

Factores histológicos relacionados con resultados discordantes entre la biopsia y la prueba de ADN, en el diagnóstico del virus papiloma humano (VPH).

Histological factors associated with discordant results between biopsy and DNA testing in the diagnosis of human papillomavirus (HPV).

Rubén Toro¹, Aldo Reigosa², Julio Castro¹, Adriana Contreras², María Del Villar², Pamela González², Maritza Álvarez³

RESUMEN

El diagnóstico de la infección cervical ocasionada por el virus del papiloma humano (VPH), se realiza básicamente a través de la biopsia y/o de métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados de estos estudios en ocasiones no coinciden. En este estudio se evalúa la posible influencia de diferentes factores asociados a resultados falsos positivos y a falsos negativos de ambas pruebas. Se analizaron 271 muestras de cuello uterino de pacientes que acudieron a la consulta ginecológica durante el período 1999-2009, a las cuales se les tomó biopsia por presentar hallazgos colposcópicos y/o citológicos sospechosos de infección por VPH. Tomando en consideración al resultado de PCR como prueba estándar de oro, la biopsia presentó 14% de falsos positivos y 16,6% de falsos negativos, el diagnóstico de VPH en biopsia y PCR presentó mayor concordancia cuando las muestras abarcan la zona de transformación endo-exocervical, así como la presencia de metaplasia escamosa en la muestra y el tamaño del fragmento mayor (>0,5 cm); mientras que el tiempo de fijación, el tipo e intensidad de la inflamación, la hemorragia y la erosión del epitelio no fueron significativos. En conclusión, a fin de disminuir la discrepancia de los resultados entre la biopsia y prueba de ADN, sería importante que la muestra de biopsia incluya la zona de transformación del cuello uterino y al menos un fragmento mayor de 0,5 cm.

Palabras clave: VPH, PCR, biopsia, metaplasia.

ABSTRACT

The diagnosis of cervical infection caused by human papilloma virus (HPV) is made basically through the biopsy and/or molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR). The results of these studies sometimes do not match. In this work is evaluated the possible influence of different factors associated with results false positive and false negative of both tests. Were analyzed 271 samples from uterin cervix of patients presenting to the gynecologist during the period 1999-2009, to which were taken biopsies due present findings colposcopic and/or cytological suspicious of HPV infection. Considering the result of PCR as gold standard test, biopsy showed 14% false positive and false negative 16.6%, the diagnostic of VPH in biopsy and PCR showed greater concordance when samples include endo-exocervical transformation zone, and the presence of squamous metaplasia in the sample and size of the largest fragment (>0.5 cm); while the fixation time, the type and intensity of inflammation, bleeding and erosion of the epithelium were not significant. In conclusion, in order to reduce the discrepancy between the results of the biopsy and test DNA, it is important that the biopsy sample includes the transformation zone of the uterin cervix and at least one fragment greater than 0.5 cm.

Key words: HPV, PCR, biopsy, metaplasia.

INTRODUCCIÓN

El virus papiloma humano (VPH) es un virus de ADN, epiteliotropo, considerado como el causante principal del carcinoma de cuello uterino, que sigue siendo en la mayoría de países en vías de desarrollo, una de las principales causas de mortalidad por cáncer en la mujer, precedida en algunos países por el cáncer de mama (1-3).

Para que la infección por el VPH sea productiva, el virus debe llegar a la capa basal del epitelio y multiplicarse dentro de la célula infectada del epitelio plano estratificado, donde puede producir cambios morfológicos como acantosis, hípico o paraqueratosis, micro o macro papilomatosis, hiperplasia de células basales y más característicamente coilocitosis (4-6).

Estas alteraciones, a su vez, pueden originar modificaciones que se evidencian al examen colposcópico del cuello uterino y permiten sospechar de la infección por VPH en la consulta ginecológica (7,8).

Al estudio microscópico, sea cito o histológico, los indicios de infección por VPH se dan básicamente al observar los coilocitos, que es la alteración más característica de la

¹ Departamento de Ciencias Morfológicas y Forenses, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Universidad de Carabobo.

² Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC).

³ Genomik, Laboratorio de Biología Molecular. Maracay, Venezuela.

Autor de Correspondencia: Rubén Toro

E-mail: rubent39411@hotmail.com

Recibido: 28/01/2016 **Aprobado:** 21/06/2016

infección, en la que se observa a nivel de la célula escamosa un gran espacio claroperinuclear, producto del cúmulo de nuevas partículas virales producidas en la célula infectada (9).

