



Universidad del Rosario - Universidad CES

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud – Facultad de Medicina

Especialización en Epidemiología.

**ADN LIBRE PLASMÁTICO COMO MARCADOR MOLECULAR EN
LESIONES PRE- NEOPLÁSICAS DE CUELLO UTERINO Y SU ASOCIACIÓN
CON VPH.**

Presentado por:

Mary Julieth Gonzalez Melo, Biol.

Tutor Temático:

Adriana García Robayo, Bact, MSc, Ph.D.

Tutor Metodológico:

Milciades Ibáñez, Estadístico, Msc.

Bogota, 25 de Abril de 2012.

AUTORES

- Mary Julieth Gonzalez Melo: Bióloga de la Pontificia Universidad Javeriana, actualmente cursando tercer semestre de epidemiología universidad del Rosario. E-mail: mary.nightly987@gmail.com.

TUTORES

- Doctora Adriana Garcia Robayo: Bacterióloga, Msc Ciencias Básicas, Ph.D. Ciencias Básicas, Miembro del grupo de investigación de Farmacogenética del cáncer, Universidad Nacional de Colombia, investigadora del Centro de investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana.
- Doctor Milciades Ibañez: Estadístico, MSc Epidemiología, Centro de investigaciones en ciencias de la salud Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud – Universidad del Rosario.

ENTIDADES PARTICIPANTES

- GRUPO DE FARMACOGENETICA DEL CANCER-UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
- UNIVERSIDAD DE LA SABANA
- CLINICA TELETON.
- DINAMICA IPS.
- HOSPITAL ENGATIVA.
- HOSPITAL SAN IGNACIO.
- HOSPITAL MILITAR.
- JAVESALUD.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por permitirme alcanzar una meta mas en mi proyecto de vida.
- A mi familia por el apoyo y la confianza que han depositado en mi.
- Al Doctor Marcos Castillo, Medico, Ginecoobstetra, Universidad de la Sabana. por su apoyo y compromiso con el desarrollo de esta investigación y por sus enseñanzas.
- A la Doctora Adriana Garcia, Bacteriologa, Ph.D. En Ciencias Basicas, Por su Colaboracion, por sus enseñanzas y su confianza en mi para el desarrollo de este proyecto.
- A las pacientes que participaron en este estudio, quienes son el eje fundamental y justificacion de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO.

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCION.....	11
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
1.2 JUSTIFICACION.....	12
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	13
3. MARCO CONCEPTUAL.....	14
3.1. ANTECEDENTES.....	14
3.2. ORIGEN DEL ADN LIBRE	14
3.3. ADN LIBRE EN PLASMA Y SUERO SANGUINEOS	15
3.4. FACTORES QUE ALTERAN LA CONCENTRACION DE ADN LIBRE	16
3.4.1. Inflamación y trauma	17
3.4.2. Enfermedades infecciosas (virus)	18
3.4.3. Enfermedades autoinmunes	18
3.4.4. Embarazo	19
3.4.5. Cáncer	19
3.5. CANCER DE CUELLO UTERINO.....	20
3.5.1. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CANCER DE CUELLO UTERINO.....	22
3.6. METODOS PARA CUANTIFICAR ADN LIBRE EN PLASMA O SUERO	22
4. PROPOSITO.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.1. Objetivo General.....	25
5.2. Objetivos Especificos.....	25
6. METODOLOGIA.....	26
6.1. DISEÑO	26
6.2. HIPOTESIS.....	26
6.3. POBLACION DE ESTUDIO Y MUESTRA	27
6.3.1. Población de estudio.....	27
6.3.2. Marco muestral.....	27
6.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	28
6.4.1. Criterios de Inclusión.....	28

6.4.2. Criterios de Exclusión.....	28
6.5. DESCRIPCION DE LAS VARIABLES.....	29
6.6. FUENTES DE INFORMACION Y TECNICAS DE RECOLECCION.....	29
6.6.1. Recoleccion de la información.....	29
6.6.2. Proceso de obtencio de la informacion.....	29
6.6.2.1.Toma de muestras.....	29
6.6.2.2.Obtención de plasma sanguíneo.	30
6.6.2.3. Procesamiento de ADN.....	30
6.6.2.4.Cuantificación de ADN libre plasmático	32
6.7. CONTROL DE SESGOS	32
6.7.1.sesgos de informacion.....	32
6.7.2.sesgos de confusión	33
6.7.4.sesgos de deteccion y falta de sensibilidad del instrumento.....	33
6.8. PLAN DE ANALISIS.....	34
6.8.1. Plan de divulgación.....	34
6.9. CONSIDERACIONES ETICAS.....	35
7. RESULTADOS.....	36
7.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE PACIENTES CON LESIONES PRENEOPLASICAS DE CUELLO UTERINO.....	35
7.1.1.Características sociodemográficas.....	35
7.1.2. Antecedentes Clínicos.....	37
7.1.3. Antecedentes gineco obstétricos.....	37
7.1.4. Diagnostico citológico, colposcopico, e histopatológico.....	39
7.2. CONCENTRACIÓN DE ADN LIBRE Y SU ASOCIACIÓN CON ETAPAS PRECANCEROSAS DE CUELLO UTERINO.....	40
7.2.1 Concentración de ADN libre en lesiones pre-cancerosas.....	40
7.2.2. Concentración de ADN libre en plasma por grado de neoplasia intraepitelial cervical (NICs).....	40

7.3. EXPLORACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DEL SEROTIPO VIRAL Y LA CONCENTRACIÓN DE ADN LIBRE.....	42
7.4. EXPLORACIÓN DE VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS CON LA CONCENTRACIÓN DE ADN LIBRE.....	42
8. DISCUSION DE RESULTADOS	45
8.1. Conclusiones	48
8.2. Recomendaciones	48
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49
10. ANEXOS	54
11.1 Anexo 1.....	54
11.2 Anexo 2.....	56
11.3 Anexo 3.....	57
11.4 Anexo 4.....	60

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1	31
Figura 2	39
Figura 3	40

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	37
TABLA 2.....	38
TABLA 3	41
TABLA 4.....	42
TABLA 5	42
TABLA 6.....	42
TABLA 7	42
TABLA 8.....	43
TABLA 9	43
TABLA 10.....	45
TABLA 11	44

ADN LIBRE PLASMÁTICO COMO MARCADOR MOLECULAR EN LESIONES PRE- NEOPLÁSICAS DE CUELLO UTERINO Y SU ASOCIACIÓN CON VPH.

Introducción: La concentración de ADN libre en plasma ha sido investigada como un biomarcador tumoral en diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, son pocos los estudios que evalúan la concentración ADN libre en pacientes con cáncer cervical y hasta la fecha no hay estudios en pacientes con lesiones pre-cancerosas cervicales.

Objetivo: Establecer la asociación entre la concentración de ADN libre y el grado de la neoplasia cervical y evaluar su posible asociación con el tipo viral.

Metodología: Estudio de prevalencia de tipo analítico con un muestreo no probabilístico. Se cuantifico el ADN libre en plasma por PCR en tiempo real de 92 pacientes que presentaban algún tipo de lesión intraepitelial cervical, confirmado por biopsia en diferentes instituciones de la ciudad de Bogotá. Adicional a esto se realizó la genotipificación del virus por Reverse Line Blot.

Resultados: La concentración de ADN libre en plasma de pacientes con lesiones pre-cancerosas fue 4515 ± 16402 ng/ μ l (media $\pm$ DS), LIEBG fue de 5188.7 ± 14876.5 ng/ μ l (media $\pm$ DS), en pacientes con LIEAG fue de 830.3 ± 1515.508 ng/ μ l (media $\pm$ DS), en pacientes con resultado negativo fue de 7024.7 ± 24107.5 ng/ μ l (media $\pm$ DS). Los serotipos encontrados en la poblacion de estudio no presentaron asociacion con la concentracion de ADN libre.

Discusión: Los resultados demostraron que la concentración absoluta de ADN libre en plasma no tiene un valor predictivo para diferenciar los tipos de lesión pre-neoplasica de cuello uterino, puesto que no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ADN libre en plasma de las diferentes etapas progresivas de cáncer de cuello uterino ($p;0.57$, $gl;3$ alfa 0.05) de la misma forma el serotipo no contribuye a explicar la concentración de ADN libre.

Palabras clave: ADN libre, cuello uterino, Marcador molecular, neoplasias intraepiteliales, Plasma.

CELL FREE DNA AS A MOLECULAR MARKER IN PATIENTS WITH PRENEOPLASIC LESIONS OF THE CERVIX AND THEIR ASSOCIATION WITH HPV.

Introduction: The concentration of cell free DNA in plasma has been investigated as a tumor biomarker in several cancers. However, few studies evaluating the concentration cell free DNA in cervical cancer patients and to date no studies in patients with pre-cancerous cervical lesions.

Objective: Establish the association between the concentration of cell free DNA and the degree of cervical neoplasia and evaluate their possible association with viral type.

Methodology: This is an Analytical prevalence study with a non-probability sampling. The cell free DNA was quantified in plasma by real-time PCR of 92 patients who had some cervical intraepithelial lesion, confirmed by biopsy in different institutions of Bogotá. In addition to this was performed genotyping of virus by Reverse LineBlot .

Results: The concentration of Cell free DNA in patients with pre-cancerous lesions was 4515 ± 16402 ng / μ l (mean $\pm$ SD), LSIL was 5188.7 ± 14876.5 ng/ μ l (mean $\pm$ SD), in patients with HSIL was $830.3 \pm 1515,508$ ng / L (mean $\pm$ SD), in patients with negative results was 7024.7 ± 24107.5 ng / L (mean $\pm$ SD). The serotypes found in the study population showed no association with the Cell free DNA concentration.

DISCUSSION: The results showed that the absolute concentration of Cell free DNA in plasma has no predictive value to differentiate the types of pre-neoplastic lesions of the cervix, since no significant differences in the concentration of free DNA in plasma of different progressive stages of cervical cancer (p , 0.57, g l, 3 α 0.05) in the same way serotype does not contribute to explain the concentration of free DNA.

Keywords: free DNA, cervix, molecular marker, intraepithelial neoplasias, Plasma.

1. INTRODUCCION.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El cáncer de cuello uterino, es la segunda causa más frecuente de cáncer en mujeres, representando el 11,6% de todos los cánceres y es una de las causas más comunes de muerte por cáncer en mujeres. En Colombia, aproximadamente se diagnostican 5603 casos nuevos anuales, con una incidencia del 26,1 por cada 100.000 habitantes. Se ha demostrado que el cáncer cervical es un proceso progresivo, que comienza con lesiones escamosas no invasivas que pueden avanzar a lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado; en algunos casos, las lesiones más displásicas progresan hasta alcanzar un carcinoma invasivo. No obstante, aún no se sabe con exactitud qué lesiones progresan, ni tampoco los mecanismos de la progresión tumoral en este tipo de tumor.

A pesar de los avances recientes a la fecha no se ha encontrado un marcador molecular que esté significativamente asociado con la progresión de esta enfermedad. Se ha propuesto una serie de marcadores genéticos en cáncer cervical, sin embargo no han sido evaluados en lesiones pre-neoplásicas cervicales como es el caso del incremento del ADN libre, el cual tiene un potencial clínico como marcador pronóstico tumoral. Varios estudios muestran la potencial aplicación del ADN libre como marcador molecular en muchos tumores incluyendo, cáncer gastrointestinal, de seno, pulmón, cabeza/cuello, urológico, ginecológico y de piel. Aunque esté lo podemos encontrar en condiciones normales a muy bajas concentraciones principalmente en suero o plasma, estas concentraciones pueden verse alteradas por la alta tasa de recambio celular ya sea por procesos apoptóticos o necróticos presentes en el cáncer.

