del VPH a través de la prueba cualitativa in vitro COBAS 4800 HPV y aumento en la muestra poblacional.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 CÁNCER DE CUELLO UTERINO.

El cuello uterino es la parte fibromuscular inferior del útero está constituido por dos tipos de epitelio, el endocervical que es cilíndrico, mucosecretor y el epitelio exocervical que es plano pavimentoso (**Figura 1)** (Cardinal et al., 2002). Al sitio de unión de estos epitelios se le llama zona de unión escamo- columnar (UEC) o zona de transformación, es un área dinámica donde se transforma el epitelio cilíndrico mucosecretor en epitelio pavimentoso y su ubicación varía de acuerdo a la edad, la influencia de las hormonas ováricas y estilo de vida de la mujer (Sellors y Sankaranarayanan, 2003).

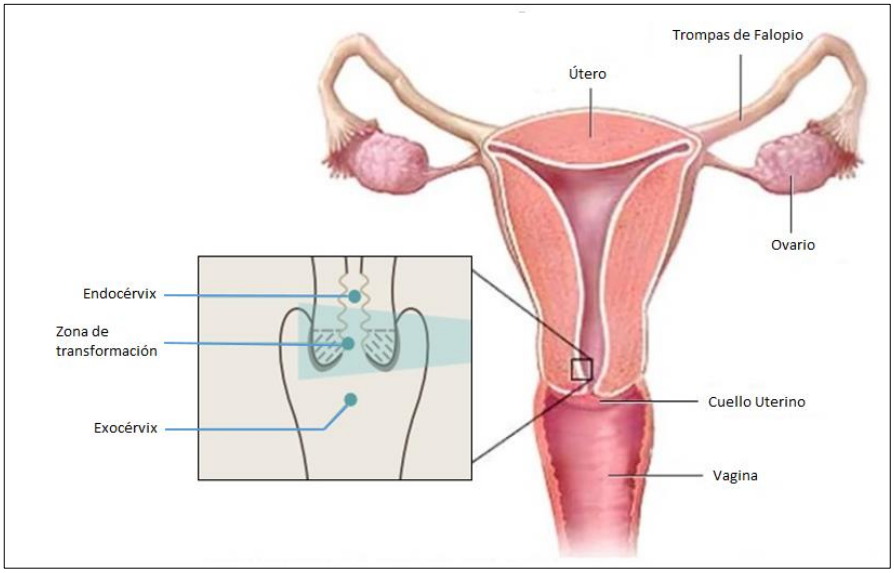


Figura 1. Anatomía del sistema reproductor femenino, (Modificada de Mayo Foundation for Medical Educationand Research, 2018) con ampliación del cuello uterino (Modificado de Vassilakos et at., 2017).

El epitelio que recubre el exocérvix y la mucosa vaginal está constituido por tres tipos celulares que son: células basales y parabasales, células intermedias, células superficiales **(Figura 2)**. Las células basales y parabasales son las células de menor tamaño, se localizan en la profundidad del epitelio, su forma es redonda u ovoide, tienen un área nuclear de 45 a 90 micras cuadradas; las células intermedias son células poligonales con citoplasma rico en glicógeno, su núcleo es grande vesicular, este tipo de células tienden a exfoliarse en grupos; las células superficiales al igual que las intermedias son poligonales, su núcleo es picnótico, mide aproximadamente 6 micras y no se identifica en el ninguna estructura (Llusiá y Núñez, 1993; Ruiz et al., 2005).

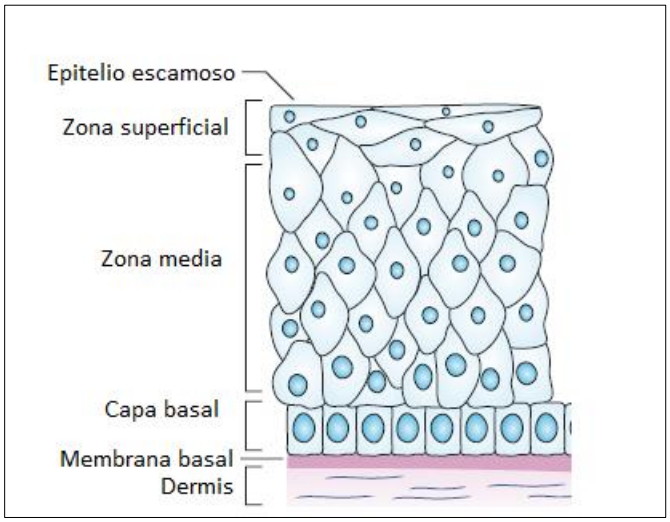


Figura 2. Epitelio cervical estratificado (Modificado de Woodman et al., 2007)

El CaCU se origina en las células de la zona de transformación, sin embargo sus mecanismos no están claros. Los dos tipos más comunes de CaCU son el carcinoma de células escamosas, que se origina de células del exocérvix, y el adenocarcinoma, que se origina de células glandulares productoras de mucosidad del endocérvix. Con menor frecuencia se presentan carcinomas adenoescamosos o carcinomas mixtos, que presentan características de los dos tipos de cáncer anteriormente descritos (Ruiz et al., 2005).

4.1.1 Factores de riesgo asociados al cáncer de cuello uterino

- **Virus del Papiloma Humano.** Es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del CaCU, es considerado como agente causal necesario pero no suficiente (Bosch et al., 2002). El VPH es de tamaño pequeño, con una estructura icosaédrica y ADN circular de doble cadena. Su genoma contiene 8000 pares de bases y pertenece a la familia Papillomaviridae (De Villiers et al., 2004). Está formado por tres regiones, una región no codificante, que controla la transcripción viral (URR siglas en inglés), una región codificante con genes de expresión temprana o “E” (early) con marcos de lectura abierta (ORFs, siglas en inglés) E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7, que codifican proteínas no estructurales involucradas en

la regulación de las funciones virales y producción de partículas infecciosas y una región con genes de expresión tardia o “L” (late) con 2 ORFs L1 y L2, que codifican proteínas estructurales del virión (Ruiz et al., 2005; Burk et al., 2009).

Estudios epidemiológicos han demostrado que los tipos de VPH pueden subdividirse en dos grupos de acuerdo a su potencial oncogénico: VPH de bajo riesgo (principalmente VPH 8, 11, 40, 42, 43, 47 y 61), generalmente presentes en las lesiones benignas (condilomas, verrugas genitales y neoplasias intraepiteliales de bajo grado), con mínimo riesgo de progresión a lesiones de alto grado; VPH de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), los cuales bajo una infección persistente pueden inducir a CaCU, los genotipos asociados más comunes son 16 y 18 (Woodman et al., 2007).

- **Tabaquismo.** El tabaco aumenta el riesgo de progresión de la infección por VPH entre 2 a 4 veces frente a los no fumadores, ya que produce alteración de la inmunidad local en el cuello uterino (Ponce et al., 1993; Rosell et al., 2007). Se ha identificado la presencia de nicotina, cotinina y otros mutágenos derivados del tabaco, en células cervicales de mujeres fumadoras con lesión intraepitelial (Thun et al., 2000).

- **Anticonceptivos.** El consumo de anticonceptivos orales por más de 5 años se asocia con un aumento doble en el riesgo a CaCU, comparado con mujeres que nunca los habían usado, se afirma que esto se debe a que estrógenos y progestágenos potencian la expresión de genes de VPH en el cuello uterino, a través de mecanismos de receptores de progesterona (NR3C3) y elementos de respuesta hormonal en el genoma viral (Moreno et al., 2002).

- **Inicio temprano de relaciones sexuales.** Esa relación se ha explicado considerando que la zona de transformación del epitelio cervical es más proliferativa y especialmente susceptible a alteraciones por agentes transmitidos sexualmente,

entre ellos el VPH, durante la pubertad y la adolescencia. El riesgo de lesión intraepitelial cuando el primer coito se tiene a los 17 años o menos es 2,4 veces mayor que cuando este se tiene a los 21 años (Bosch et al., 1995).

- **Número de compañeros sexuales.** Existe una relación directamente proporcional entre el riesgo de lesión intraepitelial y el número de parejas sexuales, debido al aumento en la exposición al VPH (Hart et al., 2001; Bosch et al., 2002).

- **Alta paridad.** Se ha establecido que mujeres con dos o más hijos tienen un riesgo 80% mayor respecto de las nulíparas de presentar lesión intraepitelial, se cree que con cada embarazo la inmunosupresión o su flujo hormonal aumentan la susceptibilidad a la infección por VPH (Muñoz et al., 2002).

- **Co-infecciones.** Relacionado con microorganismos causantes de Enfermedades de transmisión sexual (ETS), tales como Virus del Herpes Simple tipo 2 (HVS-2), *Chlamydia trachomatis* (CT) y Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Para los cuales ya se ha demostrado alguna asociación al CaCU, debido a la reacción inflamatoria desencadenada por los antígenos de dichos microorganismos, y activación de células del sistema inmunitario (monocitos, leucocitos polimorfonucleares).

En Colombia, en el Departamento del Cauca, se realizó la identificación de los principales factores de riesgo asociados a lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, los resultados sugieren que la presencia de VPH junto con otros cofactores como la multiparidad (OR=4,1; IC 95%=1,62-10,6) y la exposición a carcinógenos presentes en el humo de leña (OR=7,3; IC 95%=3,00-19,4) aumentan el riesgo a desarrollar CaCU (Sierra et al., 2012).

4.1.2 Biología de la infección por VPH

Los viriones del VPH infectan las células basales de la zona de transformación del huésped y se replican durante periodos variables de tiempo (Moody y Laimins, 2010). En la replicación viral se expresan las oncoproteínas "tempranas" E1 y E2 mientras que en capas más distales, se expresan E6 y E7 (Doorbar, 2005). E6 interactúa con varias proteínas reguladoras de ciclo celular del huésped, la más conocida es la unión a la proteína E6AP, que regula la transcripción de células proliferantes ocasionando una degradación proteolítica del gen p53 mediada por la ubiquitina (Woodman et al., 2007).

La unión de E7 a la proteína pRB activa el factor de transcripción E2F, que desencadena la expresión de las proteínas necesarias para la replicación del ADN, como consecuencia, se anula la dependencia del control del ciclo celular y se retrasa la diferenciación normal de los queratinocitos (Schiffman et al., 2007) . A medida que las células infectadas se diferencian en células escamosas, se expresa la proteína E4 y las proteínas tardías L1 y L2, que forman el virión completo que es liberado en las capas superiores del epitelio cervical sin producir lisis celular (Moody y Laimins, 2010).

La oncoproteína E5 aumenta la acción de las quinasas celulares, que promueven la proliferación y disminuyen la diferenciación celular, aumentando la proporción de células basales y disminuyendo el número de células diferenciadas. Así mismo inhiben la acidificación de endosomas y la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC), fundamentales para la respuesta inmune mediada por linfocitos T (Tindle, 2002). La pérdida de las interacciones entre los péptidos antigénicos con las moléculas del MHC-II en la superficie celular, permiten a las células infectadas escapar al reconocimiento inmune del huésped y favorecen su persistencia (Zhang et al., 2003). Cuando se produce una ruptura en la región E2 se predispone a las células infectadas a la transformación celular (displasia), el

tumor invasivo rompe la membrana basal e invade el tejido subepidérmico (Burd, 2003).

4.2 ALTERACIONES AL ADN

Las células con frecuencia sufren daños en el ADN que alteran la información genética de un organismo. Agentes físicos (radiación ultravioleta, gamma y alfa), químicos (como las especies reactivas del oxígeno EROs y hormonas) y biológicos (virus, bacterias y hongos), además de procesos como la hidrólisis de bases (desaminación, depurinación y depirimidinación), defectos en la replicación del ADN y problemas inmunitarios, pueden inducir daño al ADN (Henderson et al., 1993; Sancar et al., 2004).

Existen diferentes tipos de lesiones en el ADN como ruptura sencilla o doble de cadena, apareamiento erróneo de bases, entrecruzamiento entre cadenas y formación de aductos (Sancar et al., 2004). Para proteger a la célula de posibles alteraciones, existen mecanismos de control muy eficientes entre los puntos de una etapa y otra del ciclo celular (Blow, 1993; Ivanchuk y Rutka, 2004). Entre los mecanismos de reparación se incluyen la reparación directa, reparación por escisión bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por apareamiento erróneo (MMR) y reparación recombinacional. Si las células albergan defectos en la respuesta de daños y no reparan el ADN dañado, se causaría inestabilidad genómica y como resultado se conduciría a la transformación celular (Vogelstein et al., 2010).