No obstante, existen cambios inespecíficos o pseudocoilocíticos, ocasionados generalmente por la inflamación, la atrofia o el glucógeno, que pueden ser objeto de confusión al realizar el estudio microscópico. Se acepta que el VPH solo puede ser diagnosticado con certeza a través de pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por captura híbrida, que además informan sobre el genotipo viral y su consiguiente riesgo oncogénico (10-13).

El estudio histológico posee mayor grado de sensibilidad y especificidad que la citología para diagnosticar la infección por VPH (6,14,15); esto pudiera deberse a que la citología solo permite examinar células de la superficie del epitelio, estando los coilocitos localizados frecuentemente a mayor profundidad (16-18).

Ahora bien, la experiencia en la práctica diaria así como diversas investigaciones, evidencian discrepancias en los resultados del diagnóstico de VPH entre la biopsia y PCR, tanto de falsos positivos como falsos negativos, con las consecuentes implicaciones clínicas y psicológicas para las pacientes y la duda para el médico tratante sobre la conducta a seguir (18-21).

La referida falta de concordancia pudiera estar relacionada con factores asociados a la técnica de PCR o al estudio histológico (22, 23). En este estudio se pretende evaluar diferentes factores o alteraciones tisulares que pudieran estar asociados a resultados discordantes entre la biopsia y el obtenido con la PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 271 muestras de biopsias de cuello uterino, a las cuales en la misma muestra, se les realizó el estudio histológico y la determinación del ADN viral a través de la PCR. Las muestras se recolectaron entre los años 1999 a 2009. Generalmente se trataba de pacientes que presentaban hallazgos sugestivos de infección por VPH a la colposcopia o en un estudio citológico previo. Las muestras de biopsia fueron procesadas e informadas en el Instituto Privado de Anatomía Patológica (IPAP) de la ciudad de Valencia, Venezuela.

Para el análisis histológico los fragmentos de tejido fueron fijados en formol y procesados según protocolo de rutina, coloreando las secciones de tejido con hematoxilina-eosina, registrándose las siguientes variables:

- Días de fijación de la muestra: partiendo de la fecha señalada en la hoja de solicitud del examen. Se registró el periodo de tiempo comprendido entre el día de la toma de la biopsia y el momento de inicio del procesamiento histológico.

- Tipo de muestra: se precisó si la muestra contenía solamente tejido de la zona exocervical, de la región endocervical (Figura 1A) o de ambas regiones del cérvix.

- Número de fragmentos: se consignó la cantidad de fragmentos descritos en el estudio macroscópico, verificando el mismo en la preparación histológica.

- Tamaño del fragmento mayor: se tomó el señalado en el examen macroscópico y revisado en la preparación histológica.

- Tipo de inflamación: el componente inflamatorio se discriminó entre crónico (linfocitos, plasmocitos, histiocitos) o reagudizado (con neutrófilos).

- Intensidad de la inflamación: esta medición fue obtenida de manera subjetiva discriminándolas en las categorías de leve, moderada y severa.

- Hemorragia: fue clasificada subjetivamente, en términos de su ausencia o presencia en el tejido evaluado. Se diferenció en leve, moderada o severa (Figura 1D).

- La metaplasia: se anotó su presencia o ausencia, sin diferenciar si era madura o inmadura (Figura 1B y 1C).

- Erosión del epitelio: se registró si había o no pérdida focal del epitelio de superficie en los fragmentos examinados.

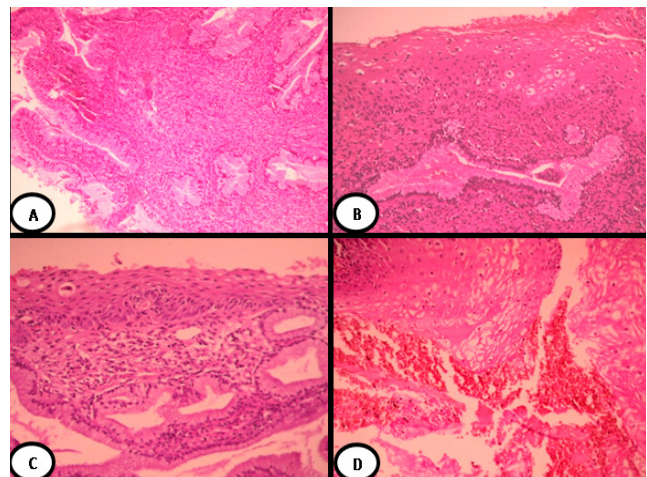


Fig. 1. Alteraciones histológicas. A: Muestra sin epitelio escamoso, solo con tejido endocervical (ectopia). B: Fragmento con metaplasia escamosa madura con coilocitos. La metaplasia es evidente al observar las glándulas endocervicales en el estroma. Además, inflamación crónica. C: Muestra con metaplasia escamosa sin coilocitos típicos. D: Muestra con hemorragia.