1.2. JUSTIFICACION

La organización panamericana de la salud ha reconocido la importancia de desarrollar programas rentables de prevención de cáncer de cuello uterino, que incluyan exámenes de detección, tratamiento y seguimiento, lo que ayudaría a disminuir el número de muertes por esta causa.

En Colombia, la poca efectividad de las acciones preventivas y las exigencias para los programas de citología han llevado a la necesaria discusión sobre la búsqueda de nuevas alternativas para el control del cáncer de cuello uterino.

La evidencia de la importancia de generar nuevas alternativas para el control del cáncer de cuello uterino, se denotan en los datos más recientes del Instituto Nacional de Cancerología que indican lo siguiente: de cada cien mujeres colombianas, más de 2 mujeres padecerán de este cáncer antes de llegar a los 65 años de edad, además cerca de 2000 mujeres pierden la vida cada año a causa de esta enfermedad.

Los logros alcanzados por los programas de citología en la reducción de las tasas de cáncer de cuello uterino deben juxtaponerse al incremento progresivo de las tasas de cáncer cervical y de la mortalidad atribuible al cáncer. Por lo tanto es importante reconocer las limitaciones de los programas de citología, los cuales probablemente han alcanzado ya su impacto máximo en la prevención global de cáncer de cuello uterino. En primer lugar la citología tiene una sensibilidad limitada en la detección de lesiones pre-cancerosas y cánceres tratables. En segundo lugar, destacar que la citología requiere de la existencia de una importante mano de obra y, hasta la fecha, no ha respondido bien al cribado automatizado de alto volumen. En tercer lugar, a pesar del bajo costo de los insumos el programa con citologías de alta calidad requiere una alta inversión de manera que la citología puede no ser la mejor opción, en términos de relación de costo-eficacia. Por lo tanto resulta interesante desarrollar múltiples modalidades viables para la prevención del cáncer de cuello uterino, incluyendo métodos que tengan el potencial de alcanzar

resultados de cribado similares o mejores a los que ofrece la citología por si sola pero que también satisfagan las necesidades tales como el bajo costo y un menor número de intervenciones.

Puesto que el seguimiento de estas lesiones pre cancerosas con fines investigativos es éticamente cuestionable, resulta necesario el desarrollo de otro tipo de investigación, tales como estudios de evaluación y detección de marcadores moleculares tumorales que ofrezcan resultados fiables en el pronóstico de lesiones pre-cancerosas y cáncer cervical, es por eso que en este estudio se quiso evaluar al ADN libre en plasma como un marcador molecular de lesiones intraepiteliales de cuello uterino. Puesto que se ha demostrado el incremento de este en pacientes con cáncer, sugiriendo que el origen del ADN libre es de tejido tumoral, proponiendo a este como potencial marcador molecular para pronóstico de cáncer. Esto con el fin de establecer nuevas pruebas que apoyen al tamizaje y que mejoren la eficiencia en la reducción de las tasas de cáncer de cuello uterino.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Es la concentración ADN libre en plasma un marcador molecular para el pronóstico de lesiones pre neoplásicas de cuello uterino?

¿Existe una asociación entre la concentración de ADN libre y el serotipo de VPH?

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1. ANTECEDENTES.

En 1947 Mandel y Metais descubrieron el ADN libre en plasma y suero utilizando ácido perclórico como método de precipitación, mostrando la presencia de ácidos nucleicos tanto en individuos sanos como enfermos; Además reportaron altas concentraciones de ADN en suero de pacientes embarazadas. Este descubrimiento de los ácidos nucleicos en plasma y suero fue olvidado hasta los años sesenta, cuando se encontró en pacientes con lupus eritematoso sistémico altas concentraciones de ADN libre en estos dos tipos de muestra¹

Koffler en 1973 mostró que el incremento de ADN en la circulación podría ser detectado en otras enfermedades, tales como artritis reumatoide, glomerulonefritis, pancreatitis, enfermedades inflamatorias intestinales y hepatitis. Posteriormente, se descubrió que pacientes con cáncer presentaban un incremento en la concentración de ADN libre en comparación con pacientes sin cáncer. Además se demostró que la concentración de ADN libre, es mayor en pacientes con metástasis comparada frente a pacientes con tumores localizados y que esta concentración puede disminuir en un 90% después de la radioterapia. El origen del ADN extracelular fue descrito hasta 1980, cuando Stroun y Anker demostraron que el ADN libre deriva de células tumorales. Ellos demostraron que ciertas características genéticas y epigenéticas del ADN tumoral estaban también presentes en el ADN libre en plasma o suero¹

3.2 ORIGEN DEL ADN LIBRE

Liu y colaboradores en el 2002, encontraron la existencia de ADN libre en plasma proveniente de células hematopoyéticas en individuos con trasplante de médula ósea procedente de un individuo del sexo contrario, hallando que el ADN libre en plasma de los pacientes a quienes se les hizo el trasplante era principalmente del donador, concluyendo con ello que las células

hematopoyéticas pueden contribuir significativamente en la presencia de ADN libre en plasma². Estos hallazgos fueron corroborados por estos mismos autores en el 2003 y además encontraron que existía una contribución importante de ADN libre en plasma proveniente de células de diferentes órganos tales como cabeza, hígado, riñón³. Jahr y colaboradores demostraron la presencia de ADN proveniente de células tumorales en pacientes con distintos tipos de cáncer en el plasma sanguíneo sustentado por la presencia de oncogenes o mutaciones en genes supresores de tumor característicos de las células tumorales⁴.

En general, el ADN libre en suero o plasma está relacionado con el proceso de muerte celular^{4,5,6} este proceso se lleva a cabo por dos mecanismos distintos, el primero un proceso no programado, en el cual se liberan al medio extracelular productos celulares, que pueden ser tóxicos para las células vecinas, caracterizado por una fragmentación del ADN de tamaño superior a 10.000pb, este proceso se denomina **necrosis**; mientras que el otro tipo de muerte celular denominado **apoptosis**, se caracteriza por ser un proceso programado, además por la presencia de cuerpos apoptóticos, en donde se ubican restos celulares, evitando de esta manera que se afecten las células vecinas. Asimismo ocurre una fragmentación del ADN, que en este caso es mediada por endonucleasas como ICAD, originando fragmentos de pesos moleculares de 150 a 200pb, que corresponden al tamaño de los nucleosomas, los cuales se pueden observar por medio de una electroforesis formando un patrón de bandas en escalera^{4,7,8}.

3.3. ADN LIBRE EN PLASMA Y SUERO SANGUINEOS

El ADN libre lo podemos encontrar en condiciones normales a muy bajas concentraciones, principalmente en el torrente sanguíneo, en muestras como suero o plasma, las diferencias más significativas entre estas son la existencia de factores y proteínas relacionadas con la coagulación, así como también la presencia de plaquetas en el plasma. Muchos reportes indican que la cantidad de ADN libre es significativamente más baja en plasma que en suero, pero la razón de esta observación aun no tiene una explicación contundente para esas

diferencias⁹. El ADN libre lo podemos encontrar también en muestras como orina, leche materna y saliva^{10,11,12}.

El suero y el plasma, son tal vez las muestras más utilizadas para la cuantificación de ADN libre, pero aún no se ha podido esclarecer completamente, cuál de las dos muestras es la más promisoría para uso en diagnóstico, ya que estos dos tipos de muestras presentan grandes diferencias, por ejemplo en suero aumenta la concentración de ADN libre de 3 a 24 veces más comparando con la concentración de ADN libre en plasma¹⁰, al respecto existen muchas hipótesis, la primera de ellas propone que en el plasma hay presencia de anticoagulantes que pueden en determinado momento inhibir las pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)^{11,13}. La segunda hipótesis planteada es que la velocidad de la centrifugación al momento de separar el plasma y el suero, pueden lisar células como glóbulos blancos, alterando la cuantificación de ADN libre cuando la velocidad aumenta de las 1500 rpm¹¹. La tercera hipótesis sugiere que el tiempo transcurrido antes del procesamiento de la muestra interviene en las diferencias de concentración entre el suero y el plasma, ya que al comparar el plasma y el suero expuestos a diferentes tiempos antes de ser procesada la muestra, evidencia que las concentraciones de ADN libre en suero varían más a través del tiempo, mientras que en el plasma hay una mayor estabilidad en la concentración de ADN libre, una posible explicación de este efecto es la lisis de los glóbulos blancos en el suero, sin embargo esto no explica completamente el porqué el suero muestra mayores concentraciones de ADN libre que el plasma, ya que al tiempo 0, ya se veían diferencias¹⁰. Por último, la explicación más aceptada hasta el momento indica que el suero presenta mayor concentración de ADN libre debido al proceso de coagulación, ya que durante este proceso se puede presentar lisis celular^{14,15}. Por ende a la fecha no está definido que tipo de muestra es la mejor, para realizar estudios con ADN libre, si el suero o el plasma.

Sin embargo, los investigadores que recomiendan el suero argumentando que por sus altas concentraciones hay mayor probabilidad de encontrar alteraciones genéticas, sumado a esto algunas técnicas moleculares requieren

de altas concentraciones de ADN, y este representa indirectamente procesos relacionados al tumor como la metástasis^{9,14}. En contraparte otros investigadores recomiendan utilizar plasma, argumentando que este tipo de muestra no presenta ADN proveniente de leucocitos u otros recursos que se incluye accidentalmente en el suero durante la separación de este⁹. Es así, como hasta la fecha los estudios con cualquiera de las dos muestras son igualmente valiosos.

3.4. FACTORES QUE ALTERAN LA CONCENTRACIÓN DE ADN LIBRE

Con el descubrimiento del ADN libre, se han desarrollado varios estudios con el fin de evaluar que factores alteran la concentración de ADN libre, Zhong y colaboradores evaluaron algunos factores tales como la edad, el género y la frecuencia de donación de sangre con el fin de establecer si existían diferencias significativas en la concentración de ADN, las cuales no se encontraron, exceptuando mujeres mayores de 60 años, quizá debido a los cambios hormonales¹⁶. Sin embargo otros estudios han demostrado que las concentraciones de ADN libre pueden verse alteradas por distintas circunstancias, que en general se pueden resumir en el daño de tejidos, inflamación, embarazo, infecciones, cáncer y trauma¹⁷.

3.4.1. Inflamación y trauma

Las concentraciones de ADN libre en plasma aumentan una hora después de provocada una herida, y puede aumentar aproximadamente 100 veces en aquellos pacientes con politraumatismo, en comparación con pacientes con heridas no tan complicadas en los cuales aumenta el ADN libre en plasma de 10 a 18 veces aproximadamente. La cinética de la concentración del ADN libre en plasma en conjunto con otras técnicas de predicción puede ser usado en el monitoreo del pronóstico clínico de pacientes con trauma¹⁸.

El incremento de ADN libre en plasma después de provocada una herida puede darse como consecuencia del incremento de liberación de células

mueras (procesos apoptoticos y/o necróticos) o justo al declive en la eficiencia de desecho celular¹⁸.

3.4.2. Enfermedades infecciosas (virus)

Estudios demuestran que la presencia de ADN viral en sangre periférica, puede explicarse por la lisis de células infectadas el cual puede afectar la concentración de ADN libre en plasma¹⁴. Esto se ha visto principalmente en infecciones con Epstein-Barr y Papilomavirus humano principalmente. Algunos autores han postulado que ha mayor carga viral, hay una mayor concentración de ADN libre en plasma. Las técnicas utilizadas para detectar ADN viral son muy útiles, ya que su especificidad es muy alta, pero su sensibilidad puede verse afectada, porque al existir bajas concentraciones del virus en el sitio de la infección el ADN viral no puede ser detectado en plasma¹⁴.