Cuando los genes de control de reparación del ADN sufren daños, las células son más susceptibles a un desorden genético (Pitot et al., 1981). Se presenta activación de genes que estimulan la proliferación o la protección contra la muerte celular (oncogenes) y se inactivan genes que normalmente actuarían inhibiendo la proliferación (genes supresores de tumor). El cáncer surge de la acumulación de

alteraciones genéticas en la estructura del ADN, que confieren a una célula neoplásica inicial propiedades de crecimiento ilimitado, autosuficiencia y resistencia a los mecanismos reguladores de la homeostasis (Hahn y Weinberg 2002).

La carcinogénesis consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión. En la iniciación, un compuesto denominado mutágeno de carácter físico, químico o viral, interactúa con el ADN y cambia la estructura genética, predisponiendo a las células a desarrollar tumores; la promoción es la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor donde participan factores y receptores de crecimiento; la progresión implica la capacidad de invadir tejidos vecinos a distancia por parte de la célula tumoral maligna, este estado se puede desarrollar a partir de células en estado de promoción o bien directamente a partir de células normales como resultado de la administración de dosis relativamente altas (dosis citotóxicas) de agentes carcinógenos (Colville y Willoughby, 1997; Muriel y Serrano 2004). En la metástasis las células cancerosas se separan del sitio donde se formaron inicialmente (cáncer primario), se desplazan por medio del sistema vascular o linfático, y forman nuevos tumores (tumores metastásicos) en otras partes del cuerpo (Alizadeh, et al., 2014).

4.3 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD

El biomarcador de micronúcleos es útil para evaluar la inestabilidad genética o detectar la pérdida de material genético inducida por agentes genotóxicos en células exfoliadas (Fenech, 2002).

4.3.1 Células con micronúcleos (MN).

Los micronúcleos son cuerpos extranucleares pequeños, que se forman durante el proceso de división celular, provienen de fragmentos de cromatina o cromosomas enteros (Bhat et al., 2016). Entre los mecanismos que pueden contribuir a la formación de micronúcleos están: estrés metabólico causado por el crecimiento

tumoral, productos clastogénicos liberados de las células tumorales, la presencia de VPH y el déficit de folato y vitamina B12 **(**Fenech and Crott 2002; Gayathri et al., 2012).

4.3.2 Células con brotes nucleares (BR).

Contienen núcleos con una aparente constricción aguda en un extremo del núcleo que sugiere la eliminación de material nuclear por brotación. El brote nuclear y el núcleo están por lo general muy cerca y parecen estar unidos entre sí, tiene las mismas propiedades morfológicas y de tinción que el núcleo principal; no obstante, su diámetro puede variar de una mitad a un cuarto (Bolognesi et al., 2013).

4.3.3 Células binucleadas (BN).

Contienen dos núcleos principales, ambos con morfología y tinción similar a un núcleo normal, generalmente cercanos o incluso pueden hacer contacto; probablemente se relacionan con alguna interferencia al final de la división celular. Se ha identificado que una mala segregación de los cromosomas es más frecuente en las células binucleadas que no logran completar la citocinesis (Thomas et al., 2009).

4.4 BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDAD

Tolbert et al., (1991), describe otras anomalías nucleares (AN), que pueden ser fenómenos que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular, además de ser indicadores de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular. El mecanismo de formación o su significado biológico de cada una de estas AN no es claro; sin embargo, bajo condiciones patológicas o de exposición (tabaco, alcohol, drogas y quimioterapia antineoplásica), se observan altas frecuencias de células con AN (Torres y Ramos, 2013).

4.4.1 Células con cromatina condensada (CC).

Estas células tienen núcleos intensamente teñidos, con regiones condensadas o cromatina agregada exhibiendo un patrón nuclear estriado, la condensación puede ser mayor en unas áreas que en otras, estas células al igual que las cariorrécticas terminan con la fragmentación del núcleo y es posible que estén en etapas tempranas de apoptosis aunque dicha información aún no ha sido comprobada (Thomas et al., 2009).

4.4.2 Células cariorrécticas (CR).

Estas células presentan un núcleo que se caracteriza por agregación de la cromatina nuclear. Con respecto a las células de cromatina condensada, estas tienen un patrón salpicado, indicativo de la fragmentación nuclear que conduce a la eventual desintegración del núcleo. Estas células tal vez están pasando por una etapa tardía de apoptosis pero esto aún no ha sido comprobado (Thomas et al., 2009).

4.4.3 Células con núcleo picnótico (PIC).

Estas células se caracterizan por tener un núcleo pequeño, con alta densidad de material nuclear uniforme e intensamente teñido. El diámetro del núcleo es aproximadamente de 1/3 del núcleo normal; sin embargo, el mecanismo de su formación sigue siendo desconocido, hasta el momento únicamente se correlaciona con diferenciación y maduración de las células epiteliales (Tolbert et al., 1991; Thomas et al., 2009).

4.4.4 Células cariolíticas (CL).

Estas células están completamente vacías de ADN y por lo tanto no tienen núcleo, es probable que representen una fase muy avanzada en el proceso de muerte

celular. La correlación positiva entre células picnóticas y en cariólisis, sugiere que estas últimas, se derivan directamente a partir de células con cromatina condensada o indirectamente a través de células picnóticas (Thomas et al., 2009).

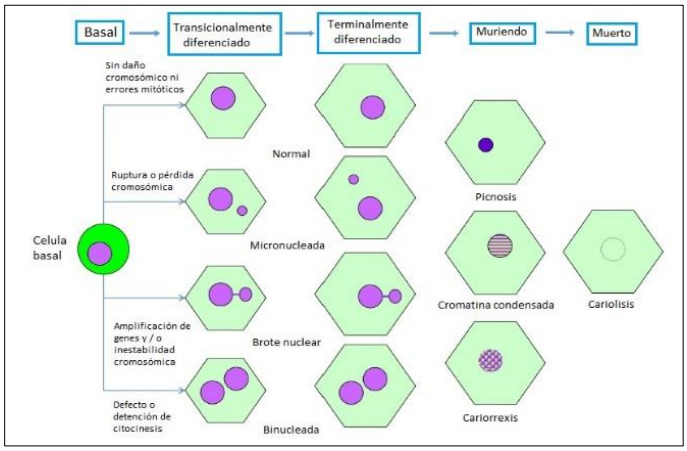


Figura 3. Modelo citómico de micronúcleos en células bucales. Representación del origen de los biomarcadores genotóxicos y citotóxicos (Modificado de Bolognesi et al., 2013).

5. ANTECEDENTES

Harald Zur Hausen, fue el primero en demostrar por medio de experimentos de hibridación, que las verrugas genitales y los tejidos de cáncer de cérvix, contienen el genoma del VPH (Ferrá et al., 2011). El VPH al igual que muchos otros virus, ha desarrollado mecanismos sofisticados para evadir las defensas del huésped. Entre estas una muy importante es bloquear la apoptosis para evitar la destrucción de las células infectadas (Woodman et al., 2007).

Actualmente el uso de biomarcadores ha permitido ofrecer herramientas de información para la evaluación de factores de riesgo asociados a la exposición a agentes ambientales (Arango, 2012). Entre los diferentes tipos de biomarcadores citogenéticos, MN ha sido evaluado en diferentes tejidos de diversas poblaciones

humanas para determinar riesgo a cáncer, por causa de diferentes agentes genotóxicos (solventes orgánicos, humo de biomasa, tabaco, alcohol y quimioterapia antineoplásica entre otros) (Martins y Boschini, 2003; Carrard et al., 2007), donde se ha demostrado el efecto potenciador de los agentes genotóxicos y citotóxicos sobre el índice de MN.

A nivel mundial pocos estudios epidemiológicos moleculares han sido realizados para establecer la asociación entre MN y la infección por VPH en mujeres sanas (Cassel et al., 2014). Sin embargo, los estudios realizados en diferentes grupos poblacionales de países como India, China, Brasil y México, han establecido una relación entre aumento en la frecuencia de MN y los estadíos de lesiones cervicales (ASC-US, LSIL HSIL) asociados a la infección por VPH (Gayathri et al., 2002; Gandhi et al., 2003; Campos et al., 2008; Cortes et al., 2010; Bueno et al., 2014; Sundararajan et al., 2017; Gashi et al., 2018). Encontrando de manera consistente que la presencia de cepas de alto riesgo (16 y 18) aumenta la frecuencia del biomarcador en los casos de HSIL y carcinoma invasivo (Cortés et al., 2010; Cassel et al., 2014; Shi et al., 2015). Previos estudios realizados con ensayo citómico completo, establecieron un aumento proporcional entre la frecuencia de apoptosis y el progreso a lesiones intraepiteliales de alto grado (Bhat et al., 2016; Makkar, 2018). En contraste a esos resultados hubo un reporte de una disminución en la frecuencia de apoptosis en lesiones intraepiteliales de alto grado (Aires et al., 2011). Los estudios realizados hasta el momento con el biomarcador de MN han utilizado diferentes métodos de tinción, unos no son específicos para ADN como Papanicolaou (Gayathri et al., 2012; Cassel et al., 2014; Shi et al., 2015) y Giemsa (Sundararajan et al., 2017; Campos et al., 2008; Cassel et al., 2014), sólo uno utilizó el método de tinción específica para ADN de Feulgen Fast Green (Cortés, Dávila et al., 2010). Papanicolaou es un método de tinción policrómica que permite visualizar células normales y malignas de muestras procedentes de diferentes órganos, cavidades y líquidos; Giemsa es un método de tinción diferencial, que actualmente se utiliza para distinguir células madres, células sanguíneas, cromosomas, virus,

bacterias, también identifica cuerpos de queratina en citoplasma, los cuales pueden ser similares morfológicamente a MN (Nersesyan et al., 2006) y generar errores en lectura de la frecuencia del biomarcador; Feulgen Fast Green es un método que se basa en la identificación altamente específica de ácidos nucleicos del ADN, donde la intensidad de la tinción es proporcional a la concentración de ADN (Chieco y Derenzini ,1999; Bolognesi et al., 2013).

El tamaño de la muestra en estudios que establecieron una asociación entre VPH positivo y aumento en la frecuencia de MN en mujeres con citología normal y la mayoría de los estudios que evalúan el biomarcador de MN en el progreso de lesiones cervicales no superaron las 180 mujeres (Campos et al., 2008; Cortés et al., 2010; Aires et al., 2011; Cassel et al., 2014; Makkar, 2018). Para evaluar el biomarcador de MN se han utilizado diferentes tipos de tejidos como células uroteliaes (Sundararajan et al ., 2017; Gandhi et al., 2003), linfocitos y células bucales (Gashi et al., 2018), células cervicales de citología convencional (Campos, Días et al., 2008; Cortés, Dávila et al., 2010; Aires, Meireles et al., 2011; Bueno, Silva et al., 2014; Bhat, Vijaya et al., 2016) y células cervicales de citología en base líquida, donde se pudo obtener mayor representatividad de la población celular de las diferentes zonas del cuello uterino y unos extendidos celulares más limpios (Shi et al., 2015; Adam et al., 2015).

Con el conocimiento adquirido y con la obtención de datos epidemiológicos, este estudio atendió las recomendaciones dadas por los investigadores para evaluar la sensibilidad de la prueba citómica asociada al diagnóstico de VPH, además adaptó metodologías más acertadas y con estos resultados se podría contribuir a la validación del biomarcador de MN en riesgo a desarrollar CaCU.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el daño citogenético asociado a la infección con Virus del Papiloma Humano (VPH), en células del epitelio cervical de mujeres sanas y con lesiones intraepiteliales de cuello uterino.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar el daño citogenético asociado a la infección con Virus del Papiloma Humano (VPH), en mujeres con citología negativa.

- Establecer el efecto de la presencia de lesiones pre neoplásicas en la frecuencia de biomarcadores genotóxicos y citotóxicos de mujeres VPH positivas.

- Evaluar la asociación entre factores de riesgo, variables sociodemográficas, estilos de vida y la frecuencia de los biomarcadores genotóxicos y citotóxicos en los grupos de estudio.

7. MARCO METODOLÓGICO

7.1 GRUPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio caso control no pareado, que incluyó 184 mujeres provenientes del Departamento del Cauca, con edades entre los 25 y 65 años, agrupadas de acuerdo al resultado del diagnóstico citológico y prueba de VPH de la siguiente manera: Grupo I (grupo de referencia) citología negativa – VPH negativo (n= 69), Grupo II citología negativa – VPH positivo (n=47) y Grupo III citología anormal – VPH positivo (n=68). El tamaño de la muestra poblacional se determinó por conveniencia, procurando que el número de mujeres de los grupos de estudio sea representativo y equitativo para realizar los análisis estadísticos correspondientes. Los criterios de exclusión fueron haber recibido tratamientos de radiación y colposcopia en los últimos 6 meses.

