

Identificación molecular de genotipos papilomavirus humanos en pacientes con cáncer de cuello uterino

Molecular identification of human papilloma virus genotypes in patients with cervical cancer

Dr. Juan Carlos Piña Napal; Dr. Gustavo Crespo Campos; Dr.C. Rafael Fando Calzado; Lic. Gabriel Casanova Corona; Dra. Mileidy Curbelo Toledo; Dra. María Mercedes Guerra Rodríguez.

Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey. Camagüey, Cuba.

RESUMEN

Fundamento: la principal causa para el cáncer cervico uterino es el papilomavirus humano de alto riesgo. No existen antecedentes de estudios moleculares para la tipificación de papilomavirus humano en la población de Camagüey. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de Biología Molecular que se ha usado desde siempre para el diagnóstico clínico; esta permite confirmar la presencia del ADN del Papilomavirus en el ADN total extraído a partir de muestras de pacientes con cáncer de cuello uterino.

Objetivo: demostrar por primera vez los genotipos papilomavirus humano de alto riesgo circulantes, que causan cáncer de cuello uterino en la población femenina de Camagüey, Cuba.

Métodos: se realizó un estudio analítico prospectivo donde se estudiaron 22 pacientes femeninas de la provincia de Camagüey, que fueron atendidas en la consulta de Patología de cuello del Hospital Ginecoobstétrico. La identificación y tipificación de los genotipos papilomavirus humano se realizó mediante el procedimiento molecular polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción.

Resultados: el 63, 6 % de los pacientes presentaron lesiones tipo exofítica, el 4, 5 % endofítica y el 31, 8 % de otros tipos. Este estudio confirmó que los genotipos papilomavirus humanos de alto riesgo circulantes en la provincia Camagüey son los genotipos 16 y 31, donde el más frecuente fue el genotipo 16.

Conclusiones: la presente investigación constituye el primer reporte de un estudio molecular de papilomavirus humanos a partir de muestras de pacientes con cáncer de cuello uterino en la provincia de Camagüey, Cuba. Estos resultados, junto a los obtenidos por otros autores, tienen una contribución importante en el diseño de preparados vacunales preventivos o terapéuticos, cada vez más efectivo

hacia una solución anticipada para el cáncer de cuello uterino en Cuba.

DeCS: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA; POLIMORFISMO DE LONGITUD DEL FRAGMENTO DE RESTRICCIÓN; PAPILOMAVIRUS HUMANO 16; NEOPLASIAS DEL CUELLO UTERINO; MÉTODOS ANALÍTICOS DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

ABSTRACT

Background: it is demonstrated that the main cause of cervical cancer is high risk human papilloma virus. There is no precedent of molecular studies for the typing of Human Papilloma Virus in the population of Camagüey. Polymerase chain reaction is Molecular Biology technique that has been used traditionally for the clinical diagnosis and other purposes. This technique allows confirming the presence of papillomavirus DNA in the total extracted DNA, from samples of patients with cervical cancer.

Objective: to demonstrate for the first time existing high-risk human papilloma virus genotypes that cause cervical cancer in female population of Camagüey, Cuba.

Methods: a prospective analytic study was conducted, in which 22 female patients of the province of Camagüey were studied. They received medical attention at Ana Betancourt Hospital. Identification and typing of the Human Papilloma Virus genotypes was carried through the molecular procedure Restriction Fragment Length Polymorphism.

Results: patients who presented exophytic lesions accounted for 63, 6%, 4, 5 % had endophytic type, and 31, 8 % presented other types. This study confirmed that high-risk Human Papilloma Virus genotypes existing in the province of Camagüey are genotypes 16 and 31, and the most frequent is 16.

Conclusions: this research is the first report of a molecular study of Human Papilloma Virus from samples of patients with cervical cancer in the province of Camagüey, Cuba. These results, along with the ones obtained by other authors, make an important contribution in the design of the increasingly effective therapeutic and preventive vaccine to an anticipated solution to cervical cancer in Cuba.