3.4.3. Enfermedades autoinmunes

En los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) se encuentran auto-anticuerpos, siendo los más frecuentes los antinucleares, principalmente anti-ADN; otros se dirigen frente a ribonucleoproteínas, histonas y antígenos antinucleolares. Los inmuno-complejos formados por estos auto-anticuerpos y sus correspondientes antígenos son los responsables de la glomerulonefritis, la artritis y la vasculitis¹⁹.

Varios factores influyen en el desarrollo de la autoinmunidad. El incremento en la tasa de apoptosis de linfocitos T tanto espontáneamente como después de una estimulación *in vitro*viéndose afectada la concentración de ADN libre en pacientes con LES comparado con individuos sanos. Se ha encontrado que la actividad de las DNasas responsables de la degradación del ADN plasmático se encuentra reducida en pacientes con LES. Es así como la concentración de ADN libre en pacientes con enfermedades autoinmunes es mayor y principalmente en está relacionada con la alta tasa de apoptosis de linfocitos, en conjunto con la ineficiencia por parte de las DNasas⁸.

3.4.4. Embarazo

Otro factor que afecta la concentración de ADN libre en plasma es el embarazo. El paso de células entre la madre y el feto es bien conocido. Estas células atraviesan la placenta entrando a circulación por el torrente sanguíneo de la madre, atravesando en muchos casos solo ADN fetal. El proceso que da origen al ADN libre fetal en plasma materno posiblemente está asociado a mecanismos tales como lisis celular producto de daño físico e inmunológico. Además del desarrollo de determinados tejidos fetales regulados por apoptosis. Una aplicación clínica es el uso de ADN libre fetal en el plasma materno para diagnóstico no invasivo prenatal, con el fin de detectar mutaciones heredadas del padre, desórdenes ligados al sexo, detección de aneuploidias cromosomales, tales como el Síndrome de Down y otros desórdenes causados por mutaciones²⁰.

3.4.5. Cáncer

La presencia de ADN libre en plasma y suero de pacientes con cáncer fue demostrado en 1977. Sin embargo hasta ahora el ADN libre en plasma ha adquirido interés como posible blanco para detección de marcadores moleculares para diagnóstico y pronóstico. Mutaciones en el ADN libre han sido caracterizadas en una gran variedad de tipos de cáncer, por ejemplo cáncer colorectal, páncreas, pulmón, seno, hígado entre otros. Otros tipos de alteraciones que han sido reportadas en ADN libre en plasma son: hipermetilaciones, inestabilidad en microsatélites, y pérdida de heterocigosis. En muchos casos estas alteraciones fueron idénticas a las encontradas en el tejido tumoral. La ocurrencia de alteraciones en el ADN libre, no está limitada a un tejido tumoral específico, al tipo o al grado del tumor. Con respecto a la cuantificación del ADN libre en plasma se han encontrado mayores concentraciones de este en pacientes que están en una etapa avanzada del cáncer, en recurrencias del tumor y en metástasis. Además, en pacientes tratados con radioterapia la cuantificación del ADN libre en plasma disminuye; Es así como esta cuantificación, es útil como marcador pronóstico en pacientes con cáncer²¹. Postulándose que el ADN libre en plasma sería útil para la

detección de alteraciones genéticas y epigenéticas en el seguimiento de pacientes con cáncer apoyado en que la muestra de plasma es una muestra poco invasiva ^{1,16}.

3.5. CÁNCER DE CUELLO UTERINO

El cáncer de cuello uterino es el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres de todo el mundo con estimaciones de 493.000 nuevos casos y 274.000 fallecimientos anuales, siendo la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres seguido por cáncer de mama y el de pulmón, cerca del 83% de los casos se producen en países en vía de desarrollo, donde el cáncer cervical representa el 15% de los cánceres femeninos, con un riesgo acumulado antes de los 65 años de edad del 1,5%²². En Colombia se diagnostican aproximadamente 6.900 casos nuevos de cáncer de cérvix cada año y se presentan alrededor de nueve muertes al día por esta enfermedad. Se ha descrito que la infección del virus del papiloma humano es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de cáncer cervical. La incidencia máxima de infección por VPH se produce hacia los 20 años de edad y la incidencia máxima de cáncer de cuello uterino se produce a los 40 años de edad. Se estima que si no fuera por la prevención secundaria aproximadamente el 1% de las mujeres que adquieren una infección por VPH desarrollarían cáncer de cuello uterino. Sin embargo por cada caso de cáncer se desarrolla un número mucho mayor de lesiones pre-malignas y malignas que son de tipo escamoso, aunque un 15% aproximadamente son de tipo glandular²³

El cáncer de cuello uterino se origina en la zona de transformación del cuello uterino. Esta zona experimenta una metaplasia fisiológica del epitelio glandular a epitelio escamoso en la pubertad. La infección por el virus del papiloma humano es muy común en las mujeres jóvenes que hayan iniciado su actividad sexual y cuando persiste principalmente en tipos virales de alto riesgo, las oncoproteínas virales provocan alteraciones en el punto de control G1-S del ciclo celular, que dan como resultado la presencia de lesiones precursoras como Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NICs), las cuales se dividen en

diferentes grados. El NIC-I, se caracteriza por ser lesiones que generalmente constituyen simples manifestaciones de la infección por el VPH. Sin embargo en su forma más avanzada NICIII aumenta el riesgo de progresión a cáncer, si no se detecta y se trata. Afortunadamente, la progresión a cáncer suele tardar años, lo cual permite detectar las lesiones por citología exfoliativa²³. El método de tamizaje de elección en cáncer cervical y lesiones pre neoplásicas, es la citología cérvico-vaginal, la cual se basa en una tinción de papanicolau y su visualización por personal altamente calificado como patólogos. Sin embargo este estudio es solamente morfológico, además presenta algunas limitantes, como son los falsos negativos en aproximadamente 20-30%, principalmente por causa de una distribución no uniforme en la lámina a analizar, además de la presencia de otros contaminantes como bacterias y levaduras, y la tardanza en la fijación de las láminas ó el error humano al momento de la lectura (pues cada lámina contiene de 50.000 a 300.000 células que deben ser analizadas) pueden ser otras de las causas para esta baja sensibilidad. Es así como hoy en día se ha propuesto incluir como apoyo en diagnóstico técnicas altamente sensibles y específicas que permitan la rápida detección²⁴.

En estudios científicos sobre cáncer basados en la noción de “variables de valoración alternativas”, la situación del pre- cáncer es equivalente los distintos tipos de NICs, que puede diferenciarse claramente de una infección; por virus del papiloma humano de adquisición reciente y constituye un buen indicador de riesgo subsiguiente de desarrollo de cáncer. Se ha visto que en lesiones de bajo grado NIC I existe un incremento en la posibilidad de regresión, mientras que en pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado NIC II y NIC III existe un mayor riesgo de desarrollar cáncer acompañado de una baja probabilidad de regresión^{25,26}. Sin embargo, hasta la fecha no hay un marcador molecular asociado a la progresión o regresión de la enfermedad, Varios autores han postulado que la cuantificación del ADN libre en plasma puede ser un marcador molecular pronóstico prometedor, sin embargo, son pocos los estudios que evalúan esta cuantificación de ADN libre en pacientes con cáncer cervical y hasta la fecha no hay estudios en pacientes con lesiones precancerosas cervicales.

3.5.1. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CANCER DE CUELLO UTERINO.

La Edad: la incidencia mas alta de cancer cervical esta entre los 45 y los 60 años de edad. La actividad sexual a temprana edad es uno de los factores de riesgo mas asociados con el desarrollo de este tipo de cancer. Otro factor que frecuentemente se encuentra asociado con la edad es el numero de compañeros sexuales y el numero de partos.

Cigarrillo: este es otro de los factores de riesgo mas importantes en el desarrollo de de cancer de cuello uterino dvarios estudios reportan que las mujeres fumadoras presentan un mayor riesgi de dessarrollar esta patplogia que las no fumadoras, los mecanismos biologicos de la enfermedad son desconocidos pero puede estar relacionado el efecto carcinogenico de la nicotina presente en el moco cervical.

El estatus socioeconomico bajo es otro factor de riesgo relacionado sin embargo este puede ser un factor independiente que se encuentra relacionado con factores de riesgo como el cigarrillo, o con la actividad sexual y ademas con un menor porcentaje de amizaje en estas poblaciones sea por desconocimiento por carencia en la accesibilidad a los servicios medicos.

3.6. MÉTODOS PARA CUANTIFICAR ADN LIBRE EN PLASMA O SUERO

Muchos métodos han sido desarrollados para cuantificar ADN, desde métodos básicos como espectrofotometría ultra violeta, técnicas basadas en geles de electroforesis, técnicas de hibridación y métodos de amplificación de ADN (reacción en cadena de la polimerasa PCR²⁷).

La espectrofotometría de fluorescencia (fluorometria) es una herramienta que ayuda a cuantificar muestras con bajas concentraciones de ADN, la cuantificación de ADN por fluorescencia, requiere de la adición de un fluorocromo que interactué con el ADN, A diferencia de espectroscopia UV,

lecturas de fluorescencia son relativas y deben ser comparadas con una curva estándar producidos normalmente cada vez que un ensayo se lleva a cabo²⁷.

La técnica de ELISA (*Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas*) es muy utilizada para analizar muestras con ADN en muy bajas concentraciones, ya que detecta y semi-cuantifica nucleosomas, se basa en la detección mediante anticuerpos que producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este método es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos, pero este método cuantifica solo la fracción de ADN unido a las histonas²⁸. Picogreen es uno de los kits para cuantificar ADN este actúa como un fluorocromo que se une al ADN su sensibilidad de detección es de 25pg/ml.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, es un método rápido y sencillo para copiar y amplificar secuencias específicas de ADN. Para usar este método es necesario conocer la secuencia de una región de ADN. El método consiste en ciclos repetidos de denaturación, alineamiento y extensión de ADN. Para usar este método en cuantificación de ADN se debe complementar con técnicas como Electroforesis en gel, la cual se usa para la separación de moléculas (ácidos nucleicos) según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa (agarosa o poliacrilamida), la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica. Finalmente se medirá la intensidad de las bandas, tomando como referencia una muestra de concentración conocida la cual se tomara como patrón de referencia^{19,27,29}.

La PCR en tiempo real ha demostrado que es útil para investigaciones en las cuales se quiera hacer cuantificación del producto a través del tiempo, para análisis de expresión o para amplificaciones de bajas concentraciones de ADN blanco o del producto y otras innumerables investigaciones y aplicaciones clínicas. Una aplicación particular de la PCR es la cuantificación de moléculas blanco de ADN la cual es muy útil en múltiples investigaciones⁸. La principal característica de la PCR en tiempo real, es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original, mediante la utilización de

fluorocromos (generalmente *SYBR Green*), de forma tal que el aumento de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN formada. Esta fluorescencia puede ser detectada desde las primeras fases de la reacción midiendo la cinética de la misma o para identificar con una alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés *melting temperature*)^{30,31}.

La técnica de PCR en tiempo real tiene dos diferentes métodos de análisis de datos la cuantificación absoluta y cuantificación relativa. La cuantificación absoluta es útil para cuantificar muestras de concentración desconocida por interpolación a partir de una curva estándar con diluciones de concentraciones conocidas. La cuantificación relativa, es usada para análisis de cambios en la expresión génica de una muestra dada teniendo como referencia un gen control de expresión conocida.