Para establecer la tendencia de la media de biomarcadores significativos en los diferentes tipos de lesiones cervicales respecto al genotipo de VPH, las mujeres se agruparon de la siguiente manera: citología negativa – VPH positivo (n= 47), ASC-US/ LSIL – VPH positivo (n=49), HSIL – VPH positivo (n= 19), los genotipos de VPH identificados fueron: VPH 16 (n = 19), VPH 18 (n= 13), VPH coinfecciones (n = 14) y otros genotipos de VPH de alto riesgo (n = 1).

7.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las mujeres participantes fueron colectadas a partir de la población que asiste a la Fundación InnovaGen - IPS Popayán para controles rutinarios de citología, quienes firmaron un consentimiento informado en el cual autorizaron el uso de la muestra para estudios con fines investigativos. La entidad proporcionó las muestras citológicas en base líquida, conservadas en solución PreservCyt® y fluido conservante SurePath®. De igual manera, la institución suministró información de

las pacientes en cuanto a diagnóstico de lesiones, variables demográficas, de riesgo, estilos de vida y también el diagnóstico de infección por VPH.

7.3 CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VPH

La Fundación InnovaGen - IPS Popayán suministró el diagnóstico de la infección por VPH realizado con la prueba COBAS® 4800 HPV, una prueba cualitativa *in vitro* realizada de forma automatizada con el equipo Roche cobas x 480, que utiliza la amplificación del fragmento de ADN objeto mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y la hibridación de ácidos nucleicos. La prueba en un único análisis detecta 14 tipos del VPH de alto riesgo (AR) y reporta específicamente los genotipos 16 y 18.

7.4 PROCESAMIENTO Y TINCIÓN DE CÉLULAS CERVICALES

Este estudio adaptó el protocolo de tinción Feulgen Fast Green establecido por Thomas et al., 2009 para el procesamiento de células bucales y se estandarizó con algunas modificaciones de la siguiente manera:

Se adicionó 2 mL de metanol al 96% al vial que contenía la muestra citológica y se sometió a vortex por cinco segundos, la muestra fue transferida a un tubo Falcon para centrifugarla a 1200 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min; se adicionó a la muestra 3 mL del reactivo Density Reagent y se centrifugó a 1200 rpm durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 3 mL del reactivo Tris Buffered Saline, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregó 40 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) y 20 mL de metanol al 90%, se re-suspendió con pipeta Pasteur por 5 minutos y al finalizar se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min; este procedimiento se repitió con las siguientes concentraciones de metanol: 60% con adición de 30 µL de DMSO, 30% con adición de 30 µL de DMSO, 15% con adición de 20 µL de DMSO,

hasta llegar a una mínima concentración de metanol al 5% con adición de 20 µL de DMSO; en algunas muestras la cantidad de DMSO y el tiempo de re-suspensión varió dependiendo del volumen encontrado. Al finalizar estos lavados, se descartó por completo el sobrenadante y se agregó metanol frío al 80%, en una proporción 1:1.

Las células fueron extendidas en dos placas limpias y previamente codificadas. Se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se revisó densidad celular y calidad de la muestra, las placas que no cumplieron con la calidad esperada se descartaron. Las placas completamente secas, fueron sumergidas durante 20 minutos en metanol frio al 80% y se dejaron secar durante 12 horas. A continuación se sumergieron en etanol al 50% y 20% por 1 minuto respectivamente y en agua destilada y filtrada por 2 minutos; posteriormente, se depositaron en ácido clorhídrico (HCl) 5M durante 35 minutos y se lavaron con agua de grifo por 3 minutos. A continuación se sumergieron por 2 horas en reactivo Schiff y se lavaron con agua de grifo caliente, aproximadamente a 45 °C. Finalmente se sumergieron en reactivo Fast Green por 15 segundos y se realizó el montaje permanente con entelan.

7.5 CRITERIOS PARA IDENTIFICACIÓN DE MICRONÚCLEOS Y ANOMALÍAS NUCLEARES

Los criterios de evaluación para MN y AN, se basaron principalmente en las descripciones hechas por Tolbert et al (1991). Como criterio de inclusión las células debían presentar citoplasma y núcleo intactos con poca o ninguna superposición de células adyacentes o restos celulares. Los criterios para identificar MN fueron: perímetro del MN redondeado y liso; con un área menos de un tercio del diámetro del núcleo principal, pero lo suficientemente grande como para discernir la forma y el color; la intensidad de tinción y textura similar a la del núcleo principal; tener el mismo plano focal que el núcleo principal. Los puentes nucleoplásmicos fueron

incluidos en la frecuencia del biomarcador de BR. La frecuencia de biomarcadores de daño genotóxico: MN, BR, y BN se reportaron en 2000 células diferenciadas y la frecuencia de AN: células PIC, CR, CC y CL en 1000 células diferenciadas.

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron y sistematizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 19.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL). Se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Levene) para el análisis de la prueba de hipótesis que compara los grupos con respecto a las variables cuantitativas. Teniendo en cuenta los resultados arrojados de las pruebas normalidad y homogeneidad de varianzas, se usó la prueba estadística ANOVA de análisis univariado y el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para observar la relación entre los grupos y variables cualitativas se usó la prueba estadística de Chi-cuadrado. Para determinar la relación entre el daño citogenético, las variables sociodemográficas y los factores de riesgo asociados al CaCU y frecuencia de los biomarcadores, se realizó un modelo de ajuste lineal univariando, que a diferencia de otras pruebas más utilizadas como Coeficiente de Correlación de Pearson y Spearman que establecen relación lineal entre dos variables, éste modelo matemático es el más apropiado para establecer la variabilidad de los datos y su grado de asociación teniendo en cuenta los tres factores de estudio: variable independiente, variable dependiente (biomarcadores) y los grupos establecidos: I, II y III en los cuales ya se incorpora un diagnostico positivo o negativo del VPH. Un nivel de significancia $p \leq 0.05$ fue utilizado como criterio para rechazar la hipótesis nula (Ho).

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

8.1.1 Características sociodemográficas de la población de estudio

Éste estudio de casos y controles no es pareado, porque de esta manera se evitó descartar casos que presentaron el factor de riesgo, los cuales son escasos en la población. Además, al tener un grupo heterogéneo fue posible evaluar el efecto de la edad y la etnia en la frecuencia de los biomarcadores de interés. En este estudio no se calculó OR porque es un estudio exploratorio y se desconoce el punto de corte para realizar tablas 2 x 2. El estudio incluyó un total de 184 mujeres cuyas características demográficas se describen en la **Tabla 1**. La media de la edad del Grupo I fue de 39,87± 1,18 años, Grupo II fue de 37,96± 1,46 años y Grupo III fue de 34,59± 0,98 años. La edad del Grupo I fue significativamente mayor en referencia al Grupo II y III (p<0,01). El componente étnico de la población fue: 62,2% mestizo, 24,59% afrocolombiano y 13,3% indígena. Con relación al estrato socio económico 73,2% de las mujeres pertenecían a estratos 0-1, 18,4% a estratos 2-3 y 8,4% a estrato 4 o más. El perfil ocupacional de la población fue 49,7%, ama de casa, 45,9% empleadas y 4,4% estudiantes. No hubo diferencias significativas en cuanto al estado civil y nivel educativo entre los grupos de estudio.

Tabla 1. Características sociodemográficas de la población de estudio

Características	Grupo I	Grupo II	Grupo III	*p*
Total	**n= 69**	**n= 47**	**n=68**	
Edad (años)				
Media ± Error estándar	39,87± 1,18	37,96*± 1,46	34,59*± 0,98	0,00[a]
Rango	25 - 63	26 - 60	25 - 62	
Etnia (%)				
Afrodescendiente	8(12,7)	12(54,5)	15(25,9)	0,00[b]
Mestizo	51(81)	2(9,1)	36(62,1)	
Indígena	4(6,3)	8(36,4)	7(12,1)	
Estado civil (%)				
Con pareja	49(73,1)	28(59,6)	42(61,8)	0,24[b]
Sin pareja	18(26,9)	19(40,4)	26(38,2)	

Educación (%)				
≤ primaria	12(17,6)	16(34)	16(23,5)	0,13[b]
> primaria	56(82,4)	31(66)	52(76,5)	
Estrato socioeconómico (%)				
1	32(50)	44(93,6)	55(80,9)	0,00[b]
2 - 3	17(26,6)	3(6,4)	13(19,1)	
4 o más	15(23,4)	-	-	
Ocupación (%)				
Empleada	39(57,4)	17(36,2)	28(41,2)	0,03[b]
Ama de casa	26(38,2)	30(63,8)	35(51,5)	
Estudiante	3(4,4)	-	5(7,4)	

[a]: Prueba estadística ANOVA – Bonferroni; [b]: Prueba estadística Chi-cuadrado
n: Número de mujeres; DE= Desviación estándar; * Estadísticamente significativo respecto al Grupo I
Grupo I: mujeres con citología negativa- VPH negativo; Grupo II: mujeres con citología negativa- VPH positivo; Grupo III: mujeres con citología anormal – VPH positivo

8.1.2 Características clínicas de la población objeto de estudio

En la **Tabla 2** se describen las características clínicas de la población objeto de estudio. No se encontró diferencias en la edad de la menarquia, edad primera relación sexual, numero de compañeros sexuales, vida sexual activa entre los grupos. Se identificó que la edad del primer embarazo en el Grupo I fue significativamente mayor en referencia al Grupo II y III. El 73,1% de las mujeres usaron métodos de planificación así: 32,6% ligadura de trompas, 16% inyección mensual/trimestral, 9,1% condón barrera/ diafragma, 6,9% anticonceptivos orales, 8,6% otros métodos de planificación y el 26,9% no utilizaban métodos de planificación. Los tres grupos de estudio presentaron coinfecciones, la más frecuente fue Vaginosis bacteriana, seguida de candidiasis vulvovaginal y coinfección de las anteriores. En la **Tabla 3** se describen los antecedentes familiares con CaCU, donde se observó que no existe diferencia significativa entre los grupos de comparación, por otra parte, el 89,4% de la población no refería antecedentes con esta enfermedad y 10,6% si refirió antecedentes, de los cuales el familiar más relacionado fue abuela con 4,9%.

Tabla 2. Características clínicas de la población

Características	Grupo I	Grupo II	Grupo III	*p*
Total	**n= 69**	**n= 47**	**n=68**	
Edad menarquia				
Media ± Error estándar	13,31± 0,19	13,04± 0,23	13,45± 0,18	0,39 [a]
Edad primer embarazo				
Media ± Error estándar	22,04± 0,70	18,58±0,50*	18,17±0,43*	0,00 [a]
Edad primera relación sexual				
Media ± Error estándar	17,33±0,31	16,87±0,31	16,44±0,29	0,09 [a]
Número de compañeros sexuales (%)				
1-3	50 (72,5)	32 (71,1)	44 (66,7)	0,92 [b]
4-7	17 (24,6)	12 (26,7)	19 (28,8)	
8 ó mas	2 (2,9)	1 (2,2)	3 (4,5)	
Vida sexual activa (%)				
Si	53 (79,1)	40 (85,1)	56 (82,4)	0,70 [b]
No	14 (20,9)	7(14,9)	12 (17,6)	
Método de planificación actual (%)				
Ligadura de trompas	25 (39,1)	11(23,9)	21(32,3)	0,00 [b]
Anticonceptivos orales	3 (4,7)	5 (10,9)	4 (6,2)	
Condón Barrera/ diafragma	10 (15,6)	1 (2,2)	5 (7,5)	
Inyección mensual/ trimestral	4 (6,3)	13 (28,3)	11 (16,9)	
Otros	4 (6,3)	1 (2,2)	10 (15,4)	
Ninguno	18 (28,1)	15 (32,6)	14 (21,5)	
Enfermedades de transmisión sexual (%)				
Si	2 (3,1)	5 (10.9)	-	0,01 [b]
No	63 (96,9)	41 (89,1)	66 (100)	
Coinfecciones (%)				
Hongos *Cándida spp*	4 (5,8)	5 (10,6)	1 (1,5)	0,06 [b]
Vaginosis Bacteriana	9 (13)	13 (27,7)	14 (20,6)	
Hongos *Cándida spp* y Vaginosis bacteriana	-	1 (2,1)	3 (4,4)	
Ninguno	55 (81,2)	28 (59,6)	50 (73,5)	

[a]: Prueba estadística ANOVA – Bonferroni; [b]: Prueba estadística Chi-cuadrado
n: Número de mujeres; *Estadísticamente significativo respecto al Grupo I
Grupo I: mujeres con citología negativa- VPH negativo; Grupo II: mujeres con citología negativa- VPH positivo; Grupo III: mujeres con citología anormal – VPH positivo

Tabla 3. Antecedentes familiares con CaCU

Características (%)	Grupo I	Grupo II	Grupo III	*P*
Total	**n= 69**	**n= 47**	**n=68**	
Si	11(16,2)	5(10,6)	3(4,7)	0,10 [a]
No	57(83,8)	42(89,4)	61(95,3)	
Familiar (%)				
Abuela	7(10,1)	1(2,1)	1(1,5)	0,13 [a]
Madre	-	2(4,3)	1(1,5)	
Hermana	1(1,4)	1(2,1)	-	
Tía	3(4,3)	1(2,1)	1(1,5)	

[a]: Prueba estadística Chi-cuadrado; n: Número de mujeres; Grupo I: mujeres con citología negativa- VPH negativo; Grupo II: mujeres con citología negativa- VPH positivo; Grupo III: mujeres con citología anormal – VPH positivo

8.1.3 Hábitos alimenticios de la población

Se caracterizó algunos componentes de la dieta en los tres grupos de estudio con el objetivo de establecer si existe diferencia en el consumo de nutrientes relacionados con capacidad antioxidante y que podrían explicar en parte la diferencia en la frecuencia de los distintos biomarcadores. En la **Tabla 4** se describe los hábitos alimenticios de la población. No existe diferencia significativa entre los grupos de comparación en cuanto a la dieta ingerida.