Todas las determinaciones fueron realizadas por dos patólogos en forma independiente y luego se cotejaron. Cuando había diferencia de opinión se revisó el caso y se llegó a un consenso. La muestra para el estudio molecular se obtuvo a partir del bloque de parafina. Se efectuaron 5 cortes de 10 μ m, se colocaron en tubos de 1,5 mL y se refrigeraron a 4°C hasta su traslado al laboratorio Genomik.

En el laboratorio, las muestras se incubaron en tampón de lisis con proteinasa K(200 μ g/mL) por 3 horas a 56°C. La

extracción se hizo siguiendo el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) pH 8 y precipitación del ADN con etanol y sales. El ADN obtenido se resuspendió en tubos Eppendorf con 50 µL de agualibre de nucleasas, conservándose a -20°C hasta su uso. La integridad del ADN fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

El estudio de PCR para la determinación de VPH se realizó mediante PCR anidada (PCR L1), usando un par de iniciadores de consenso externos MY09/MY11 y un par de iniciadores internos GP5+/GP6+ (24), dirigidos a la región L1 del VPH que amplifican un fragmento de 450 y 150 pares de bases (pb), respectivamente. Los controles positivos, fueron plásmidos recombinantes para los tipos de HPV: 6, 16 y 18. Como control blanco se reemplazó el ADN por agua desionizada. El análisis de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

En la tipificación de los subtipos virales mediante PCR-RFLP, se utilizaron primers PGMY09/PGMY11 que amplifican fragmentos de 450 bp. El producto PCR fue sometido a RFLP con las enzimas Rsa I y Dde I, cuyas secuencias específicas de corte son GT/AC y C/TNAG, respectivamente; donde "N" indica que en esa posición puede situarse cualquiera de las 4 bases. Se incubaron durante 14 horas a 37°C y los fragmentos digeridos sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

Para interpretar el polimorfismo de los fragmentos digeridos, se confeccionó un patrón de restricción para cada enzima. Las secuencias completas de los tipos más frecuentes de HPV (AR y BR), se adquirieron del GeneBank (25). Se ubicó la región L1, y dentro de ésta la posición de los iniciadores y los puntos de corte de cada enzima.

Además del resultado de la PCR, se registró la edad de la paciente. Los datos fueron procesados con el programa SPSS versión 22 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

El análisis descriptivo para cada una de las variables estudiadas se estableció a través de porcentajes y frecuencias. Se aplicó el Chi-cuadrado (χ^2), considerando significativo a los valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

La relación de los resultados de la biopsia y la PCR se presentan en la Tabla 1; donde se puede apreciar que en los casos diagnosticados como positivos para la infección por VPH mediante el estudio histopatológico, 82,5% de estos resultaron también positivos en el estudio por PCR. El porcentaje de concordancia entre ambas metodologías fue de 69,4%, al sumar los casos en los cuales ambas pruebas fueron positivas o negativas. La sensibilidad de la biopsia, si se toma a la PCR como la prueba estándar de oro, fue de 79,9%. La especificidad en cambio fue de 19,1%, con un 14% de falsos positivos y un 16,6% de falsos negativos. En doce pacientes no se pudo averiguar la edad.

Tabla 1. Resultados de la biopsia y la PCR en el diagnóstico de infección por VPH.

	PCR + n (%) ¹	PCR - n (%) ¹	Total n(%)
Biopsia+	179 (82,5)	38 (17,5)	217 (80,1)
Biopsia-	45 (83,3)	9 (16,7)	54 (19,9)
Total	224 (82,7)	47 (17,3)	271 (100)

1= porcentaje en relación al total horizontal

En la Tabla 2 se aprecia que el grupo menor o igual a 29 años fue el más numeroso de la muestra estudiada, no encontrándose diferencias significativas entre estos grupos etáreos y los resultados de la biopsia y PCR. La edad media fue de 31,1 años (15-57 años), con una desviación estándar de 9,2 años. Los días de fijación de la muestra se aprecian en la Tabla 3. Se evidencia que el tiempo de fijación no influyó en los diferentes resultados de la PCR.