La cuantificación a partir de secuencias Alu permite mejorar la sensibilidad en la detección de ADN humano. Teniendo en cuenta que una secuencia Alu es un fragmento de ADN de aproximadamente 300 pares de bases (pb) que con ligeras variaciones puede encontrarse en un gran número de lugares en el genoma de los primates. Las primeras secuencias de este tipo se identificaron mediante la endonucleasa AluI, de la cual han recibido su nombre, aunque actualmente se analizan mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis. Son las secuencias móviles más abundantes del genoma humano. Derivan probablemente del gen 7SL ARN, que forma parte del complejo ribosomal. La aparición de las secuencias *Alu* se sitúa hace aproximadamente 65 millones de años, coincidiendo con el origen y expansión de los primates³².

El termino elementos repetitivos describe varias secuencias de ADN que representan múltiples copias en el genoma en el cual residen. Los elementos repetitivos pueden subdividirse entre las categorías de secuencias en tándem, (por ejemplo microsatelites, minisatelites y telomeros) o inter-expresados (por ejemplo elementos móviles y pseudogenes). Los elementos inter- expresados pueden subdividirse con base en el tamaño, los elementos cortos inter-expresados (SINEs) tienen menos de 500pb de longitud. La secuencias inter-

expresadas Alu fueron identificadas hace 30 años como un componente del ADN humano. El nombre secuencias Alu fue dado a los miembros de esta familia de repeticiones que tienen un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Alu I, son comúnmente encontrados en intrones, regiones no traducidas de genes y regiones intergénicas. Estimaciones iniciales indican que estos elementos móviles están presentes en el genoma humano en un alto número de copias aproximadamente (500.000 copias). Recientemente un análisis detallado de esta secuencias en genoma humano ha mostrado que hay más de un millón de copias, los elementos Alu y comprenden más del 10% del genoma humano³².

4. PROPÓSITO

Dada la relevancia del cancer de cuello uterino en nuestro país es importante apuntar hacia el desarrollo de programas rentables de prevención de cancer de cuello uterino apoyados de las nuevas tecnologías con el fin de superar las técnicas de prevención existentes es por ello que propósito del presente estudio apunta a proponer el ADN libre en plasma como marcador molecular pronóstico de lesiones precancerosas de cuello uterino.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Establecer la asociación entre la concentración de ADN libre y el grado de neoplasia cervical y evaluar su posible asociación con el serotipo VPH en la población de mujeres del presente estudio.

5.2. Objetivo Específicos

- Establecer la asociación de la concentración de ADN libre medidos en plasma con las etapas progresivas del cáncer cervical.

- Determinar la asociación del tipo viral con la concentración de ADN libre.
- Determinar las asociaciones entre DNA libre plasmático y las características sociodemográficas de las mujeres objetivo del estudio

6. ASPECTOS METODOLÓGICOS.

6.1 DISEÑO

Para la presente investigación se realizó un estudio prevalencia de tipo analítico con base en un muestreo no probabilístico (M.N.P) por criterio de los investigadores aplicado a la población objeto de estudio.

Se realizó un análisis bivariado para determinar la posible asociación entre las concentraciones de DNA libre plasmático con el tipo de lesión pre neoplásica de cuello uterino y la asociación de la Concentración DE ADN libre con el serotipo de VPH identificado.

6.2 HIPOTESIS

- Esta asociada la concentración de ADN libre plasmático con las etapas progresivas del cáncer cervical
- Está asociado el serotipo VPH con la concentración de ADN libre plasmático.
- Están asociadas las concentraciones de DNA libre plasmático y las características sociodemográficas de las mujeres objetivo del estudio

6.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA

6.3.1. población de estudio.

Esta constituida por mujeres que asistieron a procedimiento de colposcopia por alteraciones citológicas de cualquiera de las entidades participantes en el presente estudio (Clínica Teletón, Hospital de Engativa, Hospital San Ignacio, Hospital Militar y Javesalud).

6.3.2. Marco Muestral

El Marco muestral lo constituyeron el registro de mujeres programadas para procedimiento de colposcopia en el periodo comprendido entre febrero 1 de 2009 y mayo 1 de 2009 de cada una de las instituciones participantes en el estudio (La Clínica Teletón, Hospital de Engativa, Hospital San Ignacio, Hospital Militar y Javesalud).

Las unidades en el marco muestral fueron identificadas sistemáticamente en forma alfa numérica ascendente con los siguientes códigos: CO-001 para la primera paciente registrada en la lista del estudio, CO-002 para la segunda paciente registrada en la lista del estudio y así sucesivamente para cada una de las pacientes.

Cada código se suministrara por una sola vez en el marco muestral y ninguna paciente ajena a la población de interés debe estar presente en el marco muestral así como toda paciente que pertenezca a la muestra debe aparecer en el marco muestral. No se realizó cálculo de tamaño de muestra por tratarse de un muestreo no probabilístico (M.N.P.) realizado por criterio de los investigadores. Para cada una de las pacientes seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión se les conservó la codificación alfanumérica ascendente del marco muestral para identificar cada una de las muestras que hicieron parte de la investigación.

De acuerdo al presupuesto asignado para el estudio, la muestra esta constituida por 92 mujeres con edades comprendidas entre los 18 y 60 años con lesiones preneoplasicas de cuello uterino determinada por reporte citológico revisado por patólogo con un tiempo no mayor a 3 meses en el momento de ser incluida en el estudio. La muestra de 300 pacientes se recolectó entre febrero 1 de 2009 y mayo 1 de 2009 constituyendo así fase de muestreo. A partir de esta fecha ninguna paciente fue incluida en el estudio.

Las pacientes que conforman la muestra destinada para la presente investigación deben:

- Haber firmado el consentimiento informado tanto para pertenecer al estudio como para que se les pueda realizar el procedimiento de venopunción destinada a la obtención de plasma sanguíneo
- Autorizar la evaluación de los resultados de la colposcopia y la biopsia y la muestra de sangre por parte de los investigadores
- Cumplir los criterios de inclusión y estar exentas de los criterios de exclusión planteados en la presente investigación

6.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.

6.4.1. Criterios de Inclusión

Se incluyó en el estudio todas las mujeres que haciendo parte del marco muestral tuvieron alguna lesión pre cancerosa de cuello uterino con diagnóstico patológico confirmado, que aceptaron participar en el estudio y que permitieron el procedimiento de venopunción.

6.4.2. Criterios de Exclusión

- Pacientes con previo tratamiento para cualquier tipo de lesión pre cancerosa.
- Pacientes en estado de embarazo verificado durante consulta ginecológica.

- Pacientes con diagnóstico de otro tipo de cáncer sin importar el tiempo de evolución
- Pacientes con limitación mental descrita como cualquier anomalía del equilibrio emocional manifestada por comportamiento mal adaptado y funcionamiento anormal, que pueda limitar su participación en el estudio.

6.5. Descripción de las variables

Ver tabla operacional de variables. Anexo 1.

6.6. fuentes de información y técnicas de recolección.

6.6.1. Instrumentos y métodos de recolección de datos.

Para este estudio se utilizaron diversos instrumentos se revisó la Historia Clínica de cada una de las pacientes que conformaron la muestra del estudio, tomando el reporte correspondiente al grado de alteración citológica y datos básicos (edad, sexo y régimen de seguridad social), los cuales fueron confirmados por medio de una encuesta previamente estructurada la cual fue diligenciada por las pacientes que participaron voluntariamente en el estudio, en la cual se registraron datos que aportan al análisis al ser incluidas como variables de interés para el estudio basándonos en la bibliografía revisada al término del inicio de la investigación, además de ello después del examen de colposcopia se buscó el resultado de la biopsia como parte del proceso de recolección de datos.(anexo 2)

6.6.2. Proceso de Obtención de información.

6.6.2.1. Los datos fueron obtenidos mediante fuentes primarias dadas por las pacientes, los reportes citológicos, colposcópicos, de biopsia y los análisis en laboratorio.

La recolección de la información estuvo a cargo de Médicos ginecólogos y profesionales capacitados para la realización de las pruebas de laboratorio.

6.6.2.2. Toma de muestras

Se tomó muestras de sangre periférica de pacientes con lesiones pre neoplasicas de cuello uterino, estas se obtuvieron mediante venopunción utilizando tubos del sistema vacutainer con EDTA Dipotásico (K2). Se tomaran dos tubos de 5 mL por paciente y las muestras serán procesadas en un tiempo no mayor a 6 horas después de obtenida.

6.6.2.3. Obtención de plasma sanguíneo.

Para la cuantificación de ADN libre en plasma, es importante controlar la contaminación por ADN de células normales presentes en sangre tales como leucocitos (mononucleares y polimorfonucleares), puesto que en estos análisis de cuantificación absoluta pueden interferir, para ello se separara el plasma de cada una de las muestras por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos, separando el plasma en Tubos Eppendorff, posteriormente estos plasmas se sometían a una segunda ultracentrifugación a 13500 g durante 5 min, extrayendo el sobrenadante y transfiriéndolo a un segundo eppendorf antes del almacenaje de las muestras, este protocolo fue establecido por Page y colaboradores en el 2006. Finalmente después de este proceso las muestras se almacenaran a -20°C ³³.

6.6.2.4. Procesamiento de ADN

El plasma humano contienen muchas sustancias que interfieren con la PCR, tales como proteínas que se une a la cadena de ADN o la ADN polimerasa, por ello se uso un proceso mínimo para eliminar los factores de inhibición de la PCR este protocolo fue establecido por Umetani y colaboradores, en el que se realiza una digestión con proteinasa K (Bioline), a partir de una solución stock de 20 mg/ml de proteinasa K en un buffer de 50 mM de tris-HCl, 2mM de acetato de calcio a un pH 8, la concentración utilizada por muestra es de 2µg/ml y se incubó a 37°C toda la noche, posteriormente se inactivó la proteinasa K a 96°C en baño serológico y finalmente se

centrifugara a 10.000 g durante 5 min y Se tomo 0.2 µl de sobrenadante como amplimero para la PCR en tiempo real)¹⁵.

6.6.2.5. Cuantificación de ADN libre plasmático.

Para la cuantificación de ADN libre presente en plasma, se utilizara el protocolo establecido por Umetani y colaboradores en el 2006, por medio de PCR en tiempo real. Para maximizar la sensibilidad de la cuantificación de ADN, se amplificara el ADN directamente del plasma sanguíneo tratado con la proteinasa K, usando primers de secuencias Alu. Los primers fueron diseñados por Umetani y colaboradores los cuales amplifican secuencias consenso de Alu con un producto de tamaño de 115 pb. La secuencia del primer sentido fue 5'-CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG-3' y el primer antisentido fue 5'-CCCGAGTAGCTGGGATTACA-3', para la reacción de PCR se uso el kit de Sybr green (Applied Biosystem).