Tabla 4. Hábitos alimenticios de la población

Características	Grupo I	Grupo II	Grupo III	*p*
Total	**n= 69**	**n= 47**	**n=68**	
Alimentación				
Consumo Vitamina C **(%)**				0,71 [a]
Si	68(98,6)	47(100)	67(98,5)	
No	1(1,4)	-	1(1,5)	
Consumo Vitamina A **(%)**				0,70 [a]
Si	68(98,6)	47(100)	66(98,5)	
No	1(1,4)	-	1(1,5)	
Consumo Betacarotenos **(%)**				0,71 [a]
Si	68(98,6)	47(100)	67(98,5)	
No	1(1,4)	-	1(1,5)	

[a]: Prueba estadística Chi-cuadrado; n: Número de mujeres; Grupo I: mujeres con citología negativa- VPH negativo; Grupo II: mujeres con citología negativa- VPH positivo; Grupo III: mujeres con citología anormal – VPH positivo

8.2 EFECTO GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO EN CÉLULAS CERVICALES INDUCIDO POR VPH

En la **Figura 4**, se pueden observar las fotografías de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad identificados en el estudio.

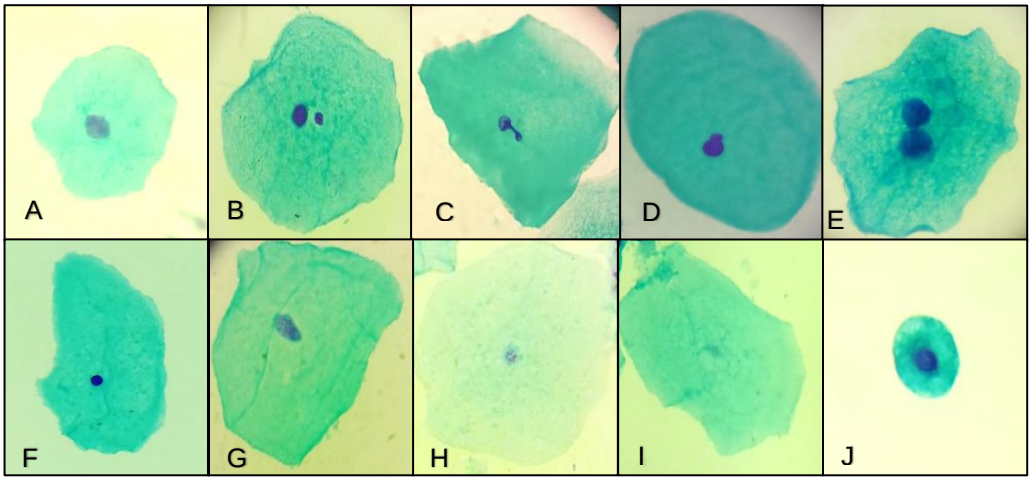


Figura 4. Imágenes de biomarcadores vistas al microscopio en una magnificación de 100X. **A.** Célula diferenciada, **B.** Célula con micronúcleo, **C.** Célula con puente nuclear, **D.** Célula con brote nuclear, **E.** Célula binucleada, **F.** Célula picnótica, **G.** Célula con cromatina condensada, **H.** Célula cariorréctica, **I** Célula cariolítica, **J.** célula basal.

8.2.1 Frecuencia de biomarcadores en mujeres VPH negativas vs. positivas con citología negativa.

Posterior a la realización de la prueba estadística ANOVA y Chi Cuadrado, en la **Tabla 5** no se observó diferencia estadística entre las mujeres con diagnostico negativo y positivo de VPH en ningún biomarcador genotóxico (MN, BR, BN) ($p > 0,05$). Sin embargo, se presenta una tendencia de aumento de los biomarcadores MN ($p = 0,13$) y BN ($p=0,21$) en las mujeres con diagnóstico VPH positivo en relación a las mujeres con diagnóstico VPH negativo. Además se observa que entre los biomarcadores evaluados PIC fue más frecuente y significativamente mayor en las mujeres con diagnostico negativo para VPH ($p<0,05$); las frecuencias de los biomarcadores citotóxicos CL y CC disminuyen en las mujeres con diagnostico VPH positivo, aunque no fue estadísticamente significativo ($p>0,05$). Se observa que la media en la frecuencia de los biomarcadores citotóxicos de PIC y CL fueron mayores en comparación con los biomarcadores genotóxicos, con una desviación estándar muy amplia; sin embargo, estos valores no pudieron ser comparables con los obtenidos de previos estudios (Aires et al., 2011; Bhat et al., 2016; Makkar, 2018), debido a que en ellos, se realizó la suma de lo biomarcadores citotóxicos en

conjunto y no de manera independiente como en este estudio; sin embargo, estos rangos tan amplios pueden estar relacionados con la variación en la etapa del ciclo menstrual, inclusive por mala interpretación del observador en el momento de realizar el registro de lectura.

Tabla 5. Frecuencia de biomarcadores en mujeres VPH negativas vs. positivas con citología negativa.

BIOMARCADORES	Diagnóstico VPH		*P*
	VPH Negativo n= 69	VPH Positivo n= 47	
	Media ± Error estándar	Media ± Error estándar	
GENOTÓXICOS			
Micronúcleos (MN)	0,13 ± 0,06	0,28 ± 0,08	0,13 [a]
Brotes (BR)	1,13 ± 0,19	0,85 ± 0,18	0,32 [a]
Binucleadas (BN)	0,67 ± 0,12	0,91 ± 0,17	0,21 [a]
CITOTÓXICOS			
Picnóticas (PIC)	43,36 ± 4,35	28,30 ± 3,46	0,01 [a*]
Cariorrécticas (CR)	1,42 ± 0,19	1,70 ± 0,48	0,54 [a]
Cariolíticas (CL)	12,35 ± 3,65	4,79 ± 0,77	0,09 [a]
Cromatina condensada (CC)	4,80 ± 0,48	3,57 ± 0,64	0,12 [a]

[a]: Prueba estadística ANOVA; n: Número de mujeres; * Estadísticamente significativo

8.2.2 Frecuencia de biomarcadores genotóxicos y citotóxicos, de acuerdo a la presencia de lesiones pre neoplásicas en mujeres VPH positivas

En la **Tabla 6**, se observó diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias de los biomarcadores MN, BR, BN y CR entre los grupos de estudio según la prueba de ANOVA. El análisis de Bonferroni estableció que las frecuencias de los biomarcadores genotóxicos MN y BN se incrementaron significativamente en el grupo de mujeres con citología anormal - VPH positivo (Grupo III) con respecto a las mujeres con citología negativa - VPH negativo (Grupo I) ($p<0,05$), además se observa que el biomarcador BR fue significativamente mayor en el grupo de mujeres con citología anormal - VPH positivo (Grupo III) en relación a las mujeres con citología negativa - VPH positivo (Grupo II) ($p<0,01$). En los biomarcadores de citotoxicidad, CR fue significativamente mayor en el grupo de mujeres con citología

anormal - VPH positivo (Grupo III) en relación a las mujeres con citología negativa - VPH negativo (Grupo I) ($p<0,05$).

Tabla 6. Frecuencia de biomarcadores según resultado de citología en mujeres VPH negativas y positivas

BIOMARCADORES	Grupo I	Grupo II	Grupo III	*p*
Total	**n= 69**	**n= 47**	**n=68**	
	Media ± Error estándar	Media ± Error estándar	Media ± Error estándar	
GENOTÓXICOS				
Micronúcleos (MN)	0,13 ± 0,06	0,28 ± 0,08	0,47* ± 0,12	0,03 [a]
Brotes (BR)	1,13 ± 0,19	0,85 ± 0,18	2,01° ± 0,26	0,00 [a]
Binucleadas (BN)	0,67 ± 0,12	0,91 ± 0,17	1,76* ± 0,27	0,00 [a]
CITOTÓXICOS				
Picnóticas (PIC)	43,36 ± 4,35	28,30 ±3,17	41,38 ± 4,76	0,06 [a]
Cariorrécticas (CR)	1,42 ± 0,19	1,70 ± 0,48	2,59 ± 0,39	0,04 [a]
Cariolíticas (CL)	12,35 ± 3,65	4,79 ± 0,77	9,99 ± 2,55	0,21 [a]
Cromatina condensada (CC)	4.80 ± 0,48	3,57 ± 0,64	5,35 ± 0,48	0,07 [a]

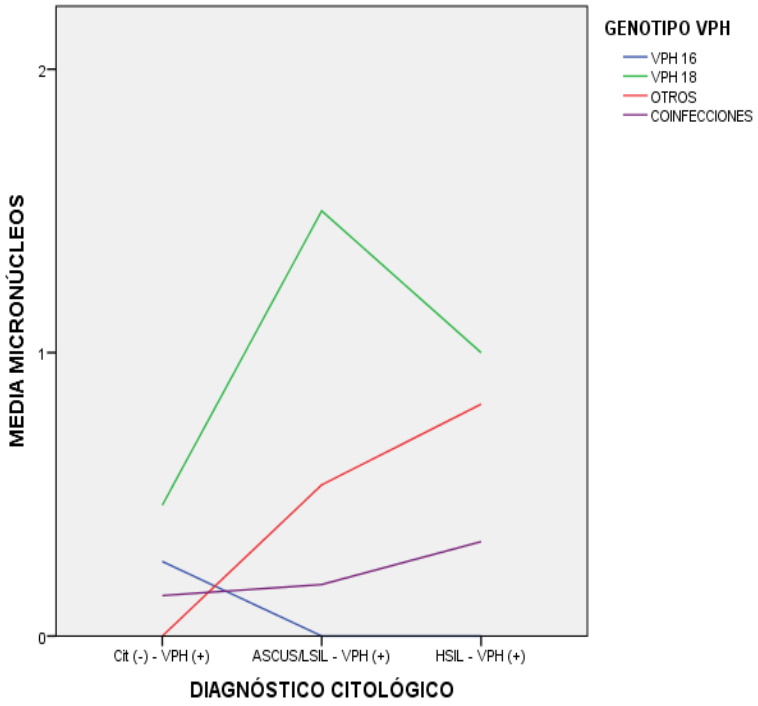
[a]: Prueba estadística ANOVA y Bonferroni
* Estadísticamente significativo respecto al Grupo I; °: Estadísticamente significativo respecto al Grupo II;
Grupo I: mujeres con citología negativa- VPH negativo; Grupo II: mujeres con citología negativa- VPH positivo;
Grupo III: mujeres con citología anormal – VPH positivo

8.2.3 Tendencia de la media de biomarcadores significativos en los diferentes tipos de lesiones cervicales respecto al genotipo de VPH