Tabla 2. Asociación entre el diagnóstico de VPH por biopsia y PCR con la edad de las pacientes.

Edad		Bp(+) PCR(+) n (%) ¹	Bp(-) PCR(-) n (%) ¹	Bp(+) PCR(-) n (%) ¹	Bp(-) PCR(+) n (%) ¹	Total n (%) ¹	P
	≤ 29		97 (57,1)	5 (55,6)	19 (44,2)	16 (43,2)	
30 - 39		44 (25,9)	1 (11,1)	11 (25,6)	14 (37,8)	70 (27)	
≥ 40		29 (17,0)	3 (33,3)	13 (30,2)	7 (18,9)	52 (20,1)	
Total		170 (65,6) ²	9 (3,5) ²	43 (16,6) ²	37 (14,2) ²	259 (100)	0,225

1= porcentaje en relación al total vertical

2= porcentaje en relación al total horizontal

Tabla 3. Asociación del diagnóstico de VPH por biopsia y PCR con los días de fijación del tejido.

Días de fijación		Bp(+)PCR(+) n (%) ¹	Bp(-)PCR(-) n (%) ¹	Bp(+)PCR(-) n (%) ¹	Bp(-)PCR(+) n (%) ¹	Total n (%)	P
	≤ 1		101(56,4)	5(55,6)	27(60)	20(52,6)	
2 - 3		46(25,7)	2(22,2)	10(22,2)	13(34,2)	71(26,2)	
≥ 4		32(17,9)	2(22,2)	8(17,8)	5(13,2)	47(17,3)	
Total		179 (66,1) ²	9 (3,3) ²	45 (16,6) ²	38 (14) ²	271 (100)	0,975

1= porcentaje en relación al total vertical

2= porcentaje en relación al total horizontal

La Tabla 4 relaciona los resultados de la biopsia y PCR con el tipo de muestra y la presencia o ausencia de metaplasia escamosa. Se puede apreciar como los resultados positivos se asocian a muestras que incluyen tanto tejido exocervical como endocervical. La presencia de metaplasia escamosa también mostró una asociación positiva.

La relación con el número y tamaño de los fragmentos evaluados se observa en la Tabla 5. Mientras que el número

de fragmentos no mostró asociación con los resultados de las pruebas, el tamaño de los mismos sí, siendo mayor la positividad cuando había en la muestra al menos un fragmento mayor de 0,5 cm.

En la Tabla 6 se aprecia como el tipo o la intensidad de la inflamación, la hemorragia y la presencia de zonas de erosión del epitelio no mostraron relación significativa con los resultados de la biopsia y PCR.

Tabla 4. Asociación del diagnóstico de VPH por biopsia y PCR con el tipo de muestra y la presencia de metaplasia escamosa.

		Bp(+)PCR(+) n (%) ¹	Bp(-)PCR(-) n (%) ¹	Bp(+) PCR(-) n (%) ¹	Bp(-)PCR(+) n (%) ¹	Total n(%)	P
Tipo de muestra	Exo	47(26,3)	2(22,2)	9(20)	12(31,6)	70(25,8)	
	Exo + Endo	132(73,7)	4(44,4)	36(80)	20(52,6)	192(70,9)	
	Endo	0(0)	3(33,3)	0(0,0)	6(15,8)	9(3,3)	
	Total	179 (66,1) ²	9 (3,3) ²	45 (16,6) ²	38 (14) ²	271 (100)	<0,001
Metaplasia	Si	139 (77,7)	4 (44,4)	36 (80)	18 (47,4)	197 (72,7)	
	No	40 (22,3)	5 (55,6)	9 (20)	20 (52,6)	74 (27,3)	
	Total	179 (66,1) ²	9 (3,3) ²	45 (16,6) ²	38 (14) ²	271 (100)	<0,001

1= porcentaje en relación al total vertical 2= porcentaje en relación al total horizontal

Tabla 5. Asociación del diagnóstico de VPH por biopsia y PCR con el número y tamaño de los fragmentos de tejido.