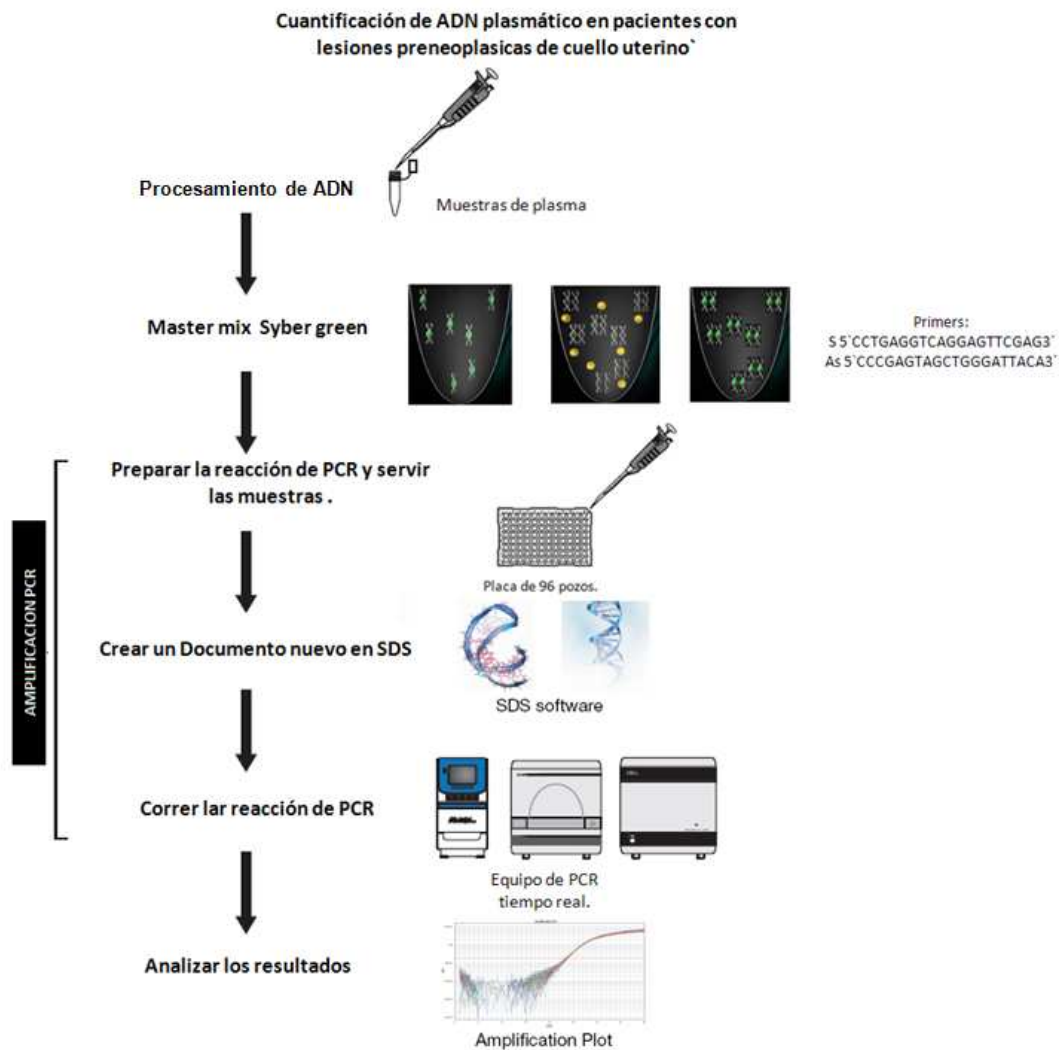


Figura 1. Metodología de cuantificación de ADN libre en plasma.

6.6.2.6. Sistematización de la información.

Se generó una base de datos en Excel, que incluyó el registro de las pacientes con los datos sociodemográficos, antecedentes ginecoobstétricos, antecedentes clínicos, resultados de las pruebas de laboratorio para concentración de ADN libre y serotipo de VPH.

6.7. CONTROL DE SESGOS

Los posibles sesgos en los que podría incurrir el estudio son:

6.7.1. Sesgos de información

Debido al instrumento de medición, la encuesta fue diseñada y revisada por

el grupo de investigación de tal manera que se incluyeran todas las variables que pueden estar relacionadas y se evaluó que fueran preguntas claras de tal manera que se hiciera comprensible para la paciente

Se realizó capacitación previa de los responsables de la recolección y codificación de la información así como del profesional que realiza la venopunción.

Por parte del entrevistado, el control se realizó dándole previa información y motivación al participante y mediante la aplicación de los instrumentos, por personal con amplia experiencia y calibrado en el diligenciamiento de la misma.

En el estudio se controlaron los sesgos debidos a la falta de sensibilidad el instrumento para que las técnicas para obtención de plasma sanguíneo y su posterior procesamiento en el laboratorio fueran realizadas en condiciones controladas, estandarizadas y siguiendo los protocolos establecidos con anterioridad desde el punto de vista preanalítico , analítico y post analítico. No se realizó introducción de metodologías diagnósticas diferentes a las inicialmente utilizadas.

6.7.2. Sesgos de selección

Sesgos de selección, el cual se controló con la selección de diferentes instituciones hospitalarias a las que acuden las pacientes para control citocolposcópico.

6.7.3. Sesgos de confusión

En el estudio están incluidos aquellos factores que han sido identificados en la literatura como posibles factores de riesgo de desarrollo de cáncer de cuello uterino y factores asociados con el incremento de ADN libre, además de aquellos aspectos que a juicio de los investigadores podrían incidir en el

6.8. ANALISIS ESTADISTICO

En primer lugar se realizo un analisis descriptivo de todas la variables sociodemograficas, antecedentes clinicos y ginecobstetricos se utilizaron distribuciones de frecuencia y distribuciones porcentuales en aquella que eran de tipo cuantitativo se utilizaron medidas de tendencia central tales como media, mediana, medidas de variabilidad y dispersion en el software SPSS.

Para determinar si existen diferencias significativas en la concentración de ADN libre por grado de neoplasia cervical se probaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas por medio de una prueba de shapiro Wilk y una prueba de Bartlet, y para establecer si existen difenrencias se realizó una prueba no parametrica de analisis de variananza Kruskal Wallis, se utilizo un valor de $p=0,05$, todas estas pruebas se corrieron mediante el software SPSS.

Para explorar la posible la asociacion de las variables sociodemograficas con la concentracion de ADN libre e realizaron en primer lugar pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza pero partiendo del hecho que esta no se cumplia se realizaron pruebas de Mann Withnney y Kruskal Wallis según la variable, esto se realizo en el software SPSS.

Finalmente para establecer la posible asociacion entre en el serotipo de VPH y la concentracion de ADN libre por grado de neoplasia cervical se realizó una prueba de Mann Withnney mediante el software SPSS.

6.8.1. Plan de divulgación

Finalmente se pasará el estudio para publicacion a la revista Ann. N.Y. Acad. Sci. acid nucleic en la cual se han publicado la mayoría de estudios realizados con ADN libre como biomarcador en diferentes áreas del conocimiento.

6. 9.CONSIDERACIONES ÉTICAS

Teniendo en cuenta que el proposito de la investigacion biomedica debe ser el mejoramiento de los procedimientos diagnosticos, terapeuticos y profilacticos, asi como la mejor comprension de la etiologia y patogenesis de las enfermedades es relevante reconocer que en la actualidad los adelantos en las tecnologias moleculares son las que mayor demanda tiene en la actualidad como ejemplo el analisis con muestras de ADN. Este boom biotecnologico plantea varias cuestiones eticas de gran importancia y que requieren de cuidado puesto que la complejidad de las situaciones planteadas por la biotecnologia en el campo de la genetica son grandes, creando confusas situaciones en el aspecto etico.

Esta es una investigación con riesgo mínimo de acuerdo con lo establecido en la resolución número 008430 de 1993³⁴ (“normas científicas, técnicas, y administrativas para la investigación en salud”) de la República de Colombia expedida por el Ministerio de Salud y tal como dicta en el Título II, capítulo 1, artículo 11. El estudio sigue los lineamientos jurídicos y éticos del país y también aquellos contemplados en la ultima modificación (59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008)³⁵ de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (“principios éticos para la investigación que involucra sujetos humanos”).

El unico aspecto etico que es resaltable en el presente estudio es el siguiente: se debe hacer uso adecuado de las bases de datos de ADN. (la base esta respaldada por una muestra biologica como el plasma sanguineo, el cual puede ser utilizado en futuras investigaciones pero con la autorizacion del paciente que participo en el estudio).

En lo que respecta a los datos y registros obtenidos se consigno de tal forma que se protegio la confidencialidad de los sujetos.

7. RESULTADOS

7.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE PACIENTES CON LESIONES PRENEOPLASICAS DE CUELLO UTERINO.

7.1.1. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS

EDAD

El promedio de edad de la población de pacientes con algún tipo de lesión pre neoplásica de cuello uterino fue de 34 años con una desviación estándar de 11 años, una edad mínima de 18 años y una edad máxima de 61 años. El 38% de la población se encuentra distribuido dentro de los 18-27 años, el 25% de las pacientes tenían edades entre los 28 y 37 años.

ESTRATO

El 56% de la población participante del presente estudio pertenecía al estrato 1 y 2, el 37% pertenecía al estrato 3 y 4 y el 7% restante pertenecía al estrato 5 y 6.

NUMERO DE COMPAÑEROS SEXUALES

El 55% de la población en estudio han tenido durante su vida de 1 a 2 compañeros sexuales, el 30% han tenido de 3 a 4 compañeros sexuales, el 10% han tenido de 5 a 6 compañeros sexuales y el 4% restante mas de 7 compañeros sexuales.

EDAD DE INICIO SEXUAL

El promedio de edad de inicio sexual de la población de estudio fue de 17 años con una desviación estándar de 2.4 años una edad mínima de 14 años y una edad máxima de 25 años. Se exploró si esta variable tiene algún tipo de asociación con el grado de lesión pre neoplásica de cuello uterino sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el promedio de edad de inicio sexual entre los grupos.(kruskal Wallis 0,855; α 0.05).

7.1.2. ANTECEDENTE CLÍNICOS

FAMILIARES CON CÁNCER

De las 92 paciente que participaron en el presente estudio, del 72% ningún miembro de su familia hasta tercer grado de consanguinidad, había presentado algún tipo de cáncer. El 28% restante algún miembro de su familia hasta tercer grado de consanguinidad, había presentado algún tipo de cáncer.

MEDICACIÓN DURANTE LOS ÚLTIMOS 15 DÍAS

EL 77% de la población de estudio no consumió ningún tipo de medicamento durante los últimos 15 días anteriores a la toma de la muestra. El 23% restante consumió algún tipo de medicamento durante los últimos 15 días anteriores a la toma de la muestra.

USO DE ANTICONCEPTIVOS

52% de la población estudiada ha ingerido anticonceptivos y el 48% restante no ha ingerido estos.

ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

el 96% de la población de estudio no ha presentado ninguna enfermedad de transmisión sexual, el 7% restante si ha presentado alguna enfermedad de transmisión sexual. Esta información fue obtenida de lo que declaro la paciente durante la encuesta.

7.1.3. ANTECEDENTES GINECOOBSTETRICOS

Tabla.1. Antecedentes obstétricos.

NUMERO	EMBARAZOS	ABORTOS	HIJOS
0	12	70	14
1	18	17	20
2	23	3	30
3	23	2	20
4	10	0	4
5	3	0	3
6	1	0	0
7	0	0	0
8	2	0	1

EMBARAZOS

El 13% de la población de estudio no han estado embarazadas, el 20% lo han estado 1 vez, el 25% 2 veces, el 25% 3 veces, el 11% 4 veces, 3% 5 veces, el 1% 6 veces y el 2% 8 veces.

ABORTOS

El 76% de la población de estudio no ha presentado abortos, el 19% un aborto, el 3% dos abortos y el 2% tres abortos.

HIJOS

El 15% de la población que participo en este estudio no tenían hijos, el 22% tenían un hijo, el 33% tenían dos hijos, el 22 tenían tres hijos, 4% tenían cuatro hijos, el 3% cinco y el 1% ocho.

EDAD PRIMER PARTO

El promedio de edad del primer parto fue de 17 años con una desviación de 8 años.

INFECCIÓN VAGINAL

El 83% de las paciente participantes del presente estudio no han presentado durante el ultimo año alguna infección vaginal, el 17% restante si ha presentado infección vaginal durante el ultimo año.

NUMERO DE CITOLOGÍAS

De la totalidad de pacientes que participaron en el presente estudio el promedio de citologías hechas durante la vida fue de 6 con una desviación estándar de 6 citologías sin embargo el 34% de esta población se ha realizado entre 1 a 2 citologías durante su vida.