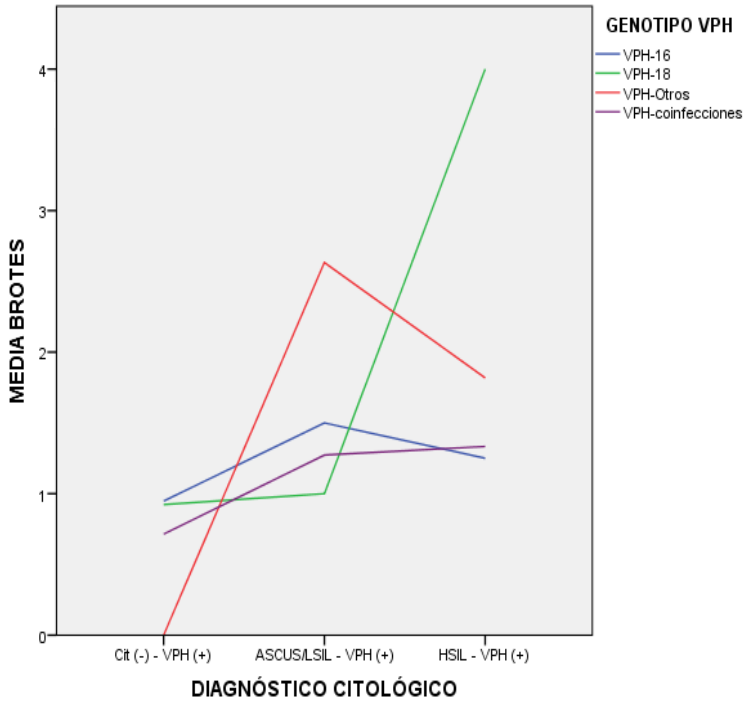
En la **Figura 5** se presenta la media de los biomarcadores significativos en los diferentes tipos de lesiones cervicales respecto al genotipo de VPH. En presencia de la infección por VPH 16 se observa que las medias de los biomarcadores BR, BN, CR incrementan progresivamente entre citología negativa y ASC-US/LSIL seguido de una ligera disminución en HSIL, MN registró una disminución entre citología negativa y ASC-US/LSIL, no hubo registro en HSIL. Con el genotipo 18 las medias de los biomarcadores BR, BN, CR, tuvieron un descenso entre citología negativa y ASC-US/LSIL sin embargo incrementaron en HSIL, MN registró un incremento entre citología negativa y ASC-US/LSIL y posteriormente un descenso en HSIL. Con coinfecciones las medias de los biomarcadores MN y BR aumentaron progresivamente entre citología negativa, ASC-US/LSIL y HSIL, las medias de BN y CR tuvieron un aumento gradual entre citología negativa y ASC-US/LSIL seguido

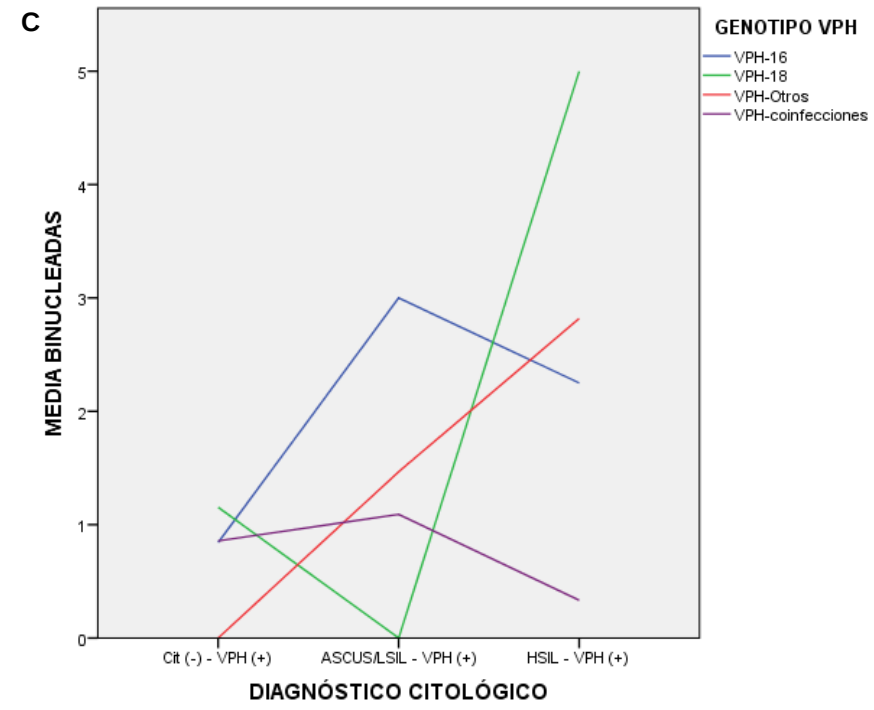
de una ligera disminución en HSIL. Con otros genotipos de alto riesgo las medias de los biomarcadores MN y BN tuvieron un aumento gradual entre citología negativa, ASC-US/LSIL y HSIL, las medias de los biomarcadores BR y CR tuvieron un aumento entre citología negativa y ASC-US/LSIL seguido de una ligera disminución en HSIL. Además se observa que las medias de los biomarcadores con el genotipo VPH 18 fueron superiores en referencia a los demás genotipos.

A


GENOTIPO VPH
VPH 16
VPH 18
OTROS
COINFECCIONES
MEDIA MICRONÚCLEOS
0
1
2
Cit (-) - VPH (+)
ASCUS/LSIL - VPH (+)
HSIL - VPH (+)
DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

B


GENOTIPO VPH
VPH-16
VPH-18
VPH-Otros
VPH-coinfecciones
MEDIA BROTES
0
1
2
3
4
Cit (-) - VPH (+)
ASCUS/LSIL - VPH (+)
HSIL - VPH (+)
DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO



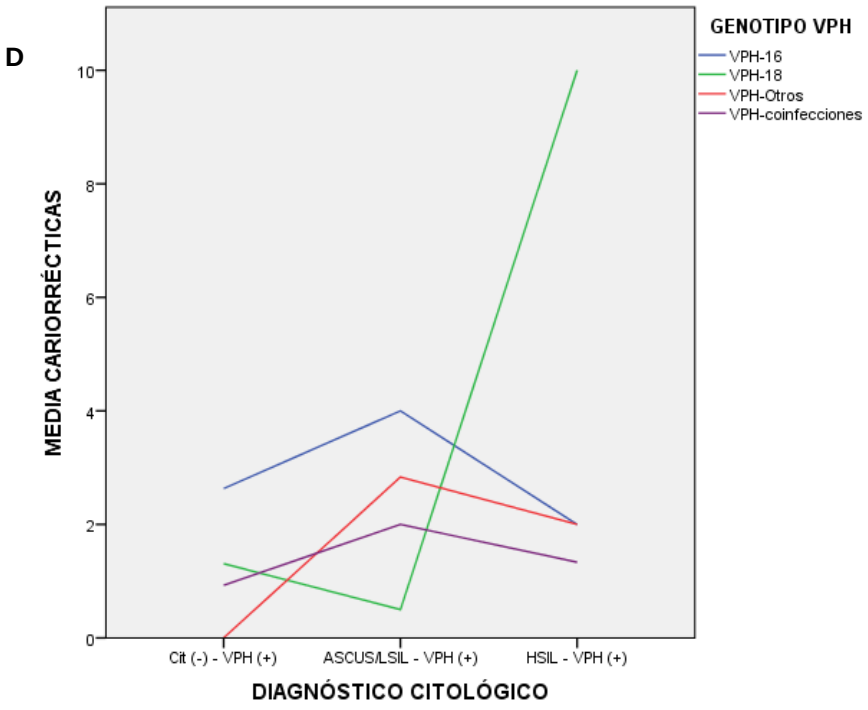


Figura 5. Media de los biomarcadores significativos en los diferentes tipos de lesiones cervicales respecto al genotipo de VPH. **A** Media de micronúcleos; **B** Media de brotes; **C** Media de binucleadas; **D** Media de cariorrécticas

8.3 ASOCIACIÓN ENTRE FACTORES DE RIESGO, VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, ESTILOS DE VIDA Y LA FRECUENCIA DE LOS BIOMARCADORES GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Para analizar la influencia de los factores de riesgo, variables sociodemográficas y estilos de vida en la frecuencia de los biomarcadores citotóxicos y genotóxicos en los grupos de estudio, se realizó un análisis de modelo lineal univariado (datos no mostrados), encontrando que la única variable relacionada fue la edad. En la **Tabla 7**, se presentan las frecuencia de los biomarcadores genotóxicos y citotóxicos en mujeres VPH negativas y positivas, ajustada por edad, observándose que biomarcadores como MN ($p<0,05$), BR ($p<0,01$) y BN ($p<0,01$) se incrementan significativamente independiente de la edad, mientras que el biomarcador CR perdió significancia al ajustar por esta variable ($p=0,09$). Los demás biomarcadores no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 7. Frecuencia de biomarcadores en mujeres VPH negativas y positivas, ajustada por edad

BIOMARCADORES	Grupo I	Grupo II	Grupo III	*p*
	Media ± Error estándar	Media ± Error estándar	Media ± Error estándar	
GENOTÓXICOS				
Micronúcleos	0,15 ± 0,09	0,28 ± 0,11	0,44 ± 0,09	0,02[a]
Brotes	1,09 ± 0,21	0,84 ± 0,26	2,06 ± 0,21	0,00[a]
Binucleadas	0,60 ± 0,19	0,90 ± 0,22	1,84 ± 0,19	0,00[a]
CITOTÓXICOS				
Picnóticas	44,27 ± 4,22	28,49 ± 5,05	40,32 ± 4,27	0,06[a]
Cariorrécticas	1,39 ± 0,34	1,69 ± 0,40	2,62 ± 0,34	0,09[a]
Cariolíticas	11,86 ± 2,77	4,68 ± 3,31	10,54 ± 2,80	0,23[a]
Cromatina Condensada	4.77 ± 0,50	3,57 ± 0,60	5,37 ± 0,51	0,15[a]

[a] Análisis realizado por Modelo lineal univariando

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Éste estudio inicialmente comparó la frecuencia de biomarcadores genotóxicos y citotóxicos en mujeres VPH negativas y positivas con citología negativa **(Tabla 5)**, donde no se observó diferencia significativa en los biomarcadores genotóxicos, sin embargo, se observa un aumento de MN y BN en las mujeres con diagnóstico VPH positivo en comparación con las mujeres con diagnóstico VPH negativo. Cassel et al., (2014) estableció de manera significativa un aumento en la frecuencia de MN con diagnostico positivo para ADN de VPH en citología cervical negativa. Los resultados del presente estudio no concuerdan con dicho estudio, no obstante, el bajo incremento en la frecuencia del biomarcador de MN entre las mujeres con VPH negativo y positivo en citología negativa, podría explicarse a partir de un estudio realizado en líneas celulares HFK inmortalizadas por VPH de alto riesgo, donde se reveló que E6 y E7 inducen a rupturas dobles de cadena (DSB) que no pueden ser reparadas por la alteración que se presenta en el control del ciclo celular generada por el virus; sin embargo, se identificó que las líneas celulares con pocas Aberraciones Cromosómicas Numéricas (ACN) mostraron previamente actividad de hTERT (Telomerasa Transcriptasa Inversa) en fases tempranas, esto sugiere que la activación de la telomerasa sobre la regulación positiva de hTERT mediada por la actividad E6 oncogénica, reduce la inestabilidad genómica al mantener la función de los telómeros y la supresión de las fusiones cromosómicas después de la rotura cromosómica (Schütze et al., 2016).

Cabe resaltar que posterior a la infección de las células del epitelio cervical por el VPH y en edades tempranas, especialmente antes de los 35 años, la eliminación se da de forma más eficiente y el periodo de la infección es más corta, debido a que se desencadena una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células asesinas naturales (NK) y anticuerpos naturales que

formaran una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica (Rincón et al., 2016) y por lo tanto, tener el virus con un diagnóstico de citología negativa, indicaría que la mujer ha desarrollado inmunidad contra el virus para eliminarlo (De La Fuente y Mira, 2008).

Por el contrario, cuando se analizó la frecuencia de los biomarcadores con respecto a la presencia de lesiones pre neoplásicas, se observó un aumento significativo en las frecuencias de los biomarcadores de genotoxicidad MN y BN en las mujeres con citología anormal – VPH positivo en referencia a las mujeres con citología normal - VPH negativo, **(Tabla 6)**, BR fue estadísticamente significativo entre las mujeres con citología negativa- VPH positivo y mujeres con anormalidades – VPH positivo, lo que indica que el biomarcador es sensible a la presencia de las lesiones intraepiteliales (Giannoudis et al., 2000). Estos datos concuerdan con estudios previos donde las frecuencias de MN fueron significativamente mayores en los grupos con cambios celulares en comparación con el grupo de control (Leal et al., 2002; Gandhi et al., 2003; Cortés et al., 2010; Gayathri et al., 2012), además, se demostró que la frecuencia de MN aumenta en paralelo con la gravedad de los cambios fenotípicos en la transición de lesiones de bajo grado a lesiones de alto grado (Guzmán et al., 2003; Gayathri et al., 2012).

La evolución de LSIL a HSIL aumenta la inestabilidad genética, dando como resultado pérdidas o ganancias de los cromosomas o fragmentos de cromosomas en particular en los cromosomas 1, 3, 5, 11 y 17, asociados con el desarrollo del cáncer de cuello uterino (Paz et al., 1992; Bueno et al., 2014), este patrón de anomalías varía mucho y va desde reordenamientos balanceados simples a anormalidades complejas, que afectan tanto a la estructura como el número cromosómico (Duensing et al., 2000; Guzmán et al., 2003).