DeCS: POLYMERASE CHAIN REACTION; POLYMORPHISM, RESTRICTION FRAGMENT LENGTH; HUMAN PAPILOMAVIRUS 16; UTERINE CERVICAL NEOPLASMS; ANALYTIC SAMPLE PREPARATION METHODS.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CCU) es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres a nivel mundial con 528 000 casos nuevos cada año, de ellos 83 000 corresponde a América. De este número elevado de casos nuevos diagnosticados en el mundo, mueren unas 266 000 mujeres que representa un 50,3 %, y se espera que para el 2030 mueran unas 474 000 mujeres cada año.¹⁻⁷ En Cuba, aunque en algunos años ha descendido, se ha observado con el transcurso de los años que el número de

pacientes con CCU ha tenido una visible tendencia al aumento, basta decir que en el año 1985 se reportaron solo 780 casos, para el año 1990 ascendió este número a 1 123, 1 386 en el año 2000, hasta 1 645 en el 2009 y para el año 2013 llegaron a 1 276 casos registrados.⁸⁻¹⁰

Los reportes de casos nuevos en la provincia de Camagüey muestran de igual modo el crecimiento del número de pacientes con CCU, se mantuvo por muchos años como una de las provincias de mayor incidencia, a pesar de

haberse registrado una ligera tendencia a disminuir el número de casos. En el año 2010 se reportaron 132, 81 casos en el año 2011, 122 casos en el año 2012

Se reconocen hasta la fecha alrededor de 205 genotipos papilomavirus humanos (PVH) de los cuales 195 han sido secuenciados en su totalidad.^{11, 12} El genoma es un ADN circular de doble cadena con una talla, que puede variar para los diferentes genotipos PVH, unos 8000 pb. Los genotipo de alto riesgo más importantes para el CCU son: 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 donde el más común en el cáncer cervical es el tipo 16, este se detecta en más del 50 % de todos los casos. Los de bajo riesgo más importantes son: 6,11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81.^{13, 14}

Se ha demostrado que la principal causa que desarrolla el CCU, en más del 99 % de los casos, es el papilomavirus humano de alto riesgo (PVH-AR),^{15, 16} pues hoy entre los investigadores es bien conocida, la alta incidencia y la comprobada asociación que tiene la infección del PVH-HR con el cáncer cervical.¹⁷ Ya en 1984 Harald Zur H, et al,¹⁸ había planteado que el papilomavirus humano era la causa más relacionada con el cáncer cérvico uterino y por este descubrimiento recibió el Premio Nobel en el año 2008.¹⁹

Uno de los principales desafíos de las pesquisas del cáncer de cuello uterino es detectar las lesiones que tienen alto riesgo de progresar hacia el CCU. Para evitar la progresión se ha utilizado siempre, la citología o método de *Papanicolaou*, sin embargo, esta última tiene una tasa de falsos negativos alta²⁰ y no es un método confirmatorio de la presencia del PVH. Esta validación es posible hacerla ya que demuestra la presencia del ADN del PVH en el ADN total extraído, a partir de muestras de pacientes con CCU y no a través del coilocito, observado en la citología, signo indirecto de la presencia del PVH. Por otro lado, el método de *Papanicolaou* no permite tipificar el genotipo PVH-AR causante del CCU.

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP), es una técnica de Biología Molecular que se ha

usado para el diagnóstico clínico y para distintos fines en la Ingeniería Genética. La misma, puede ser utilizada para la identificación y caracterización de los genotipos de diferentes microorganismos que incluyen el PVH.^{21, 22}

De aquí se desprende la importancia del estudio de los PVH-AR que causan el CCU. Por otro lado, no existen antecedentes de estudios moleculares previos para la tipificación de PVH de alto riesgo en la población de Camagüey, por lo que se decide realizar la presente investigación que tiene, como propósito principal, demostrar por primera vez, los genotipo PVH-AR circulantes que causan CCU en la población femenina de Camagüey.

MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico prospectivo, donde se estudiaron 22 pacientes femeninas de la provincia de Camagüey que fueron atendidas en la consulta de patología de cuello del Hospital Ginecoobstétrico de Camagüey " Ana Betancourt de Mora" en el año 2013, con diagnóstico positivo de CCU.

Técnicas y procedimientos

Toma de muestras

La toma de muestra se realizó a partir de las lesiones de cuello uterino en el momento del examen físico. De las muestras tomadas se obtuvieron dos fragmentos suficientes para la realización de la biopsia confirmativa del CCU y para la extracción de ADN destinadas a estudios moleculares del PVH-AR. Los fragmentos de muestras para estudio moleculares fueron conservados en congelación en tubos *ependorf* de 1, 5 ml y luego fueron transportadas en hielo hasta el laboratorio, donde se conservaron en congelación hasta el momento de su procesamiento.