7.1.4. DIAGNOSTICO CITOLÓGICO, COLPOSCOPICO E HISTOPATOLÓGICO

Tabla. 2. Tamizaje diagnóstico

RESULTADO	CITOLOGÍA	COLPOSCOPIA	BIOPSIA
NEGATIVA	0	18	28
ASC-US	21	0	0
LIEBG	54	54	38
LIEAG	17	20	26
TOTAL	92	92	92

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO. De las 92 pacientes incluidas dentro del presente estudio el 23% de estas presentaba una lesión de significado indeterminado (ASC-US), el 59% presentaban una lesión de bajo grado(LIEBG) y el 18% restante presento (LIEAG).

DIAGNÓSTICO COLPOSCOPICO. De las 92 pacientes incluidas dentro del presente estudio el 20% no presentaron lesión pre neoplásica, el 59% presentaron un LIEBG, y el 21% restante presentaron un LIEAG.

DIAGNOSTICO HISTOPATOLÓGICO. De las 92 pacientes incluidas dentro del presente estudio el 30% no presentaron lesión pre neoplásica, el 41% presentaron un LIEBG, y el 28% restante presentaron un LIEAG.

SEROTIPOS

Se encontraron dentro de la población de estudio 25 serotipos dentro de los cuales encontramos con mayor frecuencia el serotipo 16 y 18 como lo muestra la figura(2).

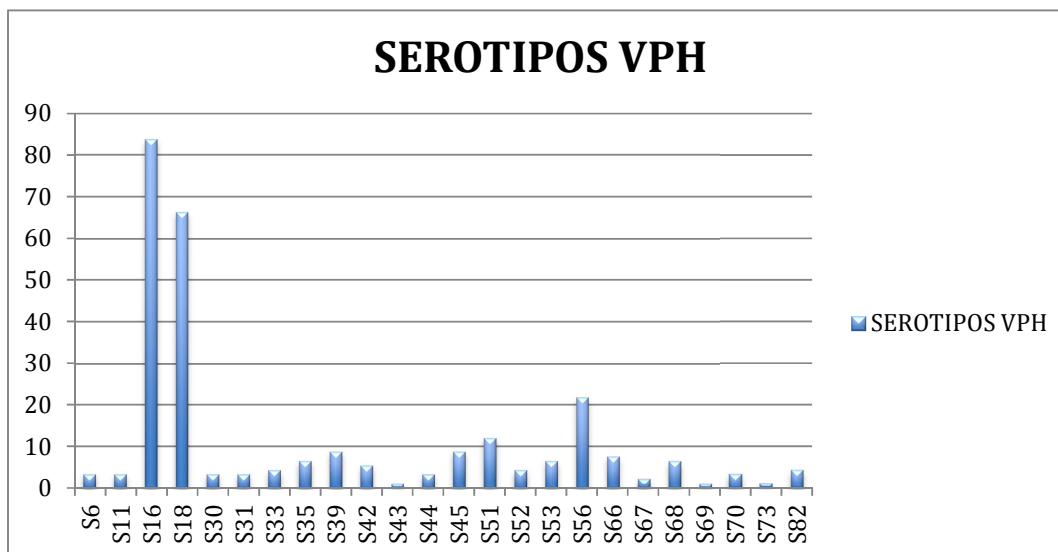


Figura 2. Se puede observar en el grafico de barras que dentro de la población de estudio los serotipos 16, 18 y 56 son los que se presentan con mayor frecuencia.

7.2. CONCENTRACIÓN DE ADN LIBRE Y SU ASOCIACIÓN CON ETAPAS PRECANCEROSAS DE CUELLO UTERINO.

7.2.1. Concentración de ADN libre en lesiones pre-cancerosas.

La concentración de ADN libre en plasma de pacientes con lesiones pre-cancerosas fue de 4515 ± 16402 ng/ μ l (media $\pm$ DS), con un valor mínimo de 0.000ng/ μ l y un valor máximo de 117373 ng/ μ l. La concentración de ADN libre en plasma no presento una distribución normal (p-valor < 0.0001; α 0.05)

7.2.2. Concentración de ADN libre en plasma por grado de neoplasia intraepitelial cervical (NICs).

La concentración de ADN libre en plasma de pacientes con LIEBG fue de 5188.7 ± 14876.5 ng/ μ l (media $\pm$ DS), en pacientes con LIEAG fue de 830.3 ± 1515.508 ng/ μ l (media $\pm$ DS), la concentración de ADN libre en plasma de

pacientes con resultado negativo por biopsia fue de 7024.7 ± 24107.5 ng/ μ l (media $\pm$ DS). Mostrando con ello que la población con resultado negativo fue la que mayor variabilidad presento en la concentración de ADN libre en plasma. Ninguna de las concentraciones de ADN libre en plasma por grado de neoplasia cervical presento una distribución normal .

Para evaluar si existen diferencias significativas entre las concentraciones de ADN libre en plasma se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis la cual mostró que no existen diferencias significativas entre las medianas de las concentraciones de ADN en los tres grupos de lesiones diagnosticadas por la biopsia LIEBG, LIEAG, y Negativa ($p;0.99$, $gl;2$ alfa 0.05) (Figura 3). Por lo tanto, la concentración de ADN libre en plasma no tiene un valor predictivo para diferenciar los tipos de lesión pre-neoplasica de cuello uterino.

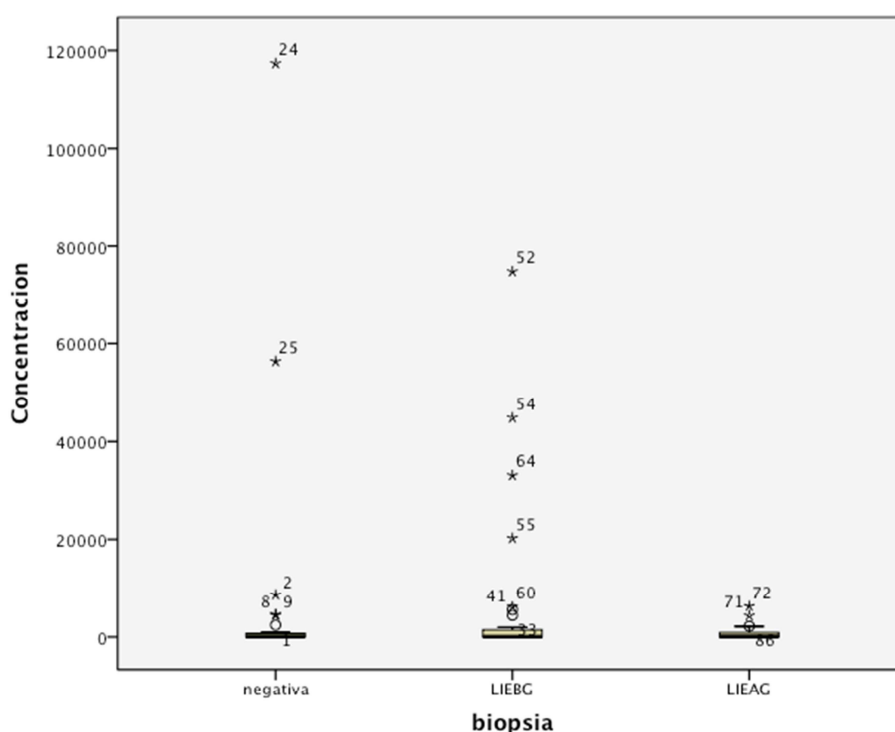


Figura 3 CONCENTRACIÓN DE ADN vs. ETAPA PRECANCEROSA DE CUELLO UTERINO

Prueba Kruskal Wallis, para las variables Negativa, LIEBG, LIEAG ($p;0.99$).

7.3. EXPLORACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DEL SEROTIPO VIRAL Y LA CONCENTRACIÓN DE ADN LIBRE.

Tabla 3. CONCENTRACIÓN DE ADN LIBRE vs. SEROTIPO DE VPH

SEROTIPO		M	Σ	δ	MAX	MIN	NORMALIDAD	MAN WITHNEY
6	NO	50	4548.7	16672.2	117373	0	0.000	0.219
	SI	4347	3541	3210.7	6272	4	0.581*	
11	NO	50	4579.9	16671	117373	0	0.000	0.160
	SI	2210	2615.6	2801.6	5598	39	0.769*	
16	NO	287	13147.4	32174.5	117373	0	0.000	0.235
	SI	41	2834.4	10672.2	74803	0	0.000	
18	NO	287	6021.13	16551.1	74803	0	0.000	0.083
	SI	33	3750.95	16411.4	117373	0	0.000	
30	NO	50	4639.92	16664.6	117373	0	0.000	0.799
	SI	72	836.67	1386.3	2437	1	0.049	
31	NO	50	4642.3	16664.3	117373	0	0.000	0.650
	SI	83	766	1251.1	2210	5	0.060*	
33	NO	68.5	4713.3	16748.6	117373	0	0.000	0.165
	SI	0.50	173	345.3	691	0	0.001	
35	NO	40.5	3684	15659.7	117373	0	0.000	0.090
	SI	4527	16434.1	23358.7	56338	0	0.042	
39	NO	57.5	4221.6	16162.5	117373	0	0.000	0.895
	SI	454	7606.0	19707.6	56338	0	0.000	
42	NO	72	4772.5	16836.7	117373	0	0.000	0.103
	SI	0	50.4	81.384	187	0	0.024	
43	NO	65	4565	16487	117373	0	0.000	0.924
	SI	-	-	-	-	-	-	
44	NO	50	4149.08	16103	117373	0	0.000	0.493
	SI	1392	15398.3	25474.6	44803	0	0.052	
45	NO	57.5	4026.17	15288.7	117373	0	0.000	0.812
	SI	225.5	9658.1	26326.9	74803	0	0.000	
51	NO	40	2644.23	10541.6	74703	0	0.000	0.059
	SI	345	18298.1	36360.5	117373	0	0.000	
52	NO	68.5	4669.4	16753.4	117373	0	0.000	0.877
	SI	19	1578.7	3128.8	6272	5	0.001	
53	NO	57.5	4749.3	16936.6	117373	0	0.000	0.861
	SI	89.5	1169.8	2453.5	6149	0	0.000	
56	NO	68.5	3999.6	12664.9	74803	0	0.000	0.731
	SI	40.5	6374.3	26165	117373	0	0.000	
58	NO	65	4866.12	17227.6	117373	0	0.000	0.796
	SI	11	1286.11	2327.1	6149	0	0.000	
59	NO	68.5	4705.3	16750.4	117373	0	0.000	0.210
	SI	1	348.5	695.6	1392	0	0.001	
66	NO	72	4834.7	17027.5	117373	0	0.000	0.130
	SI	1	644.4	1633.7	4347	0	0.000	
67	NO	68.5	4616	16572.1	117373	0	0.000	0.059
	SI	-	-	-	-	-	-	
68	NO	40	4774.9	16940	117373	0	0.000	0.161
	SI	550.5	802.5	869.6	2210	40	0.000	
69	NO	50	4558.7	16488.6	117373	0	0.000	0.483
	SI	-	-	-	-	-	-	
70	NO	65	4652.4	16662.4	117373	0	0.000	0.550
	SI	4	465.3	802.5	1392	0	0.005	
73	NO	50	4517.7	16493.8	117373	0	0.000	0.218
	SI	-	-	-	-	-	-	
82	NO	77.5	4720.6	16746.7	117373	0	0.000	0.101
	SI	2.5	11.25	19.311	40	0	0.018	

No se encontró que ningún serotipo presenta diferencias significativas en la concentración de ADN libre puesto que ningún valor de p mostró significancia en las pruebas de Mann Withney se utilizó un alfa de 0.05

7.5. EXPLORACIÓN DE VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS CON LA CONCENTRACIÓN DE ADN LIBRE.

Tabla. 4. Concentración de ADN vs. grupo de edad.