En este estudio se encontraron mayores frecuencias de MN en mujeres portadoras de genotipos de alto riesgo 16 y 18, estos datos concuerdan con estudios de MN

realizados en mujeres infectadas por VPH, donde se encontró que las mujeres con genotipos de alto riesgo presentan mayor frecuencia de células con MN en comparación con las mujeres infectadas con genotipos de VPH de bajo riesgo, esto se relaciona con una tasa de daño cromosómica menor, además concluyen que la infección por VPH y la posterior sobreexpresión de VPH E6 y E7 podrían inducir la rotura del ADN generando inestabilidad genética (Cortés et al., 2010; Adam et al., 2015).

A diferencia de los genotipos de VPH de bajo riesgo, la inestabilidad genómica aumentada de los genotipos de alto riesgo, ha sido explicada por la capacidad diferencial de E7 para asociarse con la proteína Retinoblastoma (pRb) y específicamente degradar p105, p107 y p130 en la capa basal, involucrados en la entrada del ciclo celular en las capas epiteliales superiores. Además, a pesar de que las proteínas E6 de los VPH de alto riesgo y bajo riesgo inactivan la función p53, solo los tipos de alto riesgo estimulan su ubiquitinación y la degradación dependiente del proteosoma (Doorbar, 2005).

Diferentes estudios indican que la expresión de VPH de alto riesgo es significativamente mayor en las lesiones precancerosas y CaCU en comparación con los VPH no neoplásicos (Cortés et al., 2010; Cassel et al., 2014; Shi et al., 2015). Los genotipos 16 y 18 y otros genotipos de alto riesgo se han asociado lesiones pre neoplásicas con altas probabilidades de progreso a cáncer (Herrington, 1994; Münger et al., 2004; Doorbar, 2005). En el presente estudio se pudo observar que el genotipo VPH 18 registró mayores medias en las frecuencias entre los biomarcadores genotóxicos MN, BR y BN, en la progresión de lesiones ASC-US/LSIL y HSIL. **(Figura 5)**. En un estudio de MN realizado en mujeres con lesiones HSIL y LSIL, la mayoría de los pacientes con HSIL tenía una carga viral más alta en genotipos 16, 18, 31, 33, 39 y 45, en consecuencia, una mayor inestabilidad del genoma, evidenciada por un aumento en la frecuencia de MN (Adam et al., 2015).

En el presente estudio el biomarcador genotóxico más frecuente fue BR en todos los grupos de comparación. Un estudio realizado en linfocitos de sangre periférica y células bucales de pacientes que presentaban lesiones cervicales, mostró que además de MN otros biomarcadores de daños genéticos tales como puentes nucleoplásmicos y BR fueron significativamente altos en referencia a los controles (Gashi et al., 2018). A pesar de que ese estudio se realizó en otro tipo de tejido, los resultados concuerdan con los resultados de éste estudio al realizar la comparación entre las mujeres con citología negativa – VPH positivo en referencia al grupo de mujeres con citología anormal – VPH positivo, lo que sugiere que este biomarcador evidencia defectos en la eficiencia de reparación de lesiones al ADN así como una separación defectuosa de las cromátidas hermanas en la anafase y amplificación de ADN (Fenech, 2002; Bolognesi y Fenech, 2013).

En un estudio de frecuencias de MN y BN realizado en diferentes grados de lesiones cervicales se encontró un aumento significativo en pacientes con HSIL y carcinoma, en comparación con LSIL y casos no neoplásicos (Ambroise et al., 2013). En el presente estudio el biomarcador BN y MN también fue significativamente mayor en las mujeres con citología anormal – VPH positivo en referencia al grupo de mujeres con citología negativa – VPH positivo **(Tabla 6)**. Se ha identificado que una mala segregación de los cromosomas es más frecuente en las células binucleadas que no logran completar la citocinesis (Thomas et al., 2009), lo que sugiere que las células binucleadas pueden promover la inestabilidad genómica que resultaría en el desarrollo de cáncer cervical (Bhat et al., 2016).

Uno de los procesos más importantes para mantener la homeostasis en los organismos es la apoptosis (Suárez et al., 2015). Los resultados del presente estudio con los biomarcadores de muerte celular indican que CR presenta un aumento en la frecuencia de células apoptóticas en las mujeres VPH positivas comparado con las mujeres VPH negativas con citología negativa **(Tabla 5)**. Esto podría deberse a que la apoptosis constituye un mecanismo de defensa para

eliminar células potencialmente peligrosas como aquellas que han sido infectadas por virus o células que portan alteraciones genéticas, incluyendo las células tumorales (Meier et al., 2000). Sin embargo, el presente estudio no tuvo en cuenta la fase del ciclo menstrual en el que se encontraban las mujeres, por tanto hubo muestras de las diferentes fases (menstrual, pos menstrual, ovulatoria, luteínica o secretora). Se observó que entre los biomarcadores genotóxicos PIC, tuvo mayor frecuencia y alta variabilidad de los datos obtenidos, estas altas variabilidades pueden estar relacionadas con la fase del ciclo menstrual, donde el epitelio del cuello uterino va modificando su función y morfología de acuerdo al estímulo de las hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona) que permiten establecer la maduración celular (Botero et al., 2004). Los estrógenos determinan el crecimiento (proliferación celular), aumento del número de capas celulares y aumento de grosor epitelial. La progesterona produce disminución del contenido intracelular del glucógeno y aumenta la descamación celular de la capa intermedia y superficial (Pelea y González, 2003) PIC son predominantes en fase pos menstrual y fase ovulatoria donde se observan con amplios citoplasmas y en ocasiones con gránulos de queratohialina alrededor del núcleo, en éste periodo el índice picnótico (IP) puede alcanzar valores de 75 a 80% sobre el total de las células registradas en el frotis (Murcia y Esparza, 2011).

Con relación a la frecuencia de la apoptosis en mujeres sanas y con lesiones pre neoplásicas los resultados obtenidos con el citómico de MN de previos estudios presentaron resultados opuestos. Uno de ellos reportó frecuencias de apoptosis significativamente más bajas en las mujeres con HSIL que en las mujeres que muestran los procesos inflamatorios o LSIL (Aires et al., 2011), sin embargo, otros estudios establecieron una correlación positiva entre el aumento de la apoptosis con el progreso de lesiones premalignas y malignas de cuello uterino (Bhat et al. 2016; Makkar, 2018). En general, los datos sobre la frecuencia de células en apoptosis son muy interesantes como se esperaba, hubo frecuencias más bajas de apoptosis en mujeres con citología anormal – VPH positivo (Grupo III) en comparación con las

mujeres con citología negativa – VPH negativo (Grupo I). Los resultados de éste estudio se asemejan a los resultados obtenidos por Aires et al., 2011 y otros estudios realizados con otro método de identificación de muerte celular TUNEL, (Shoji, et al., 1996; Rogovskaya et al., 2001), los cuales concluyen que se presenta una disminución de la frecuencia de apoptosis cuando hay presencia de lesiones intraepiteliales, resultados que biológicamente son coherentes con la biología de la infección y proceso carcinogénico, debido a que estudios mecanísticos han establecido que la infección persistente por VPH inhibe la respuesta apoptótica. Se ha identificado que dicho proceso se da por acción de la oncoproteina E5 del VPH, la cual impide la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno, lo cual forma parte de una de las estrategias que utilizan las células del sistema inmune para la defensa, también se ha descrito que E5 puede modular la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual regula la transcripción génica y modula procesos importantes, como la proliferación celular, la angiogénesis, la invasión tumoral y la metástasis, lo anterior trae como consecuencia la inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis (Scott et al., 2018). También se ha encontrado que tumores del cuello uterino con infección de VPH presentan niveles disminuidos de expresión del receptor CD95 (su estimulación induce la apoptosis de la muerte celular programada), lo que conlleva a una apoptosis deficiente (Moody y Laimins, 2010; Scott et al., 2018). Lo que indicaría que a medida que se desarrolla la transformación maligna, el virus controla el ciclo celular de tal manera que inhibe la respuesta apoptótica (Rogovskaya et al., 2001; Bocardo et al., 2010).

La amplia variación en las frecuencias de MN entre diferentes individuos en el mismo grupo de estudio puede ser atribuido a exposición ambiental, agentes genotóxicos, factores de estilo de vida, la deficiencia de micronutrientes, el componente genético, origen étnico entre otros factores (Samanta et al., 2011). En éste estudio se realizó un análisis de variables sociodemográficas, condiciones clínicas, estilos de vida, asociadas con la frecuencia de los biomarcadores

genotóxicos y citotóxicos (datos no mostrados), obteniendo como resultado que el único relacionado fue la variable edad **(Tabla 7)**. Se ha identificado que los tejidos envejecidos acumulan reordenamientos genómicos y defectos en la reparación de DSB (Rupturas Dobles de Cadena), implicados en el proceso de envejecimiento (Garinis et al., 2002; Gorbunova et al., 2007). La reparación por extremos no homólogos (NHEJ por sus siglas en inglés) es la vía principal para reparar DBS en los mamíferos (Bassing y Alt, 2004). Un estudio realizado en diferentes tejidos de ratón se pudo comprobar que NHEJ se vuelve menos eficiente y más propenso a errores con el aumento de la edad, los ratones con mutaciones en los genes NHEJ exhiben un envejecimiento prematuro inclusive con una disminución de la eficiencia entre 1.8 a 3.8 veces (Vaidya, Mao et al. 2014). Una reparación ineficiente por NHEJ puede dejar los extremos de ADN rotos expuestos facilitando formación de uniones inapropiadas y reordenamientos genómicos estos resultados proporcionan un mecanismo para la inestabilidad genómica que puede estar reflejada en la formación e incremento de MN (Terasawa et al., 2014).

Se ha encontrado que la inflamación crónica causada por la presencia de agentes infecciosos tales como *Cándida spp*, *Gardnerella vaginalis*, en el tejido del cuello uterino y la serología VIH positiva se relacionaron con un aumento en la frecuencia del biomarcador MN ($p<0,05$), en referencia a las mujeres que no presentaban ninguna infección (Murta et al., 2000). A pesar de que en el grupo de estudio hubo un número importante de mujeres con coinfecciones **(Tabla 2)**, esta variable no se relacionó con un incremento en la frecuencia de biomarcadores.

Estudios indican que el tabaquismo (pasivo y activo) y el consumo de alcohol incrementan significativamente la frecuencia de MN, en relación con los grupos que no presentan estos factores (Bueno et al., 2014). En este estudio estas variables no se relacionaron con el aumento en la frecuencia de biomarcadores posiblemente a que en este estudio se incluyó un mínimo número de mujeres expuestas a factores

de riesgo relacionados con carcinógenos ambientales, 1% estuvieron expuestas a humo de cigarrillo y 1,6% estuvieron expuestas a humo de leña.

En éste estudio no se encontraron diferencias en la población en cuanto a la ingesta de nutrientes según el tipo de dieta **(Tabla 4)**, y por esto se podría sugerir que éste factor no afecto la variabilidad en la frecuencia de los biomarcadores analizados, sin embargo, un estudio estableció que la deficiencia de vitamina B12 y la vitamina ácido fólico es un factor de riesgo para el aumento de la frecuencia de MN y el riesgo de cáncer (Iarmarcovai et al., 2008), y por tanto se deberían hacer estudios de caracterización de nutrientes así como de actividad física, pues también se ha establecido una relación epidemiológica entre obesidad y riesgo a cáncer, lo que requiere un estudio de los mecanismos implicados y su interacción con la infección por VPH (Bolet, 2010).

Una debilidad observada en algunos estudios con el biomarcador de MN fue que la lectura de los biomarcadores no se realizó de manera rigurosa con los criterios establecidos por Tolbert et al. 1991 y Fenech, 2002, para la identificación de los biomarcadores citotóxicos y genotóxicos, conclusión que se expone debido a los registros fotográficos presentados, pues en ellos se observan células sobrepuestas, las cuales no deberían ser incluidas en el registro ya que podrían generan falsos positivos de biomarcadores, y establecer un incremento en la frecuencia de biomarcadores que no corresponden a los verdaderos (Shi et al., 2015; Bhat et al., 2016). Una de las fortalezas de este estudio fue el uso de la citología en base líquida, como sugerencia de estudios previos para mejorar sensibilidad y veracidad en el registro de los biomarcadores (Samanta et al., 2011; Gayathri et al., 2012). En la observación microscópica se encontró pocas dificultades para realizar un registro acertado, se encontraron pocas muestras con gránulos queratohialinos, restos nucleares, colonias bacterianas, o depósitos de manchas, que podrían generar errores en los resultados, con lo anterior se puede sugerir que la citología en base líquida es la mejor opción para este tipo de estudios (Adam et al., 2015; Shi et al.,

2015). De igual manera Samanta et al., 2011, sugirió un uso de tinción específica para ADN y de esta manera mejorar la veracidad de estos estudios. El presente estudio fue realizado con Feulgen Fast Green un colorante específico para ADN, el más apropiado para evitar sobreestimaciones de las frecuencias de los biomarcadores y por lo tanto aumentar la probabilidad de falsos positivos.