		Bp(+)PCR(+) n (%) ¹	Bp(-) PCR(-) n (%) ¹	Bp(+) PCR(-) n (%) ¹	Bp(-) PCR(+) n (%) ¹	Total n (%)	P
Número de fragmentos	1-2	65(24)	3(1,1)	11(4,1)	16(5,9)	95(35,1)	
	3-6	97(35,8)	4(1,5)	31(11,4)	19(7)	151(55,7)	
	≥7	17(6,3)	2(0,7)	3(1,1)	3(1,1)	25(9,2)	
	Total	179(66,1) ²	9(3,3) ²	45(16,6) ²	38(14) ²	271(100)	0,135
Tamaño del fragmento mayor (cm)	0,1-0,4	56(20,7)	0(0,0)	18(6,6)	16(5,9)	90(33,2)	
	0,5 - 0,9	112(41,3)	6(2,2)	27(10)	21(7,7)	166(61,3)	
	≥1	11(4,1)	3(1,1)	0(0,0)	1(0,4)	15(5,5)	
	Total	179(66,1) ²	9(3,3) ²	45(16,6) ²	38(14) ²	271(100)	0,014

1= porcentaje en relación al total vertical 2= porcentaje en relación al total horizontal

Tabla 6. Asociación del diagnóstico de VPH por biopsia y PCR con el tipo e intensidad de inflamación, intensidad de la hemorragia y la erosión del epitelio.

		Bp(+)PCR(+) n (%) ¹	Bp(-) PCR(-) n (%) ¹	Bp(+) PCR(-) n (%) ¹	Bp(-) PCR(+) n (%) ¹	Total n (%)	P
Tipo de inflamación	Crónica	116(42,8)	4(1,5)	27(10)	24(8,9)	171(63,1)	
	Reagudizada	63(23,3)	5(1,8)	18(6,6)	14(5,1)	100(36,9)	
	Total	179(66,1) ²	9(3,3) ²	45(16,6) ²	38(14) ²	271(100)	0,625
Intensidad de la inflamación	Severa	37(13,7)	4(1,5)	8(2,9)	10(3,7)	59(21,8)	
	Moderada	85(31,4)	3(1,1)	20(7,4)	13(4,8)	121(44,6)	
	Leve	57(21)	2(0,7)	17(6,3)	15(5,5)	91(33,6)	
	Total	179(66,1) ²	9(3,3) ²	45(16,6) ²	38(14) ²	271(100)	0,443
Intensidad de la hemorragia	Ausente	51(18,8)	1(0,4)	12(4,4)	17(6,3)	81(29,9)	
	Leve	50(18,5)	1(0,4)	12(4,4)	5(1,8)	68(25,1)	
	Moderada	32(11,8)	1(0,4)	8(3)	8(3)	49(18,1)	
	Severa	46(17)	6(2,2)	13(4,8)	8(3)	73(26,9)	
	Total	179(66,1) ²	9(3,3) ²	45(16,6) ²	38(14) ²	271(100)	0,159
Erosión del epitelio	Sí	4(1,5)	0 (0)	0 (0)	3(1,1)	7(2,6)	
	No	175(64,6)	9(100)	45(16,6)	35(12,9)	264(97,4)	
	Total	179(66,1) ²	9(3,3) ²	45(16,6) ²	38(14) ²	271(100)	0,127

1= porcentaje en relación al total vertical 2= porcentaje en relación al total horizontal

DISCUSIÓN

En la reunión de consenso de la Sociedad Venezolana de Oncología del año 2010, se estableció que el diagnóstico de VPH por citología o por biopsia, debe ser reportado como de compatibilidad morfológica y considerarlo como un hallazgo presuntivo hasta que se establezca el diagnóstico de certeza mediante métodos que detecten el ADN viral (2,26).

Tal posición obedeció a que las características microscópicas de la infección del VPH (5,16) a pesar de la aparente sencillez en su identificación (15), no han resultado del todo precisas al contrastar esas características con métodos moleculares, considerados como el estándar de oro para el diagnóstico de esta infección viral (19,27,28).

En este trabajo, el diagnóstico del VPH a través de la biopsia mostró una sensibilidad de casi un 80% y una especificidad bastante baja de 19,1%. Otras investigaciones demuestran valores similares para la sensibilidad, oscilando entre 72,6 y 93% (6,15,20); mientras que para la especificidad se reportan datos más dispersos, que van desde 5,1 a 61,8% (20,29,30).