CONCENTRACIÓN DE ADN ng/μl			
Grupo de edad	Mediana	Normalidad	Kruskal Wallis
18-27	224	0.000	0.031
28-37	5	0.000	
38-47	160	0.000	
48-57	74	0.000	
58-67	1	0.000	

Por lo menos uno de los grupos de edad presenta diferencias significativas en la concentración de ADN libre en esta prueba se tuvo encuentra un valor de alfa de 0.05.

Tabla 5. Concentración de ADN vs. Estrato

CONCENTRACIÓN DE ADN ng/μl			
Estrato	Mediana	Normalidad	Kruskal Wallis
1_2	68.5	0.000	0.261
3_4	40.0	0.000	
5_6	5309.5	0.000	

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de ADN entre los estratos.

Tabla 6. Concentración de ADN vs. Estrato

Antecedentes			
Familiar con cáncer	CONCENTRACIÓN DE ADN ng/μl		
	Mediana	Normalidad	Mann Withnney
SI	77.5	0.000	0.979
NO	26.5	0.000	

No se encontró diferencias significativas en la concentración de ADN entre tener familiar con cáncer y no tenerlo.

Tabla 7. Concentración de ADN vs. N° de compañeros sexuales.

N° compañeros	CONCENTRACIÓN DE ADN ng/μl		
	Mediana	Normalidad	Kruskal Wallis
1_2	33.0	0.000	0.087
3_4	95.0	0.000	
5_6	1392.0	0.000	
mas 7	28543.5	0.173	

No se encontró diferencias significativas en la concentración de ADN entre las categorías establecidas para numero de compañeros sexuales.

Tabla 8. Concentración de ADN vs. Consumo de medicamentos

Medicamentos	CONCENTRACIÓN DE ADN ng/μl		
	Mediana	Normalidad	Mann Withnney
SI	26.5	0.000	0.929
NO	77.5	0.000	

No se encontró diferencias significativas en la concentración de ADN entre las si las pacientes habían consumido algún medicamento o no durante por menos una semana.

Tabla 9. Concentración de ADN vs. Anticonceptivos

Anticonceptivos	CONCENTRACIÓN DE ADN ng/μl		
	Mediana	Normalidad	Mann Withnney
SI	66.5	0.000	0.603
NO	52.5	0.000	

No se encontró diferencias significativas en la concentración de ADN entre las pacientes que habían consumido algún anticonceptivo y las que no.

Tabla 10. Concentración de ADN vs. ETS

ETS	CONCENTRACIÓN DE ADN ng/μl		
	Mediana	Normalidad	Mann Withnney
SI	9.5	0.021	0.339
NO	74	0.000	

No se encontró diferencias significativas en la concentración de ADN entre las pacientes que habían tenido alguna enfermedad de transmisión sexual y las que no.

Tabla 11. Concentración de ADN vs. Infección vaginal.

Infección	CONCENTRACIÓN DE ADN ng/μl		
	Mediana	Normalidad	Mann Withnney
SI	6	0.000	0.151
NO	87	0.000	

No se encontró diferencias significativas en la concentración de ADN entre las pacientes que habían tenido alguna infección vaginal durante el ultimo año y las que no.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

A partir de la década de los años ochenta se ha identificado al virus del papiloma humano (VPH) como una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar la enfermedad; así, Walboomers y colaboradores han reportado que el cáncer cervical invasor se asocia con la presencia de VPH en 99.7% de los casos. Sin embargo existen otros factores que pueden estar relacionados a esta enfermedad. Entre esos factores se encuentran el nivel socioeconómico bajo; el inicio temprano de la vida sexual; el antecedente de haber tenido dos o más parejas sexuales; la edad temprana del primer embarazo; tres o más partos; el uso de anticonceptivos hormonales, y el tabaquismo³⁶. Por lo anterior en este estudio se quiso analizar el comportamiento de la concentracion de ADN libre frente a estas variables al relizar este analisis se encontro que

ninguna de estas presentaba una asociación, sin embargo cuando se observa el comportamiento de la variable número de compañeros sexuales con la concentración de ADN libre se evidencia que esta última presenta un comportamiento exponencial, sin embargo no hay ningún reporte en la literatura que sustente esto, pero sí es importante tener en cuenta esta variable para futuros estudios que quieran evaluar la concentración de ADN libre ya no en lesiones precancerosas sino en cáncer de cuello uterino, puesto que esta puede ser una variable de confusión.

Otro aspecto importante a resaltar es la asociación de la concentración de ADN libre con el grupo étnico, XiaoYan Zhong y colaboradores encontraron que la concentración de ADN libre de mujeres y hombres mayores de 60 años, era más alta que en los otros grupos étnicos¹⁶, En este estudio se encontraron diferencias significativas entre los grupos étnicos y la concentración de ADN libre sin embargo solo se concluye esto con respecto a las mujeres.

El uso de anticonceptivos orales ha sido vinculado como un factor de riesgo de cáncer de cuello uterino. Estudios han reportado una relación entre el uso de anticonceptivos orales y la alta positividad de ADN de VPH, la explicación de esto es porque la región larga de control, LCR por las siglas en inglés, en el genoma del VPH, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroideas como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona.³⁷ Sin embargo en el presente estudio no se encontró una asociación del uso de anticonceptivos orales con la concentración de ADN libre en pacientes con lesiones precancerosas de cuello uterino.

Magnusson y colaboradores en el 2000, reportaron que la predisposición genética representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor de cuello uterino. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad.³⁸ Por consiguiente en este estudio se quiso evaluar si la concentración de ADN libre se encontraba asociada a el factor hereditario pero

no se encontró una relación del factor hereditario con la concentración de ADN libre.

Hongbin Cao y colaboradores, evaluaron el cambio en el número de copias de ADN de VPH durante la quimioterapia de pacientes con cáncer oro faríngeo en los que se observó una disminución en los niveles de ADN de VPH.³⁹ así mismo en estudios previos en los que se evaluó el número de copias de ADN de VPH en pacientes con cáncer de cuello uterino se observó que el número de copias elevado estaba asociado con tumores invasivos y últimos estadios de cáncer.⁴⁰ sin embargo en el presente estudio no se encontró relación entre la concentración de ADN libre y las diferentes etapas pre-cancerosas de cuello uterino la explicación a este hallazgo puede ser que la concentración de ADN libre sirve como marcador en pacientes con últimos estadios de cáncer.

Los serotipos con mayor prevalencia en Colombia son el 16 y el 18⁴², en el presente estudio estos aparecen con mayor frecuencia, los cuales corresponden con lo reportado por Molano y colaboradores quienes reportaron en 2005 que los serotipos de alto riesgo más comunes encontrados en el estudio fueron VPH 16(16.3%), 58 (6.2%), 56 (3.6%), 18 (0.3%) y 51 (2.9%). Sin embargo estos no presentan ninguna asociación con la concentración de ADN libre es importante evaluar esta asociación en estadios avanzados de cáncer cervical.

En el reporte presentado por Molano y colaboradores que la edad y el número de compañeros sexuales fueron los principales determinantes de la incidencia de infección por VPH⁴¹ y en el presente estudio la edad presentó una asociación significativa con la concentración de ADN siendo las pacientes del grupo de 18-27 años quienes tenían mayor concentración de ADN comparado con lo reportado por Molano y colaboradores quienes indican que las pacientes <20 son las que presentaron mayor incidencia de infección por VPH. Adicionalmente pese a no encontrar diferencias significativas entre la concentración de ADN y el número de compañeros sexuales si se observó que hay una tendencia al aumento en la concentración de ADN, con el aumento en el número de compañeros sexuales, y Molano y colaboradores observaron que a mayor número de compañeros sexuales mayor es la incidencia de infección

por VPH, lo cual nos permite inferir que es posible que la concentracion de ADN libre puede estar relacionada con la infeccion por VPH y estas variables son una relacion indirecta de ellio⁴¹.

8.1. CONCLUSIONES

- ✿ La concentración absoluta de ADN libre en plasma en este estudio no tiene un valor predictivo para diferenciar los tipos de lesión pre-neoplasica de cuello uterino.
- ✿ Los serotipos de VPH no presentan ninguna asociacion con la concentracion de ADN libre en plasma en pacientes con lesiones pre cancerosas de cuello uterino.

8.2. RECOMENDACIONES.

- ✿ Determinar el rango normal de ADN libre en plasma de individuos sanos en la población Bogotana
- ✿ Realizar un estudio con un n muestral más grande incluyendo pacientes con citología normal, cáncer cervical.
- ✿ Establecer si hay una asociacion entre la concentracion de ADN libre y la incidencia de infeccion por VPH.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Swaminathan R y Butt.A,Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006.1075: 1–9.
2. Lui Y, Ki-WaiChik, RossaW.K. Chiu, Cheong-Yip Ho, Christopher W.K. Lam, and Y.M. Dennis Lo. Predominant Hematopoietic Origin of Cell-free DNA in Plasma and Serum after Sex-mismatched Bone Marrow Transplantation. *Clinical Chemistry* 2002. 48:3,421–427.
3. Lui Y, Woo K,. Wang A, Yeung C, Li P,Chau E, Ruygrok P, Y LoD. Origin of Plasma Cell-free DNA after Solid Organ Transplantation, *Clinical Chemistry* 2003. 49, No. 3, 495-96.
4. [Jahr S](#), [Hentze H](#), [Englisch S](#), [Hardt D](#), [Fackelmayer FO](#), [Hesch RD](#), [Knippers R](#). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. [Cancer Res](#). 2001.61:1659-65.
5. Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *ClinChem* 2006. 52;1833-42.
6. Trejo-Becerril C, Oñate-Ocaña LF, Taja-Chayeb L, Vanoye-Carlo A, Cetina L, Dueñas-Gonzalez A. Serum nucleosomes during neoadjuvant chemotherapy in patients with cervical cáncer.Predictive and prognostic significance. *BMC Cancer*, 2005. 5:65
7. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lúchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: Apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol*. 2002. 21: 165-70.
8. Holdenrieder S, Stieber P, Chan LYS, Geiger S, Kremer A,Nagel D, Lo YMD. Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *ClinChem* 2005. 51:1544-6

9. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann NY Acad Sci* 2006. 1075:299-307.
10. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem* 2003. 49:1028-9.
11. Stemmer C, Beau-Faller M, Pencreac'h E, Guerin E, Schneider A, Jaqmin D, Quoix E, Gabú MP, Oudet P. Use of Magnetic Beads for Plasma Cell-free DNA Extraction: Toward Automation of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics. *Clin Chem* 2003. 49:1953-5.
12. Sozzi G, Conte D, Leon ME, Cirincione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz L, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of Free Circulating DNA As a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *J Clin Oncol.*; 2003 21:3902-8.
13. Papadopoulou E, Davilas E, Sotiriou V, Georgakopoulos E, Georgakopoulou S, Koliopoulos A, Aggelakis F. Cell free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate and breast cancer. *Ann. N.Y. Sci.* 2002. 1075: 235-243.
14. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine?. *Cancer Treat Rev* 2002. 28: 255–71.
15. Umetany N, Kim J, Hiramatsu S, Reber H, Hines O, Bilchik A y Hoon D. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: Direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical chemistry*. 2006. 52:6, 1062-1069.
16. Zhong Xiao Yan, Hann S, Kiefer V, Holzgreve W. *Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age, and frequency of blood donations?*. *Ann Hematol.* 2006. 86:139-143.
17. Fatouros IG, Destouni A, Margonis K, Jamurtas AZ, Vrettou C, Kouretas D, Mastorakos G, Mitrakou A, Taxildaris K, Kanavakis E, Papassotiriou I.