El presente estudio atendió las recomendaciones sugeridas por otros autores para evaluar aún más la utilidad del biomarcador de MN en el manejo clínico de las mujeres con infección por VPH, los datos aportan de manera significativa para establecer una implementación de esta técnica como opción complementaria a los exámenes existentes y por lo tanto, a pesar de su sencillez metodológica, esta prueba puede contribuir a la vigilancia de los riesgos para la salud humana (Cortés et al., 2010; Adam et al., 2015).

10. CONCLUSIONES

- En la población estudiada, no se encontraron diferencias significativas en los biomarcadores genotóxicos (MN, BR, BN) entre las mujeres con citología negativa con diagnostico VPH negativo y positivo; sin embargo hubo aumento de MN y BN en las mujeres VPH positivas.

- PIC fue el biomarcador más frecuente y con mayor variabilidad en el registro de lectura, además fue estadísticamente significativo entre las mujeres con citología negativa con VPH positivo y negativo, sin embargo esto podría obedecer a patrones biológicos hormonales, donde en la fase ovulatoria y pos menstrual hay claro predominio de este tipo de células.

- Se estableció que entre las pacientes con infección por VPH y con algún grado de lesión intraepitelial del cuello uterino tienen un incremento significativo en los biomarcadores genotóxicos (MN y BN) y una disminución significativa en los biomarcadores citotóxicos en el tejido blanco, comparado con las mujeres con citología negativa y VPH negativo.

- En la población de estudio, el genotipo de alto riesgo VPH 18 presentó mayores registros de medias de biomarcadores estadísticamente significativos, sin embargo se deben realizar análisis para correlacionar si efectivamente este genotipo incrementa la frecuencia de los biomarcadores.

- En este estudio la edad fue la única relacionada con un incremento en la frecuencia de MN y esto puede ser debido a que la capacidad de reparar los daños en el ADN disminuye con el aumento de la edad.

- El uso de citología en base liquida permitió la realización de un mejor un procesamiento de las células exfoliadas del cuello uterino, permitiendo la

eliminación de elementos que como células inflamatorias y flujo vaginal, además de mejor dispersión celular en las placas.

11. RECOMENDACIONES

- Se necesitan investigaciones con un aumento en la muestra poblacional en mujeres con citología negativa y diagnostico negativo y positivo de VPH, para evaluar la sensibilidad del biomarcador de MN.

- Variables como la edad y la etnia pueden estar relacionados con un incremento en la frecuencia de biomarcadores, por ello se sugiere parear estos posibles factores de confusión.

- Se deben hacer estudios prospectivos con el ensayo citómico de MN completo, que incluyan una muestra poblacional representativa de cada uno de los estadíos de lesiones cervicales, y determinar si esta prueba podría establecer riesgo a desarrollar cáncer.

- Teniendo en cuenta que los biomarcadores citotóxicos no necesariamente reflejan muerte celular, se deben realizar otras técnicas de identificación de muerte celular como pruebas histológicas y de microscopia electrónica, junto con los biomarcadores citotóxicos en los mismos individuos y contrastar los resultados para establecer la veracidad de la prueba.

- La alta variabilidad de los datos obtenidos en este estudio en los biomarcadores citotóxicos, pudieron deberse a la acción hormonal fisiológica (estrógenos y progesterona) durante el ciclo menstrual, por lo tanto este es un posible factor de confusión que debe ser tenido en cuenta en futuros estudios.

- Hasta el momento no se ha podido establecer que mujeres con VPH progresaran de ASC-US y LSIL a HSIL, por ello es necesario la realización de estudios prospectivos con los biomarcadores en estas etapas tempranas de transformación, y establecer si el daño citogenético en estas etapas puede ser un indicador para una posterior transformación.

- Se recomienda también evaluar la susceptibilidad genética de las mujeres con lesiones pre neoplásicas con respecto a los genes de reparación, control del ciclo celular, genes relacionados con el metabolismo y cambios epigenéticos que estén relacionados con la infección por VPH y CaCU.

BIBLIOGRAFÍA

Adam, M. L., C. Pini, et al. (2015). *"Assessment of the association between micronuclei and the degree of uterine lesions and viral load in women with human papillomavirus."* Cancer Genomics-Proteomics 12(2): 67-71.

Alizadeh, A. M., S. Shiri, et al. (2014*). "Metastasis review: from bench to bedside."* Tumor biology 35(9): 8483-8523.

Aires, G., J. Meireles, et al. (2011). *"Micronuclei as biomarkers for evaluating the risk of malignant transformation in the uterine cervix."* Genet Mol Res 10(3): 1558-1564.

Almonte, M., R. Murillo, et al. (2010). *"Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina."* salud pública de México 52(6): 544-559.

Ambroise, M. M., K. Balasundaram, et al. (2013*). "Predictive Value of Micronucleus Count in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Carcinoma/Mikronükleus Sayımının Servikal İntraepitelyal Neoplazi ve Karsinomda Prediktif Degeri."* Turkish journal of pathology 29(3): 171-178

Arango, V. S., S (2012). *"Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana."* Revista Facultad Nacional de Salud Pública 30(1): 75-82.

Arrossi, S., E. Matos, et al. (2007). *"The socio-economic impact of cervical cancer on patients and their families in Argentina, and its influence on radiotherapy compliance.* Results from a cross-sectional study." Gynecologic oncology 105(2): 335-340.

Bassing, C. H. and F. W. Alt (2004). *"The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks."* DNA repair 3(8-9): 781-796.

Bhat, A., C. Vijaya, et al. (2016). *"Apoptosis and micronucleus in cervical pap smears: promising assays to increase the diagnostic value of the test."* Annals of Pathology and Laboratory Medicine 3(4): A320-328.

Blow, J. J. (1993). *"Preventing re-replication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor."* The Journal of Cell Biology 122(5): 993-1002.

Bolet, A. M. and S. M. M. Socarrás (2010). *"Alimentación adecuada para mejorar la salud y evitar enfermedades crónicas."* Revista Cubana de medicina general integral 26(2): 0-0.

Bolognesi, C. and M. Fenech (2013). "Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells." Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols: 191-207.

Bonassi, S., E. Coskun, et al. (2011). *"The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN XL): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol."* Mutation Research/Reviews in Mutation Research 728(3): 88-97.

Bosch, F. X., A. Lorincz, et al. (2002). *"The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer."* Journal of clinical pathology 55(4): 244-265.

Bosch, F. X., M. M. Manos, et al. (1995). *"Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective."* JNCI: Journal of the National Cancer Institute 87(11): 796-802.

Botero, S. E., A. G. Múnera, et al. (2004). *Atlas de citología cervicovaginal*, Universidad de Antioquia.

Branzei, D. and M. Foiani (2008). *"Regulation of DNA repair throughout the cell cycle."* Nature reviews. Molecular cell biology 9(4): 297.

Bueno, C. T., C. M. D. d. Silva, et al. (2014). *"Association between cervical lesion grade and micronucleus frequency in the Papanicolaou test."* Genetics and molecular biology 37(3): 496-499.

Burd, E. M. (2003). *"Human papillomavirus and cervical cancer."* Clinical microbiology reviews 16(1): 1-17.

Burk, R. D., Z. Chen, et al. (2009). *"Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity."* Public health genomics 12(5-6): 281-290.

Camacho, D., R. L. Á. Reyes, et al. (2013*). "Lesiones neoplásicas de cuello uterino en mujeres de una universidad Colombiana."* Revista Hacia la Promoción de la Salud 18(1).

Campos, L. M. R., F. d. L. Dias, et al. (2008). *"Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer."* Sao Paulo Medical Journal 126(6): 323-328.

Cardinal, L. H., L. B. Díaz, et al. (2002). *"Anatomía, citología e histología del cuello uterino, la vagina y la vulva normales y patológicos*. Ecosistema vaginal."

Carrard, V. C., L. A. Ferreira, et al. (2007). *"Teste dos Micronúcleos: Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal."* Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre. Porto Alegre. Vol. 48, n. 1/3 (jandez. 2007), p. 77-81.

Cassel, A. P., R. B. Barcellos, et al. (2014). *"Association between human papillomavirus (HPV) DNA and micronuclei in normal cervical cytology."* Genetics and molecular biology 37(2): 360-363.

Castro, M. I., O. Abratte, et al. (2004). *"Coloración de Papanicolaou y su importancia en el diagnóstico de las infecciones cervicovaginales."* Acta bioquímica clínica latinoamericana 38(2): 199-202.

Chieco, P. and M. Derenzini (1999). *"The Feulgen reaction 75 years on."* Histochemistry and cell biology 111(5): 345-358.

Ciapponi, A., A. Bardach, et al. (2011). *"Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis."* PloS one 6(10): e25493.

Civetta, M. T. and J. D. Civetta (2011). *"Carcinogénesis."* salud pública de México 53(5).

Colville-Nash, P. R. and D. A. Willoughby (1997). *"Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential."* Molecular medicine today 3(1): 14-23.

Cortés, G. E., R. M. Dávila, et al. (2010). *"Association between human papilloma virus-type infections with micronuclei frequencies."* Prague Med Rep 111(1): 35-41.

Cortes Gutierrez, E.and Dávila Rodríguez M., et al. (2014*). "Chromosomal damage as prognosis marker in cervical carcinogenesis."* Cytology and genetics 48(3): 180-188.

De Guglielmo, Z. and A. Rodríguez (2010). "*Methods used in the identification of human papillomavirus."* Anales del sistema sanitario de Navarra.

De La Fuente, E. and L. Mira (2008). *"Las 47 preguntas sobre el virus del papiloma humano, VPH."* Medicina y Seguridad del Trabajo 54(212): 111-119.

De Villiers, E.-M., C. Fauquet, et al. (2004). *"Classification of papillomaviruses."* Virology 324(1): 17-27.

Didenko, V. V. (2011). "*DNA damage detection in situ, ex vivo, and in vivo: methods and protocols."* New York; London, Humana Press - Springer Protocols.

Doorbar, J. (2005). *"The papillomavirus life cycle."* Journal of clinical virology 32: 7-15.

Duensing, S., L. Y. Lee, et al. (2000*). "The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle."* Proceedings of the National Academy of Sciences 97(18): 10002-10007

Dunne, E. F., E. R. Unger, et al. (2007*). "Prevalence of HPV infection among females in the United States."* Jama 297(8): 813-819.

Eluf N, J. and C. M. R. Nascimento (2001). *Cervical cancer in Latin America.* Seminars in Oncology, Elsevier.

Fenech, M. (1993). *"The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations."* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 285(1): 35-44.

Fenech, M. (2002). *"Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology."* Toxicology 181: 411-416.

Ferrá, T. M., A. J. Santana, et al. (2011). *"La infección por papiloma virus humano en la mujer: una revisión del tema."* Revista Archivo Médico de Camagüey 15(6): 1073-1086.

Gandhi, G., P. Sharma, et al. (2003). *"The micronucleus test in urothelial cells and uterine smears of cervix cancer patients: a comparison."* International Journal of Human Genetics 3(2): 121-126.

Gashi, G., V. Mahovlić, et al. (2018). *"The association between micronucleus, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds frequency and the degree of uterine cervical lesions."* Biomarkers 23(4): 364-372.

Garinis, G. A., G. T. Van der Horst, et al. (2008). *"DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem."* Nature cell biology 10(11): 1241.

Gayathri, B., R. Kalyani, et al. (2012). *"Significance of micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma."* Journal of Cytology/Indian Academy of Cytologists 29(4): 236.

Giannoudis, A., M. Evans, et al. (2000). *"Basal keratinocyte tetrasomy in low-grade squamous intra-epithelial lesions of the cervix is restricted to high and intermediate risk HPV infection but is not type-specific."* British journal of cancer 82(2): 424.

Giemsa, G. (1907). *"Beitrag zur Färbung der Spirochäte pallida (Schaudinn) in Ausstrichpräparaten."* DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift 33(17): 676-679.

GLOBOCAN, 2018 (IARC) Section of Cancer Surveillance

Gobernación del Cauca, 2018 - Secretaría de Salud Departamental http://saludcauca.gov.co/

Gorbunova, V., A. Seluanov, et al. (2007*). "Changes in DNA repair during aging."* Nucleic acids research 35(22): 7466-7474.