Extracción del ADN de las muestras

Las muestras de tejido de cuello uterino fueron procesadas según el protocolo de *Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega Corporation*,²³ para ello los fragmentos de tejido se colocaron en tubo *ependorf* de 1, 5 ml, a los

cuales se les añadieron 275 µl de la solución de digestión *Master Mix* que contenía proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL (*Applichem*), y se incubaron en baño de maría por 16 horas a 55 °C. Después los tubos se centrifugaron a 2 000 x g (*Kokusan H-1 500 fs*, Japón), el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo *ependorf* de 1,5 ml y se les añadió 250 µl de *Lysis Tampón*, cada lisado de la muestra se transfirió a una minicolumna ensamblada de forma independiente. Se centrifugaron las minicolumnas ensambladas a 13 000 x g por 3 min. Se desechó el líquido recogido en los tubos recolectores. Luego se hicieron cuatro pasos de lavado a las minicolumnas ensambladas con 650 µl solución de lavado y se centrifugó cada minicolumna a 13 000 x g por 1 min. Luego de esto se agregaron 250 µl de agua libre de nucleasas a temperatura ambiente y se incubaron durante dos minutos a temperatura ambiente. Por último las minicolumnas ensambladas se centrifugaron a 13 000 x g para luego colocarle un tubo *ependorf* nuevo y recoger la elusión. Se eliminaron las minicolumnas y el ADN extraído fue almacenado a -20°C.

Tipificación de papilomavirus humano

Para tipificación de los PVH primero se diseñó un algoritmo diagnóstico, donde fueron escogidas las enzimas de restricción necesarias que propiciaron la generación de patrones de bandas diferenciales que permitieron distinguir cada genotipo a partir del segmento de ADN amplificado por RCP, estos segmentos fueron amplificados donde se usaron los cebadores consensos MY09/11.²⁴ Con este propósito se buscaron las secuencias de los PVH-AR en las bases de datos de NCBI, *GenBank*,²⁵ se analizaron las secuencias en el *software Generunner*, se localizó la secuencia amplificada por RCP y los sitios cortos de varias enzimas de restricción. Luego se utilizó el procedimiento RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) Polimorfismo de Longitud en los Fragmentos de Restricción (PLFR), mediante RCP seguido de un estudio de restricción.

Los cebadores consensos MY09/11 usados en la

RCP, reconocen una secuencia nucleotídica complementaria en el gen L1 de varios PVH-AR y PVH de bajo riesgo oncogénico (PVH-BR), para generar un segmento de ADN de 450 pares de bases (pb). Como control negativo se utilizó ADN genómico humano de paciente no infectado con PVH y como control interno de amplificación nos auxiliamos de los cebadores PC04/GH20, que generan un segmento de ADN de 268 pb a partir del gen que codifica para la proteína β globina humana.

Para la RCP se fijaron en el termociclador (*MultiGene TC050-18*, Suecia) los siguientes parámetros: desnaturalización inicial 5 min. a 95 °C, y luego se realizaron 40 ciclos, consistente en desnaturalización 1 min. a 95 °C, hibridación 1 min. a 55 °C, extensión 2 min. a 72 °C. Después de los ciclos se realizó una extensión larga de 15 min. a 72 °C. Cada muestra fue amplificada con los cebadores consensos MY09/11 (20 pmol de cada cebador) en presencia de Tampón Taq. Pol (1X) (*Applichem*, Alemania), MgCl₂ (1,5 mmol) (*Applichem*, Alemania), dNTP (200 µmol de cada dNTP) (*Applichem*, Alemania), Taq. Polimerasa (1U.) (*HeberBiotech*, Cuba) y agua bidestilada estéril hasta completar un volumen final de 50 µl.

Las enzimas de restricción utilizadas fueron: Pst I (*Applichem*, Alemania), Dra I (*New England BioLab*, Reino Unido), EcoRI (*Applichem*, Alemania), Msp I (*New England BioLab*, Reino Unido). Estas fueron seleccionadas según el algoritmo diagnóstico.

Secuenciación del producto del PCR

Los fragmentos amplificados, del gen L1 del genoma de PVH, por RCP a partir del ADN purificado de cada muestra de pacientes fueron secuenciados. La secuenciación fue realizada por la compañía *MacroGen* (Seúl, Corea del Sur), con el apoyo y la coordinación del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) de La Habana, Cuba.

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a análisis de alineamiento de secuencias mediante la herramienta *Basic Local Alignment Tool*

(BLAST),²⁶ desarrollada por los Institutos Nacionales de Salud y se puede acceder a ella desde el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), ubicado en la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de América (NLM).