- Cell-Free Plasma DNA as a Novel Marker of Aseptic Inflammation Severity Related to Exercise Overtraining. *ClinChem* 2006;52:1820-4.
18. Rainer T y Lam N. Circulating Nucleic Acids and critical illness. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 2006. 1075:271-277.
 19. Abbas A. Lichtman A. 2006. *Inmunología Celular y Molecular*. 5 Edición. Elsevier. Madrid. España. 534 pág.
 20. Lo D, Corbetta N, Chambertain P, Rai V, Sargent L, Redman C, Wainscoat J. Presence of fetal DNA in maternal plasma. *Lancet*; 1997. 350: 485-87.
 21. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutation Research* 2006. 635; 105–117.
 22. Parkin M y Bray. F. Magnitud de los canceres atribuibles al VPH. *Vaccine* 2006. 2453 S3/11-S3/24.
 23. Kitchener H, Castle P y Cox T. Logros y limitaciones del cribado citologico cervical. 2006. *Vaccine* 24S3 S3/67-S3/75.
 24. Burd E.M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *ClinMicrobiol Rev* 2003. 16:1-17.
 25. Woodman CB, Collins SI, Young LS. **The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:11-22.**
 26. Moscicki. A, Schiffman. M, Kjaer S, Villa L. Advances recientes en la historia natural del VPH y el cancer anogenital. *Vaccine* 2006. 2453 S3/43- S3/53.
 27. Nicklas J y Buel E. Quantification of DNA in forensic samples. *AnalBioanal Chem*. 2003. 376 : 1160–1167
 28. Holdenrieder S, Eichhorn P, Beuers U, Samtleben W, Schoenermarck U, Zachoval R, Nagel D, Stieber P. Nucleosomal DNA fragments in autoimmune diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. 1075: 318-327.
 29. Karp G, 2006. *Biología Celular y Molecular*. 4 Edición. Mc Graw Hill, México, Mexico. 865 pág.

30. Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. et Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene, Fifth edition*, San Francisco: Benjamin Cummings.
31. Zipper, H. et al. [Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications](#). (2004). *Nucleic Acids Res.* 32, e103
32. Batzer M and Prescott..ALU REPEATS AND HUMAN GENOMIC DIVERSITY. *Nature*, 2002.VOL3:270-78.
33. Page K, PowlerT , Slade M, Tamburo M, Walker R, Coombes C y Shan J. The importance of careful blood processing in isolation of cells free DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. 1075: 313-317.
34. Resolución No 008430 de 1993. Ministerio de Salud. http://www.urosario.edu.co/urosario_files/a2/a24fb07a-f561-4fcc-b611-affff4374bb7.pdf . 1993.
35. Declaración de Helsinki de la Asociación Medica Mundial. Principios éticos para las investigaciones en seres humanos. http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/17c_es.pdf [59a Asamblea General, Seúl, Corea.]. 2008.
36. Walkovers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*; 1999. 189: 12-9.
37. De Villiers E M. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer*; 2003. 103:705-708.
38. Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllenstein UB, Heritability of cervical tumors. *Int. J. Cancer*, 2000. 88: 698-701.
39. Hongbin C,* Banh A, Kwok S, Shi X, Wu S, Krakow T, Khong B, Bavan, and Quynh-Thu Le. 2011. Quantitation of Human Papillomavirus DNA in Plasma of Oropharyngeal Carcinoma Patients. *International Journal of Radiation Oncology*. 2011. 1016:1-8
40. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, et al. HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. *J Clin Virol* 2004;31:204e209.

- 41.** Molano M, Posso H, Mendez F, Murrillo R, Van den Brule A, Ronderos M, Muñoz A, Meijer C, Munoz N, Historia natural de la infección por el virus del papiloma humano en una cohorte de Bogotá, D.C., Colombia 2005;9(4):209-226
- 42.** Camargo M, Soto S, Sanchez R, Perez A, Patarroyo M, Patarroya M, Frequency of Human Papillomavirus Infection, Coinfection, and Association with Different Risk Factors in Colombia. **Annals of Epidemiology**, 2011;204-213.

ANEXOS

Anexo 1.Tabla de variables

Variable	Nombre	Indicador	Codificación/ Unidad de Medida	Naturaleza y Nivel de Medición
Grado de Lesión Precancerosa.	Lesión precancerosa	Lesión Intraepitelial de Bajo grado.	LIEBG	Cualitativa Ordinal
		Lesión Intraepitelial de Alto grado	LIEAG	Cualitativa Ordinal.
		Sin Lesión Intraepitelial	SIN LIE	Cualitativa ordinal.
Concentración De ADN	ADN Libre	Máxima Concentración Mínima Concentración	ng/μl	Cuantitativa de razón.
Serotipo VPH	VPH	45 serotipos de VPH	1: presente 0:ausente	Nominal Dicotomica
Edad	Edad del paciente	Edad	Edad en años cumplidos	Cuantitativa Razón.
Estrato Socio Económico	Estrato socioeconómico de la vivienda del paciente	Estrato	1 a 6	Cualitativa ordinal
Antecedentes Familiares	Antecedente de cáncer en la familia	Cáncer Familiar	1. No 2.Si	Nominal dicotomica
Edad de Inicio sexual.	Inicio sexual	Edad inicio	Edad en años	Cuantitativa de razón.
Numero compañeros sexuales	Nº de compañeros	Compañeros Sexuales en la vida	1. 1 a 2 2. 3 a 4 3. 5 a 6 4. mas de7	Cualitativa ordinal
Uso de Anticonceptivos	Anticonceptivos	ACO	1. Sí 2. No	Nominal Dicotomica

Variable	Nombre	Indicador	Codificacion/ Unidad de medida	Naturaleza y unidad de medicion
Enfermedad de Transmisión sexual	Enfermedades Transmitidas Vía sexual	ETS	1. Sí 2. No	Dicotomica nominal
Número de Embarazos	Cantidad de embarazos	Embarazos	Número	Cuantitativa de razon.
Primiparidad	Edad al Primer parto	Edad Parto	Edad en años	Cuantitativa de razon.
Citologías Previas	Citologías Realizadas Anteriormente	Citologías	1. No 2.Si	Dicotomica nominal

ANEXO 2

CUANTIFICACION DE ADN LIBRE EN PLASMA COMO MARCADOR MOLECULAR EN PACIENTES CON LESIONES INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO Y CÁNCER CERVICAL

CONSENTIMIENTO INFORMADO

La Universidad Nacional de Colombia en asocio con el Hospital de Engativá están realizando un estudio en cuantificación de ADN libre encontrado en plasma de voluntarios sanos y pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado y cáncer cervical, para determinar su valor pronóstico.

Su colaboración es de vital importancia para nosotros, porque la investigación en la cual participa traerá consigo beneficios para la comunidad en general.

Si Usted tiene a gusto colaborar su participación consiste en:

1. Permitir la toma de una muestra de sangre, la cual será tomada por personal experto y entrenado para tal fin.
2. Autorizar la revisión de su historia clínica.
3. Autorizar el procesamiento de las muestras para el estudio.

La decisión que Usted tome es voluntaria y no influirá en el tratamiento que recibe en ésta institución.

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

HC: _____

DIAGNÓSTICO: _____

FECHA: _____

Luego de conocido el objetivo de la presente, yo _____

_____ identificado con C.C. _____

acepto mi participación voluntaria en el estudio a realizar.

Firma _____ Fecha _____

ANEXO 3

TITULO: CUANTIFICACION DE ADN LIBRE EN PLASMA COMO MARCADOR MOLECULAR EN PACIENTES CON LESIONES INTRAEPITELIALES DE BAJO Y ALTO GRADO Y CÁNCER CERVICAL

Las preguntas que se presentan a continuación corresponden a una información requerida para la realización de un estudio que se llevará a cabo en la Universidad Nacional. Agradecemos de antemano su colaboración.

Número de Encuesta Fecha:
dd mm aaaa

Características sociodemográficas

Nombres y Apellidos: _____

Teléfono residencia:

Teléfono oficina:

Región de procedencia:

1. Andina 2. Pacífica 3. Oriental 4. Caribe 5. Amazonía
6. Insular

Género:

Edad:

Estrato:

1. I 2. II 3. III 4. IV 5. V 6. VI 7. NS

Número de personas del grupo familiar:

Nivel de escolaridad:

1. Primaria incompleta 2. Primaria 3. Secundaria Incompleta
4. Secundaria 5. Técnica 6. Universitaria Incompleta
7. Universitaria 8. Postgrado

Antecedentes Familiares:

¿Algún miembro de su familia hasta tercer grado de consanguinidad ha presentado cáncer?

1. No 2. Si 3. NS

Cuántos: _____

Cuál(es): _____

¿Algún miembro de su familia hasta tercer grado de consanguinidad ha padecido
cáncer de cuello uterino? ☐

1. No 2. Si 3. NS

Cuántos: _____

Cuál(es): _____

¿A que edad se inició sexualmente? _____ años

¿Cuántos compañeros sexuales ha tenido? ☐

1. 1 a 2 2. 3 a 4 3. 5 a 6 4. Más de 7 5. NS

Antecedentes clínicos:

¿Durante los últimos 15 días ha tenido medicación?:

1. No 2.Si 3.NS ☐

¿Cuál(es)? _____

Ha ingerido anticonceptivos ☐

1. No 2.Si 3.NS

¿Vía(s) de administración? _____

¿Durante cuánto tiempo? _____

¿Ha padecido alguna enfermedad de transmisión sexual? ☐

1. No 2.Si 3.NS

¿Cuál(es)? _____

Número de embarazos:

Número de abortos:

Número de hijos:

¿Ha que edad tuvo su primer parto? _____ años

¿Ha sufrido en el último año de infección vaginal? ☐
1. No 2.Si 3.NS

DIAGNÓSTICO

Diagnóstico de la citología:

Células escamosas:

ASC-US ☐ ASC-H ☐ LSIL ☐ HSIL ☐ Ca escamoso ☐

Células Glandulares:

Células endocervicales ☐ Células endometriales ☐

Células glandulares ☐ Adenocarcinoma ☐

Observaciones: _____

Citologías previas: ☐

1. No 2.Si 3.NS

Cuántas: _____

Diagnóstico de las citologías previas.

Diagnóstico de la biopsia:

Negativo ☐ NICI ☐ NICII ☐ NICIII ☐ Ca escamoso ☐

Observaciones: _____

Diagnóstico de la colposcopia:

Negativo ☐ LIEBG ☐ LIEAG ☐ CCU Invasivo ☐

Observaciones: _____



Bogotá, Agosto 29 de 2007

Profesor
FABIO ANCÍZAR ARISTIZÁBAL
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Ciudad

Respetado Profesor:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 29 de Agosto de 2007 (Acta 03), evaluó aspectos éticos del proyecto de investigación presentado por usted como investigador principal.

Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto cumple con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto: Detección, tipificación y estado de integración del virus del Papiloma humano (VPH) en plasma sanguíneo y tejido cervical de pacientes con lesiones preneoplásicas y neoplásicas de cuello uterino.

Observaciones: Contempla la participación de pacientes, toma y manejo de muestras biológicas. Aplica el consentimiento informado y los principios de privacidad, confidencialidad y uso de la información sólo con fines investigativos. Se ciñe a la resolución 8430 de 1993 (Min. Salud). El trabajo corresponde a una investigación con riesgo mínimo y contempla la práctica de esquemas rigurosos de bioseguridad.

Concepto: Aprobatorio.

Cordialmente,


LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador
Comité de Ética

140
AÑOS

CONSTRUYENDO NACIÓN

Carrera 30 NO. 45 03, FACULTAD DE CIENCIAS Edificio 450 piso, 2 Oficina 200
Teléfono: (3165080)- Conmutador: (3165000) (1) extensión 14640
Telefax: 3165060
depfarmac_fcbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

5