Guzmán, P., R. C. Sotelo, et al. (2003). *"Positive correlation between the frequency of micronucleated cells and dysplasia in Papanicolaou smears."* Environmental and molecular mutagenesis 41(5): 339-343.

Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). *A subway map of cancer pathways*, Nature Publishing Group.

Hart, K. W., O. M. Williams, et al. (2001). *"Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomaviruses in clinical samples."* Journal of clinical microbiology 39(9): 3204-3212.

Heddle, J. A. (1973). *"A rapid in vivo test for chromosomal damage."* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 18(2): 187-190.

Heddle, J., M. Cimino, et al. (1991). *"Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future."* Environmental and molecular mutagenesis 18(4): 277-291.

Henderson, L., J. Fedyk, et al. (1993). *"Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute and subchronic administration of azathioprine."* Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 291(1): 79-85.

Herrington, C. S. (1994) Human papilomavirus and cervical neoplasia I. *Clasification, virology, pathology, and epidemiology.* J. Clin. Pathol. 44, 1066–1072.

Hildesheim, A., M. H. Schiffman, et al. (1994). *"Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women."* Journal of Infectious Diseases 169(2): 235-240.

Hoda RS, Loukeris K and Abdul-Karim FW (2013*). Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations:* A comprehensive review of similarities and differences. Diagnostic Cytopathology 41(3): 257-278.

Hording U, et al. (1996). *Human papillomaviruses and multifocal genital neoplasia. International Journal of Gynecological Pathology*; 15(3): 230–234.

Hulka, B. S. (1982). *"Risk factors for cervical cancer."* Journal of chronic diseases 35(1): 3-11.

Iarmarcovai, G., M. Ceppi, et al. (2008). *"Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis."* Mutation Research/Reviews in Mutation Research 659(3): 274-283.

Ivanchuk, S. M. and J. T. Rutka (2004). *"The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints."* Neurosurgery 54(3): 692-700.

Jansen, K. U. and A. R. Shaw (2004). *"Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer."* Annu. Rev. Med. 55: 319-331.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ward E and Forman D (2011) *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin 61:69-90.

Jiménez, J. (2012). *"Metodos estadisticos."* Obtenido de: http://www. sefh. es/bibliotecavirtual/erroresmedicacion/010.pdf.

Laughlin D, M. E. and Munger, K (2009*). Oncogenic activities of human papillomaviruses.* Virus Res. 143, 195–208.

Leal, C. H., F. Cerda, R. M, et al. (2002). *"Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer."* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 515(1): 57-62.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). *"Genetic instabilities in human cancers."* Nature 396(6712): 643.

Linaldi Y. F., C. L. Hernández, et al. (2010). *"Indicadores de calidad en la detección oportuna de cáncer cervicouterino en unidades de primer nivel de atención."* Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social 48(3).

Liu, J., B. Rose, et al. (2004). *"Comparative analysis of characteristics of women with cervical cancer in high-versus low-incidence regions."* Gynecologic oncology 94(3): 803-810.

Llusiá, J. B. and J. A. C. Núñez (1993). *Tratado de ginecología*, Ediciones Díaz de Santos.

Makkar, N. (2018). "Apoptotic index-a significant biomarker in spectrum of cervical lesions on pap smear examination." Indian journal of applied research 8(6).

Martínez, S. V. (2005). *"Citología cervical."* Rev Med Hondur 73: 131-136.

Martins, K. F. and J. Boschini Filho (2003). *"Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes."* Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba. ISSN eletrônico 1984-4840 5(1): 43-53.

Mayo Foundation for Medical Education and Research, (2018). Tomado de: https://www.mayoclinic.org

McKenna D.J., McKeown S.R., McKelvery-Martin V.J (2008). *Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer* // Mutagenesis; 23, 13. – P. 183–190.

Meier, P., A. Finch, et al. (2000). *"Apoptosis in development."* Nature 407(6805): 796.

Mergener, M., C. R. Rhoden, et al. (2014). *"Nuclear abnormalities in cells from nasal epithelium: a promising assay to evaluate DNA damage related to air pollution in infants."* Jornal de pediatria 90(6): 632-636.

Mitra A.B., Murty V.V., Luthra U.K (1982). Sister chromatid exchange in leukocytes of patients with cancer of cervix uteri // Hum. Genet.; 60, 13. – P. 214–215.

Moreno, V., F. X. Bosch, et al. (2002). *"Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study."* The Lancet 359(9312): 1085-1092

Muñoz, N., S. Franceschi, et al. (2002*). "Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study."* The Lancet 359(9312): 1093-1101.

Munoz, N., X. Castellsagué, et al. (2006). *"HPV in the etiology of human cancer."* Vaccine 24: S1-S10.

Murcia, L. M. and E. M. Esparza (2011). *"THE FERTILE WINDOW AND BIOMARKERS: A REVIEW AND ANALYSIS OF NORMAL OVULATION CYCLES."* Persona y Bioética 15(2): 149-165.

Muriel, V. P. and N. O. Serrano (2004). *"Mechanisms, models and risks of radiation carcinogenesis."* Revista de Oncología 6(9): 506-514.

Murillo, R., J. Luna, et al. (2010). *"Cervical cancer screening with naked-eye visual inspection in Colombia."* International Journal of Gynecology & Obstetrics 109(3): 230-234.

Murta, E. F. C., M. A. H. d. Souza, et al. (2000*). "Incidence of Gardnerella vaginalis, Candida sp and human papilloma virus in cytological smears."* Sao Paulo Medical Journal 118(4): 105-108

Moody, C. A. and L. A. Laimins (2010). *"Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation."* Nature Reviews Cancer 10(8): 550.

Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD and Matchar DB (2000). *Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review.* Ann Intern Med 132(10): 810-819.

Naciones unidas (2015) www.un.org/es

Nersesyan, A., M. Kundi, et al. (2006). *"Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells."* Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers 15(10): 1835-1840.

Norton, J. F. (1941). *Biological Stains,* American Public Health Association.

Ortiz Serrano, R., C. J. Uribe Pérez, et al. (2004). *"Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino."* Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología 55: 146-160.

Organización Mundial de la Salud (2007) http://www.who.int/countries/col/es/

Parkin, D. M. and F. Bray (2006). *"The burden of HPV-related cancers."* Vaccine 24: S11-S25.

Paz, C., L. Ocampo, et al. (1992). "Chromosome fragility in lymphocytes of women with cervical uterine lesions produced by human papillomavirus." Cancer Genetics 59(2): 173-176.

Peirson L, Fitzpatrick-Lewis D, Ciliska D and Warren R (2013) *Screening for cervical cancer: A systematic review and meta-analysis.* Syst Rev 2:35.

Pelea, C. L. and J. F. González (2003). *Citología ginecológica: de Papanicolaou a Bethesda,* Editorial Complutense.

Perea, S. J. (2003). *"Giemsa stain's 100th year."* Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud 23(1): 5-18.

Piñeros, M., R. Cendales, et al. (2007). *"Pap test coverage and related factors in Colombia, 2005."* Revista de Salud Pública 9(3): 327-341.

Pitot, H. C., T. Goldsworthy, et al. (1981). *"The natural history of carcinogenesis: implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer."* Journal of Cellular Biochemistry 17(2): 133-146.

Ponce, E. L., M. Rojas, R.,, et al. (1993). *"Factores de riesgo reproductivo y cáncer cervico-uterino en la Ciudad de México."* Salud pública de México 35(1): 65-73.

Ricci, P., E. Perucca, et al. (2004). *"Citología de base líquida: revisión de la historia y los estudios al respecto."* Revista chilena de obstetricia y ginecología 69(3): 256-262.

Rincón, O. L., L. R. Pareja, et al. (2016). *"Virus del Papiloma Humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja."* Revista colombiana de obstetricia y ginecología 58(3): 202-212.

Rosell, J. E., D. A. Muñoz, et al. (2007). *"Factores de riesgo del cáncer de cuello uterino."* Revista Archivo Médico de Camagüey 11(1): 0-0.

Rogovskaya, S., G. Sukhikh, et al. (2001). *"Apoptosis in woman uterine cervix in pathologies associated with human papillomavirus."* Bulletin of experimental biology and medicine 131(6): 576-582.

Ruiz, P. A., E. C. L. Ponce, et al. (2005). *Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y control*, Ed. Médica Panamericana.

Samanta, S., P. Dey, et al. (2011). *"Micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma."* Acta cytologica 55(1): 42-47.

Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, et al. (2004). *"Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints."* Annual review of biochemistry 73(1): 39-85.

Sawaya GE, Sung HY, Kinney W, Kearney KA, Miller MG and Hiatt RA (2005): *Cervical Cancer after Multiple Negative Cytologic Tests in Long-Term Members of a Prepaid Health Plan,* Acta Cytol 49: 391-397.

Schiffman, M., P. E. Castle, et al. (2007). *"Human papillomavirus and cervical cancer."* The Lancet 370(9590): 890-907.

Schmid, W. (1975). *"The micronucleus test."* Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 31(1): 9-15.

Schütze, D. M., O. Krijgsman, et al. (2016*). "Immortalization capacity of HPV types is inversely related to chromosomal instability."* Oncotarget 7(25): 37608.

Scott, M. L., D. T. Coleman, et al. (2018). "Human papillomavirus type 16 E5-mediated upregulation of Met in human keratinocytes." Virology 519: 1-11

Sellors, J. W. and R. Sankaranarayanan (2003). *La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: manual para principantes*, International Agency for Research on Cancer.

Shi, Y.-H., B.-W. Wang, et al. (2015). *"Association between micronucleus frequency and cervical intraepithelial neoplasia grade in Thinprep cytological test and its significance."* International journal of clinical and experimental pathology 8(7): 8426.

Shoji, Y., M. Saegusa, et al. (1996). *"Correlation of apoptosis with tumour cell differentiation, progression, and HPV infection in cervical carcinoma."* Journal of clinical pathology 49(2): 134-138.

Sierra T. CH., C. Y. Tafurt, et al. (2012). *"Prevalencia de citología anormal e inflamación y su asociación con factores de riesgo para neoplasias del cuello uterino en el Cauca, Colombia."* Revista de Salúd Publica= Journal of Public Health 14(1): 53.

Suárez, J. L. F., R. S. González, et al. (2015*). "Modulación de la apoptosis por el virus del papiloma humano."* Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social 53(2).

Sundararajan, S. K., P. S. Natarajan, et al. (2017). *"Micronucleus Assay in Urothelial Cells in Cancer Cervix."* Journal of clinical and diagnostic research: JCDR 11(3): XC01.

Terasawa, M., A. Shinohara, et al. (2014*). "Canonical non-homologous end joining in mitosis induces genome instability and is suppressed by M-phase-specific phosphorylation of XRCC4."* PLoS genetics 10(8): e1004563.

Thomas, P., N. Holland, et al. (2009). *"Buccal micronucleus cytome assay."* Nature protocols 4(6): 825.

Thun, M. J., L. F. Apicella, et al. (2000). *"Smoking vs other risk factors as the cause of smoking-attributable deaths: confounding in the courtroom."* Jama 284(6): 706-712.

Tindle, R. W. (2002). "OPINION: *Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer."* Nature reviews. Cancer 2(1): 59.

Tolbert, P. E., C. M. Shy, et al. (1991). *"Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users."* American Journal of Epidemiology 134(8): 840-850.

Torres B, O. and M. Ramos I (2013). *"Utilidad de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico."* International journal of morphology 31(2): 650-657.

Vaidya, A., Z. Mao, et al. (2014). *"Knock-in reporter mice demonstrate that DNA repair by non-homologous end joining declines with age."* PLoS genetics 10(7): e1004511.

Vassilakos, P. Negulescu, et al. (2017) *Anatomy of the cervix, Squamocolumnar junction, Metaplastic change and Transformation zone comprehensive visual inspection of the Cervix with Acetic acid (via) and lugol's iodine (vili)* http://www.gfmer.ch/vic/

Vogelstein, B., S. Sur, et al. (2010). *"p53: the most frequently altered gene in human cancers."* Nature Education 3(9): 6.

Weintraub, J. and A. Morabia (2000). *"Efficacy of a liquid-based thin layer method for cervical cancer screening in a population with a low incidence of cervical cancer."* Diagnostic cytopathology 22(1): 52-59.

Woodman, C. B., S. I. Collins, et al. (2007). *"The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues."* Nature reviews. Cancer 7(1): 11.

World Health Organization (2007). *Control integral del cáncer cervicouterino: Publicación ocasional: Guía de Practicas Esenciales*, Organización Mundial de la Salud Genebra.

Zambrano Araque, S. E. and M. González Blanco (2015*). "Citología en base líquida: parámetros de eficacia."* Rev. obstet. ginecol. Venezuela 75(3): 187-199.

Zhang, B., P. Li, et al. (2003). *"The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-γ."* Virology 310(1): 100-108