Procesamiento de los datos

Con los datos obtenidos se llenó el formulario de recogida de datos, que constituyó la fuente primaria de información. Los datos fueron introducidos y procesados en el programa SPSS ver. 15 para *Windows* y para obtener los resultados se utilizaron medidas de la estadística descriptiva como distribución de frecuencias absolutas y porcentos.

RESULTADOS

Los 22 pacientes que entraron en el estudio pertenecen a la provincia de Camagüey. En 14 pacientes se encontró lesiones tipo exofítica para un 63, 6 %, en un paciente se encontró lesión tipo endofítica para un 4, 5 % y en siete pacientes se presentaron otros tipos de lesiones para un 31, 8 % (gráfico 1).

Se tomaron suficientes muestras de las lesiones para el estudio histológico por biopsia y para el estudio molecular por PLFR.

Se purificó ADN genómico a partir de las muestras de cuello uterino obtenidas de cada

paciente y su calidad fue verificada por electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0, 8 %.

Se amplificó por RCP un segmento de 450 pb a partir del gen L1 del genoma de PVH, a partir del ADN extraído de cada muestra obtenida de lesiones de cuello uterino de los 22 pacientes con diagnóstico positivo de CCU, para un 100 % de positividad.

El procedimiento PLFR puede identificar once genotipos PVH-AR y siete genotipos PVH-BR. Todos los pacientes que se incluyeron en la investigación pudieron ser estudiados mediante este procedimiento, en los cuales fue posible comprobar la presencia de solo dos genotipos PVH-AR. Se identificó en 21 pacientes el genotipo PVH-AR 16 para un 95, 4 % y solo se identificó el genotipo PHV-AR 31 en un solo paciente para un 5, 6 %. En ninguno de los pacientes estudiados se constató la presencia de infecciones múltiples con varios genotipos PVH-AR. (gráfico 2).

Los resultados de la secuenciación de los segmentos amplificados por RCP a partir de cada muestra de pacientes fueron sometidas al análisis de alineamiento de secuencias, a través de la herramienta BLAST de la NCBI. Este análisis confirmó que las secuencias sometidas al análisis tenían una homología de más de un 99 %, con las secuencias reportadas en esta base de dato, para las secuencias del gen L1 de los genomas del PVH-AR 16 y del PVH-AR 31.

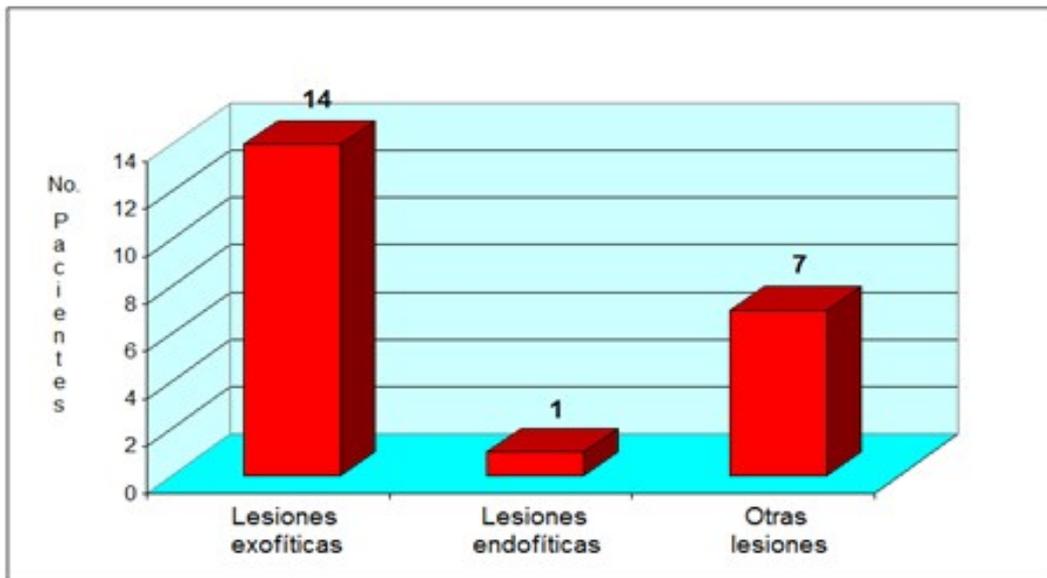


Gráfico 1. Distribución de las lesiones encontradas en el cuello uterino de los 22 pacientes estudiados.