Al analizar los falsos positivos obtenidos en la biopsia, ellos pudieran deberse a la presencia de pseudocoilocitos, ocasionados por glucógeno, inflamación, atrofia u otros artificios (5,31); mientras que entre las causas de falsos negativos se mencionan al estado latente del VPH en el momento que se tomó la muestra, a que los fragmentos evaluados solo posean tejido endocervical (ectopia), sin epitelio escamoso, así como también que procedan de una zona carente de los cambios histopatológicos característicos, o en última instancia, a la interpretación o criterios diagnósticos del patólogo que examinó el caso (32).

Adicionalmente, no debe olvidarse que la PCR eventualmente, como toda técnica, presenta también falsos positivos y negativos. Lo primero puede ser producto de la contaminación de la muestra; mientras que los falsos negativos pudieran ser ocasionados por la presencia de hemorragia, el exceso de fijación (superior a 72 horas), por inhibición de la PCR al entrecruzarse ácidos nucleicos y proteínas en tejidos fijados con formaldehído (23,33-35).

Así mismo, pueden existir factores de orden técnico, donde destaca la barrera física que forma la parafina (36,37). Por ello se han empleado artificios, como eliminar el uso de xilol, que minimizan la manipulación del material genético, obteniendo mejor extracción de ADN amplificable a partir de muestras incluidas en parafina (38). No obstante, para otros, la realización de PCR en material parafinado no representó problema alguno (39,40).

En este estudio no se observó que el tiempo de fijación de los especímenes influenciara sobre los resultados, hecho que concuerda con lo obtenido por García et al (23), quienes amplificaron fragmentos de hasta 500 pb, sin variación de

la señal amplificada al aumentar el tiempo de fijación hasta 168 horas. No obstante, otros investigadores han reportado que la fijación del tejido en formaldehído por un periodo de tiempo superior a 48 horas, influye negativamente en la eficiente amplificación de la PCR (17,33,34,41,42).

Entre los factores histopatológicos analizados, se obtuvo que la presencia en la muestra de ambos componentes, endo y exocervical, así como la presencia de metaplasia escamosa, se relacionaron positivamente con el diagnóstico de VPH tanto en la biopsia como en el estudio de ADN, lo cual concuerda con la investigación de Moscicki et al (43), quienes refieren que el cambio metaplásico en la zona de transformación cervical es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de la infección por VPH; sin embargo, Hwang et al (44), al analizar la extensión de la ectopia cervical como factor de riesgo en la adquisición del VPH en mujeres jóvenes sexualmente activas, no encontraron asociación significativa entre la metaplasia escamosa y la presencia del virus.

Es conocido que la ectopia endocervical y la subsiguiente metaplasia escamosa es un proceso frecuente que ocurre en mayor o menor extensión en la mayoría de las mujeres. Durante la etapa de metaplasia escamosa inmadura, este epitelio es particularmente sensible a la infección por VPH, constituyéndose en el sitio anatómico de preferencia para esta infección viral y por tanto, es lógico que las muestras que comprendan esta zona presenten significativamente mayor proporción de resultados positivos (43,45).

La variable, tamaño del fragmento mayor de la biopsia, también obtuvo relación positiva con el diagnóstico de VPH en la biopsia y en el estudio de PCR; no obstante en la literatura médica consultada, no se encontraron referencias relativas a este aspecto, así como tampoco con respecto al resto de los factores analizados, como el número de fragmentos de la biopsia, la intensidad y tipo de la inflamación, la hemorragia y la presencia de zonas de erosión del epitelio.

En conclusión, a fin de disminuir la discrepancia de los resultados entre la biopsia y prueba de ADN, sería importante que la muestra de biopsia incluya la zona de transformación del cuello uterino y al menos un fragmento mayor de 0,5 cm.

REFERENCIAS

1. Muñoz N, Bravo LE. Epidemiology of cervical cancer in Colombia. *ColombMed*2012; 43:298-304.
2. The International Agency for Research on Cancer (IARC), 2014. *Global Cancer Observatory*. Disponible en: <http://www.iarc.fr/>. (Acceso 15 de marzo de 2015).
3. Capote LG. Perfil epidemiológico y control del cáncer en Venezuela. *Gac Méd Caracas* 2013; 121:43-52.
4. Wright TC. Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: basis for a 2 tiered morphologic classification system. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2006; 94:22-31.