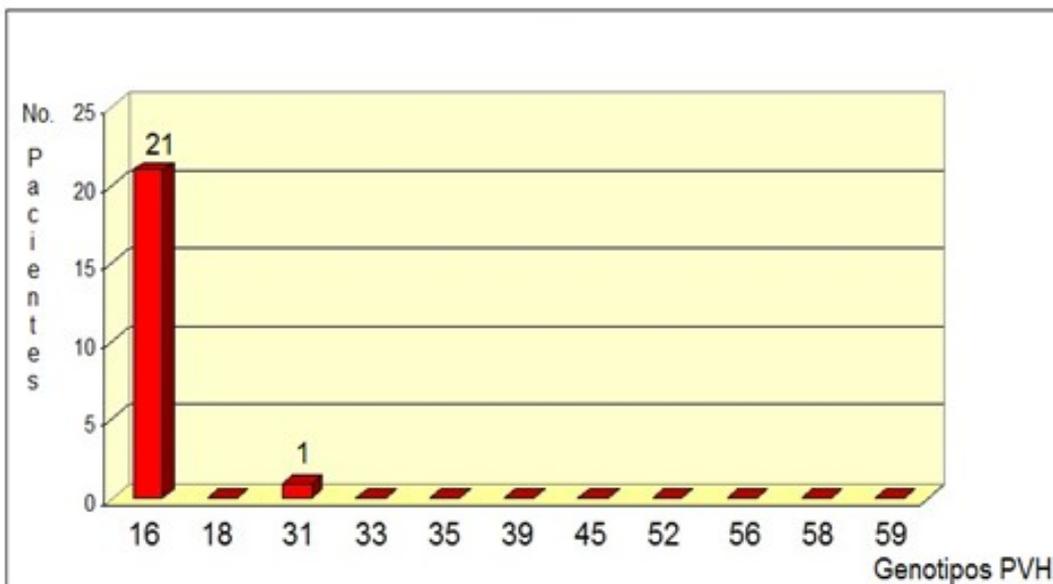


Gráfico 2. Distribución de genotipos PVH-AR identificados en los 22 pacientes en estudio, mediante el procedimiento PLFR.

DISCUSIÓN

En el mundo se han realizado numerosos investigaciones moleculares en la temática PVH en cáncer de cuello uterino,²⁷ sin embargo hoy en día existe muy poca información de la población cubana en relación a los genotipos circulantes en las distintas provincias de Cuba. Como antecedentes está reportado el trabajo de Río Hernández M. A, et al,²⁸ quienes realizaron

una investigación con 45 pacientes, 44 pacientes de La Habana y un paciente de provincia de Las Tunas. En este caso los estudios moleculares no se realizaron en Cuba sino en coordinación con la Agencia Internacional para Investigaciones en el Cáncer *International Agency for Research on Cancer* (IARC), y realizados en Francia. En la misma los genotipos PVH-AR detectados fueron

16, 18, 31, 39, 45, 51; donde el más frecuente fue el genotipo PVH-AR 16. En ese sentido, en la investigación, los estudios moleculares se hicieron en los laboratorios de las ciencias básicas de la Universidad de Ciencias Médicas, Camagüey, Cuba, donde de igual manera se detectaron los genotipos PVH-AR 16 y 31, no fue así para los genotipos PVH-AR 18, 39, 45 y 51, que no fueron encontrados en los pacientes. No obstante, se coincide con los resultados obtenidos en la investigación de la autora, en que el genotipo más frecuente fue el PVH-AR 16.

En los trabajos realizados por Soto Brito Y, et al,^{29, 30} se han realizado estudios moleculares del PVH muy importantes, donde el propósito fundamental ha sido determinar la sensibilidad, factibilidad y normalización de la técnica de RCP cualitativa y cuantitativa.

En el caso del trabajo de la RCP cualitativa, cuyo objetivo fundamental es la sensibilidad y factibilidad del RCP, se estudiaron 10 pacientes con identificación y tipificación de los PVH de los genotipos PVH-AR 16, 18, 31 así como el 33 y no se hace referencia al genotipo más frecuente. En el mismo, se toma como referencia para la evaluación de la especificidad, la comparación de los resultados de restricción con los sistemas celulares Hela, Siha y CaSki, los genomas completos clonados en el plásmido pBR 322 y la comparación de los patrones de digestión obtenidos en ensayos similares realizados por otros investigadores para la detección del PVH.²⁹

A pesar de que este trabajo pueda ser el primer intento en Cuba de estudios moleculares del PVH en pacientes con CCU, es conveniente considerar que la verdadera comprobación de la especificidad de los resultados debe hacerse por secuenciación nucleotídica del producto de la RCP, pues esta última confirma si se amplificó o no la secuencia ADN única o particular del gen E1 por RCP o no.

Por otro lado, la garantía y el nivel de confianza que ofrece la secuenciación no se puede obtener mediante la comparación de los resultados

obtenidos con las líneas celulares que se utilizaron, los genomas clonados o la similitud con los patrones de banda obtenidos en las electroforesis por otros investigadores. En este sentido el trabajo que se presenta ofrece ventajas porque se pudo identificar, también tipificar el genoma de los genotipos PVH-AR y por último fue posible secuenciar el producto del RCP, todo lo cual llevó a la confirmación de la tipificación de los genotipos PVH-AR.

En el caso mencionado con anterioridad se realiza RCP cuantitativa o RCP en Tiempo Real,³⁰ se estudiaron 20 muestras de mucosa esofágica y 20 muestras de células cervicouterinas de pacientes que acudieron al Hospital Ginecobtétrico Eusebio Hernández de Ciudad Habana. Todas las muestras fueron examinadas por RCP, luego los productos fueron sometidos a secuenciación nucleotídica. En las muestras de células cervicouterinas se identificaron y tipificaron los genotipos PVH-AR 16, 18, 31, 33 y 58, donde coincide con el estudio de la RCP cualitativa, de Soto Brito Y, et al,^{29, 30} excepto en el genotipo PVH-AR 58. El PVH-AR 16 fue el más frecuente, seguido de los genotipos PVH-AR 33 y 18.

En la investigación presentada se incluyeron solo los pacientes de la provincia de Camagüey, y los resultados obtenidos coinciden con los de Soto Brito, et al,²⁹ en la demostración los genotipos PVH-AR 16 y 31, no son así para los genotipos PVH-AR 18, 33 58. Se constató una vez más que el genotipo más frecuente fue el PVH-AR 16.

Serra Valdés MA, et al,³¹ ha realizado estudios moleculares en PVH, pero los mismos no son comparable con la investigación que se realizó, aunque se hicieron estudios molecular del PVH mediante la técnica de RCP, estos PVH en estos pacientes no causaron cáncer de cuello uterino sino cáncer colonrectal, además de que se estudiaron solo nueve pacientes en los cuales solo se pudo identificar la presencia del PVH en tres de ellos y no se tipificó el genotipo PVH en ninguno de los casos.

Hasta el momento no existen, o al menos, no se

ha encontrado otros estudios moleculares del PVH en cáncer de cuello uterino excepto una investigación realizada en la provincia de La Habana.²⁸⁻³⁰

El genotipo PVH-AR 16 resultó ser el más frecuente en las provincias de la Habana²⁸⁻³⁰ y Camagüey. Mientras no se realicen otras investigaciones en las restantes provincias que contribuyan a reforzar estas conclusiones o se sumen otros genotipos además de los dos reportados en frecuencia y distribución, los resultados presentados, comparados y discutidos en la presente investigación deben ser considerados a la hora de abordar las causas moleculares, determinantes y predicciones del CCU en Cuba.

Es necesario destacar la contribución de estos resultados, en el diseño de preparados vacunales preventivos o terapéuticos cada vez más efectivo en una solución anticipada para el cáncer de cuello uterino en Cuba.

CONCLUSIONES

El cáncer cérvico uterino es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial. En Cuba y en específico en la provincia de Camagüey, se ha observado con el transcurso de los años que el número de pacientes con cáncer cervico uterino ha tenido una visible tendencia al aumento. La presente investigación constituye el primer reporte de un estudio molecular de PVH, a partir de muestras de pacientes con cáncer de cuello uterino en la provincia de Camagüey, Cuba. El tipo de lesiones que más se presentó fue la exofítica. Se confirmó que los genotipos PVH-AR circulantes en la provincia de Camagüey son los genotipos 16 y 31, donde el más frecuente es el PVH-AR 16.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra: OMS; c1995-2015 [actualizado 12 Ene

2016; citado 4 Jun 2015]. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012; [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>

2. Domínguez Alonso E, Santana Pérez F, Armando Seuc H, Galán Álvarez Y. Años de vida ajustados por discapacidad por cáncer de mama y del sistema reproductor en mujeres cubanas en edad fértil. MEDICC Review [Internet]. 2014 [citado 10 Sep 2015];selección:[aprox. 7 p.]. Disponible en: <http://www.medicc.org/mediccreview/pdf.php?lang=es&id=480>