5. Choi IH, Jin SY, Lee DW, Kim DW, Jeon YM. Cytomorphologic features according to HPV DNA type in histologically proven cases of the uterine cervix. *Korean J Pathol* 2011; 45:612-620.
6. Carrillo C, López G, González M, Caraballo L, Vanegas C. Detección del virus papiloma humano: influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión intraepitelial. *RevObstetGinecolVenez* 2010; 70:240-248.
7. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, Perrotta M, Prendiville W, Russell P, Sideri M, Strander B, Tatti S, Torne A, Walker P. Colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *ObstetGinecol* 2012; 120:166-172.
8. Bentley J. Colposcopic management of abnormal cervical cytology and histology. *J ObstetGynaecol Can* 2012; 34:1188-1202.
9. Krawczyk E, Suprynowicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol* 2008; 173:682-688.
10. Abreu A, Souza R, Gimenes F, Consolaro M. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viro J* 2012; 9:262-270.
11. Dinc B, Rota S, Onan A, Bozdayi G, Taskiran C, Biri A, Güner H. Prevalence of human papillomavirus (HPV) and HPV-16 genotyping by real time PCR in patients with several cervical pathologie. *J Infect Dis* 2010; 14:19-23.
12. Söderlund A, Rymark P, Andersson P, Dillner J, Dillner L. Comparison between the hybrid capture II test and a PCR-based human papillomavirus detection method for diagnosis and post treatment follow-up of cervical intraepithelial neoplasia. *J ClinMicrobiol* 2005; 43:3260-3266.
13. Wang JL, Yang YZ, Dong WW, Sun J, Tao HT, Li RX, Hu Y. Application of human papillomavirus in screening for cervical cancer and precancerous lesions. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2013; 14:2979-2982.
14. Uzcátegui YB, Tovar MC, Lorenzo CJ, González M. Patología vaginal: utilidad de la citología y la colposcopia como métodos diagnósticos. *RevObstetGinecolVenez* 2012; 72:161-170.
15. Melo A, Roa I, Montenegro S, Capurro I, Roa J. Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Rev Méd Chile* 2005; 133:639-644.
16. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *ClinMicrobiolRev* 2003; 16:1-17.
17. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses* 2015; 7:3863-3890.
18. Kelesidis T, Aish L, Steller MA, Aish IS, Shen J, Foukas P, Panayiotides J, Petrikos G, Karakitsos P, Tsiodras S. Human papillomavirus (HPV) detection using in situ hybridization in histologic samples: correlations with cytologic changes and polymerase chain reaction HPV detection. *Am J Clin Pathol* 2011; 136:119-127.
19. Mojtaba HF, Mojtaba FA, Manoochehr M, Nastaran R, Esrafil M, Alireza SZ. Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical tissue samples in Ahvaz, southwest Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6:4569-4575.
20. Salazar E. Detección del virus de papiloma humano en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino. *RevObstetGinecolVenez* 2007; 67:47-54.
21. Adams AL, Eltoun I, Roberson J, Chen J, Connolly K, Chhieng DC. Negative colposcopic biopsy after positive human papilloma virus (HPV) DNA testing: false-positive HPV results or false-negative histologic findings?. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:413-418.
22. Chung JY, Braunschweig T, Williams R, Guerrero N, Hoffmann K, Kwon M, Song Y, Libutti S, Hewitt S. Factors in tissue handling and processing that impact RNA obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 2008; 56:1033-1042.
23. García P, Benavente F, Melo A, Roa I, Roa JC. Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *RevEsp Patol* 2006; 39:175-179.
24. Gravitt PE, Peyton CI, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutle'e F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38:357-361.
25. Gen Bank, 2013. The genetic sequence database. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy (Acceso 20 de enero de 2015).
26. Medina F, Sánchez J, Calderaro F, Borges A. Cáncer de cuello uterino. Consenso nacional para el diagnóstico y tratamiento. *RevVenezOncol* 2010; 23:102-129.
27. Lucotte G, Francois MH, Petit MC, Berriche S, Reveilleau S. A multiple primer pairs polymerase chain reaction for the detection of human genital papillomavirus types. *Mol Cell Probes* 1993; 7:339-344.
28. Álvarez M, Chiarello A, Espinal E, Reigosa A, Marrero M. Detección y tipificación del virus papiloma humano (VPH) en un grupo de pacientes con sospecha clínica y/o anatomopatológica de infección por VPH. *RevSalus* 2000; 4:1-10.
29. Zazove P, Reed B, Gregoire L, Ferenczy A, Gorenflo D, Lancaster W. Low false-negative rate of PCR analysis for detecting human papillomavirus related cervical lesions. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2708-2713.
30. Moreno MJ, Calveiro CG, Dionisi M, Gravina C, Flores J, Cabrera M. Correlación cito-colpo-histológica de lesiones causadas por el virus del papiloma humano (HPV) y la utilidad de la técnica de PCR para determinar la infección por HPV. *HospAeronáut Cent* 2013; 8:38-45.
31. Milgrom R, Fuenmayor T, Rincón F, Aguilar O, Santimone M. Infección vaginal por el virus del papiloma humano. *Gac Méd Caracas* 1998; 106:480-490.
32. Gage JC, Schiffman M, Hunt WC, Joste N, Ghosh A, Wentzensen N, Wheeler CM. Cervical histopathology variability among laboratories a population based statewide investigation. *Am J Clin Pathol* 2013; 139:330-335.
33. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002; 161:1961-1971.
34. Lin J, Kennedy S, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz J, Xu A, Zondervan K. High quality genomic DNA extraction from formalin fixed and paraffin embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal Biochem* 2009; 395: 265-267.