3. Justin OP, Madhulika V. Cervical cancer and the global health agenda: Insights from multiple policy-analysis frameworks. Global Public Health [Internet]. 2013 [citado 2015 Jun 4];8(10): [about 16 p.]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3877944/pdf/rgph8_1093.pdf

4. Azin N, Maryam H, Ahmad BM, Fatemeh T. A Systematic Review of Economic Aspects of Cervical Cancer screening. Asian Pac J Cancer Prev [Internet]. 2014 [citado 2015 Sep 10];15(19):[about 8 p.]. Available from: http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume15_No19/8229-8237%206.14%20Azin%20Nahvijou.pdf

5. Obel J, Souares Y, Hoy D, Baravilala W, Garland SM, Kjaer SK, et al. A Systematic Review of Cervical Cancer Incidence and Mortality in the Pacific Region. Asian Pac J Cancer Prev [Internet]. 2014 [citado 2015 Sep 10];15:[about 4 p.]. Available from: http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume15_No21/9433-9437%209.12%20Josephine%20Obel.pdf

6. McGraw SL, Ferrante JM. Update on prevention and screening of cervical cancer. World J Clin Oncol [Internet]. 2014 [citado 2015 Sep 10];5(4):[about 8 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4129537/pdf/WJCO-5-744.pdf>

7. Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S, Tommasino M.

Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancel* [Internet]. 2015 [citado 2015 Sep 10];9:[about 7 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431404/pdf/can-9-526.pdf>

8. Anuario Estadístico de Salud 2013 [Internet]. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud y el Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 2014 [citado 10 Jun 2015]. Casos positivos de cáncer cérvico-uterino en mujeres examinadas por el programa según etapa clínica. (1990;1995-2013); [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: <http://files.sld.cu/dne/files/2014/05/anuario-2013-esp-e.pdf>

9. Anuario Estadístico de Salud 2009 [Internet]. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud y el Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 2010 [citado 10 Jun 2015]. Casos positivos de cáncer cérvico-uterino en mujeres examinadas por el programa según etapa clínica. 1986-2009; [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: <http://files.sld.cu/bvscuba/files/2013/05/anuario-2009e3.pdf>

10. Anuario Estadístico de Salud 2008 [Internet]. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud y el Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 2009 [citado 10 Jun 2015]. Casos positivos de cáncer cérvico-uterino detectados en las mujeres examinadas por el programa según etapa clínica. 1985 - 2008; [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/cgi-bin/wxis/anuario/?IsisScript=anuario/iah.xis&tag5001=mostrar^m1865&tag5009=STANDARD&tag5008=10&tag5007=Y&tag5003=anuario&tag5021=e&tag5022=2008&tag5023=1865>

11. Boštjan JK, Anja Š, Lea H, Diego C, Elisa B, Adriana AG, et al. Genome announcement: complete genome sequence of a novel Mupapillomavirus, HPV204. *Acta Dermatovenerol APA* [Internet]. 2015 [citado 2015 Sep 10];24:[about 3 p.]. Available from:

<https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/thejournalhub/10.15570/actaapa.2015.7/actaapa.2015.7.pdf>

12. Hošnjak L, Kocjan BJ, Pirš B, Seme K, Poljak M. Characterization of Two Novel Gammapapillomaviruses, HPV179 and HPV184, Isolated from Common Warts of a Renal-Transplant Recipient. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 8];10(3):[about 18 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351898/pdf/pone.0119154.pdf>

13. López-Revilla R. Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2008 Feb 28 [citado 2015 Oct 9];3(3):[about 12 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2294112/pdf/1750-9378-3-3.pdf>

14. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 [citado 2015 Oct 9];348:[about 10 p.]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa021641>

15. Ghosh SK, Choudhury B, Hansa J, Mondal R, Singh M, Duttagupta S, et al. Human Papillomavirus Testing for Suspected Cervical Cancer Patients from Southern Assam by Fast-PCR. *Asian Pacific J Cancer Prev* [Internet]. 2011 [citado 2015 Oct 9];12:[about 3 p.]. Available from: http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume12_No3/749-51%20c%202.8.Sankar%20Kumar%20Ghosh.pdf

16. Tseng C, Trimble C, Zeng Q, Monie A, Alvarez RD, Huh WK, et al. Low-dose radiation enhances therapeutic HPV DNA vaccination in tumor-bearing hosts. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2009 May [citado 2015 Sep 10];58(5):[about 12 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647576/pdf/nihms-70061.pdf>

17. Kim KH, Greenfield WW, Cannon MJ, Coleman HN, Spencer HJ, Nakagawa M. CD4+ T-Cell Response Against Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein Is Associated with a Favorable Clinical Trend. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2012 Jan [citado 2015 Sep 10];61(1):[about 8 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374341/pdf/nihms380403.pdf>
18. Harald ZH, Gissmann L, Schlehofer JR. Viruses in the etiology of human genital cancer. *Prog Med Virol*. 1984;30:1-17.
19. The Nobel Prize [Internet]. Suecia: The Official Web site of the nobel prize; c-2016 [actualizado 2016 Abr 12; citado 2015 Sep 11]. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008; [about 1 pantallas]. Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/.
20. Jairo Amaya G, Restrepo Palacio S. Tamizaje para cáncer de cuello uterino: cómo, desde y hasta cuándo. *Rev Colomb Obstet Ginecol* [Internet]. 2005 [citado 9 Oct 2015];56(1): [aprox. 8 p.]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v56n1/v56n1a07.pdf>
21. Hesselink AT, Berkhof J, van der Salm ML, van Splunter AP, Geelen TH, van Kemenade FJ, et al. Clinical Validation of the HPV-Risk Assay, a Novel Real-Time PCR Assay for Detection of High-Risk Human Papillomavirus DNA by Targeting the E7 Region. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 [citado 2015 Sep 10];52(3):[about 7 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957775/pdf/zjm890.pdf>
22. Eklund C, Forslund O, Wallin K-L, Dillner J. Global Improvement in Genotyping of Human Papillomavirus DNA: the 2011 HPV LabNet International Proficiency Study. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 [citado 2015 Sep 10];52(2): [about 11 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911320/pdf/zjm449.pdf>
23. Promega Corporation [Internet]. Madison: Promega; 2013 [update 2016 Abr 12; citado 2013 Jan 15]. Wizard SV Genomic DNA Purification System (Technical Bulletin) 2009; [about 16 pantallas]. Available from: <http://www.promega.com/%7E/media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/wizard%20sv%20genomic%20dna%20purification%20system%20protocol.pdf?la=en>
24. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi T, Wheeler CM, Coutlee F, Hildeshe A, et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000 Jan [citado 2015 Oct 9];38(1):[about 4 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88724/pdf/jm000357.pdf>
25. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Bethesda MD: NCBI; [update 2016 Mar 11; citado 2013 Jan 16]. Genbank; [about 1 screens]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
26. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Bethesda MD: NCBI; [update 2016 Mar 11; citado 2016 Feb 7]. BLAST; [about 1 screens]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
27. Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* [Internet]. 2010 [citado 2015 Nov 8];202:[about 11 p.]. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/content/202/12/1789.full.pdf+html>
28. Ríos Hernández MA, Hernández Menéndez M, Aguilar Vela de Oro FO, Silveira Pablos M. Tipos de papilomavirus humanos más frecuentes en muestras cubanas de cáncer cervical. *Rev Cubana Obstet Ginecol* [Internet]. 2010 [citado 9 Oct 2015];36(2):[aprox. 8 p.]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v36n2/gin09210.pdf>
29. Soto Y, Muné M, Goicolea A, Morales E, Santoyo JM, Valdés O, et al. Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de

Papillomavirus humano. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 1998 [citado 11 jun 2015];50(3): [aprox. 9 p.]. Disponible en:

http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol50_3_98/mtr04398.pdf

30. Soto Brito Y, Kourí Cardellá V, Martínez Rodríguez PA, Correa Sierra C. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación de papilomavirus humano de alto riesgo oncogénico.

VacciMonitor [Internet]. 2012 [citado 12 Oct 2015];21(1):[aprox. 7 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v21n1/vac07112.pdf>

31. Serra Valdés MA, Fojo Mallo AW, González Valera N, Cardosa Samón M, García Tassé M, Aleaga Hernández YY. Infección por papilomavirus humano y cáncer esofágico: reporte de caso.

Medwave [Internet]. Oct 2012[citado 11 Jun 2015];12(9):[aprox. e5531 p.]. Disponible en: <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Estudios/Casos/5531?ver=sindisenio>

Recibido: 4 de febrero de 2016

Aprobado: 31 de marzo de 2016

Dr. Juan Carlos Piña Napal. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Master en Genética Médica. Profesor Asistente. Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey. Camagüey, Cuba. Email: jcpina.cmw@infomed.sld.cu