35. Denny L, Adewole I, Anorlu R, Dreyer G, Moodley M, Smith T, Snyman L, Wiredu E, Mollijn A, Quint W, Ramakrishnan G, Schmidt J. Human papillomavirus prevalence and type distribution in invasive cervical cancer in sub-Saharan Africa. *Int. J. Cancer* 2013; 134:1389-1398.
36. Sengüven B, Baris E, Oygur T, Berktaş M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Int J Med Sci* 2014; 11:494-499.
37. Niland E, McGuire A, Cox MH, Sandusky GE. High quality DNA obtained with an automated DNA extraction method with 70+ year old formalin fixed celloidin embedded (FFCE) blocks from the Indiana medical history museum. *Am J Transl Res* 2012; 4:198-205.
38. De Guglielmo Z, Ávila M, Fernandes A, Veitía D, Correnti M. Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina sin el uso de xilol para la detección y tipificación de VPH. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2013; 33:83-86.
39. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papillomavirus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; 167:225-230.
40. Mirmomeni MH, Sajjadi S, Sisakhtnezhad S, Doranegard F. Comparison of the three methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues. *J Biol Sci* 2010; 10:261-266.
41. Macabeo-Ong M, Ginzinger DG, Dekker N, McMillan A, Regezi JA, Wong DT, Richard C.K. Jordan, D. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod Pathol*. 2002; 15:979-87.
42. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1991 Mar; 39:351-354.
43. Moscicki AB, Burt VG, Kanowitz S, Darragh T, Shiboski S. The significance of squamous metaplasia in the development of low grade squamous intraepithelial lesions in young women. *Cancer* 1999; 85:1139-1144.
44. Hwang LY, Lieberman JA, Ma Y, Farhat S, Moscicki AB. Cervical ectopy and the acquisition of human papillomavirus in adolescents and young women. *Obstet Gynecol* 2012; 119:1164-1170.
45. Roberts CC, Liaw KL, Skjeldestad FE, Jansen KU, Bryan JT. Importance of specimen type in detecting human papillomavirus DNA from the female genital tract. *J. Med. Virol* 2009; 81:1620-1626.



Universidad
de Carabobo

Salus



Facultad de Ciencias de la Salud

Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud-Universidad de Carabobo

Volumen 20 - N° 2 - Año 2016

Presidente del Consejo Superior

José Corado

Editora

Marisol García de Yegüez

Co-Editor

Germán González

Asesor Técnico

Milagros Espinoza

Miembros

Amarilis Guerra
Harold Guevara
Yalitzá Aular
Belén Salinas
Aldo Reigosa

Salus Online

Ricardo Montoreano

Asesores

Mercedes Márquez - Cruz Manuel Aguilar -
Wolfan Araque - María Jordán de Pelayo -
Gladys Febres - Ricardo Montoreano -
Julio González - Juan E. Ludert -
Guillermo Wittembury - Michael Parkhouse
César Pérez Maldonado - Esmeralda Vizzi

Colaboradores

Jeannette Silva (Dpto. Idiomas UC)
Mayra Rebolledo (webmaster)

Correctores de Redacción y Estilo

Jeannette Silva
Sioly Mora de Orta
Luis Díaz

Árbitros

Miembros del personal docente y de
investigación de la Universidad de
Carabobo y otras instituciones de
educación superior.

<http://servicios.cid.uc.edu.ve/fcs/>
<http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/>