

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



***“Evaluación de estrategias alternativas de tamizaje de cáncer cervicouterino
en mujeres del municipio de Valle de Ángeles, Francisco Morazán,
Honduras”***

TESIS SUSTENTADA POR:

YESSY GABRIELA CABRERA VELÁSQUEZ, M.Q.C

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y
ZONÓTICAS**

TEGUCIGALPA, M.D.C

HONDURAS C.A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRÓN, M.S.P

ASESOR DE TESIS

ANNABELLE FERRERA, Ph.D.

TERNA EXAMINADORA

ANNABELLE FERRERA, Ph.D.

GUSTAVO FONTECHA, Ph.D.

JACQUELINE FIGUEROA, M.Sc

TEGUCIGALPA, M.D.C

HONDURAS C.A

Dedicada

A mi familia por su apoyo en todo momento...

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de estos años, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

Deseo agradecer sinceramente a mi Asesora de Tesis, Dra. Annabelle Ferrera, su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, orientaciones, su persistencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador.

A mis docentes de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, por su tiempo, dedicación y esmero en formarnos e inculcar en nosotros el deseo de generar nuevos conocimientos.

A los miembros del Grupo de Prevención e implementación /Sección de detección temprana y prevención de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), de manera especial a las doctoras Maribel Almonte y María de la Luz Hernández, por su apoyo y cooperación en el estudio.

Un agradecimiento especial a los miembros del Laboratorio DDL Diagnostic Laboratory de Vreiburh, Holanda, por su colaboración y atenciones brindadas.

De igual manera un agradecimiento especial a los miembros del Laboratorio del Proyecto Epidemiológico Guanacaste, Liberia, Costa Rica, por las atenciones brindadas durante la ejecución del proyecto.

Y finalmente a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron con su esfuerzo, dedicación y tiempo al desarrollo y culminación del estudio.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS.....	ii
LISTA DE ANEXOS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
CAPITULO I	1
1. INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 2	5
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Cáncer cervicouterino y mortalidad femenina a nivel mundial	5
2.2. Cáncer cervicouterino en América Latina.....	7
2.3. Cáncer cervicouterino en Honduras.....	7
2.4. Virus Papiloma Humano y cáncer	9
2.5. Virus del Papiloma Humano.....	10
2.5.1 Organización Genética de VPH	11
2.5.2 Proteínas de VPH	12
2.5.3 Clasificación de tipos de VPH por riesgo oncogénico	15
2.5.4 Infección por VPH	17
2.6 Historia natural del cáncer cervicouterino	19

2.7	Patología del cáncer cervicouterino	21
2.8	Diagnóstico	23
2.8.1.	Estrategias de tamizaje primario	23
2.8.2.	Estrategias de tamizaje secundario o triaje.....	26
2.9	Prevención	34
CAPITULO 3		38
3	METODOLOGÍA	38
3.1	Objetivo General	38
3.2	Objetivos Específicos.....	38
3.3	Hipótesis	39
3.4	Diseño de Investigación	39
3.5	Período de estudio	39
3.6	Población de estudio.....	39
3.7	Muestra	40
3.8	Selección de los participantes.....	40
3.9	Recolección de muestras.....	41
3.10	Análisis de laboratorio.....	42
3.10.1	Células cervicales en PreservCyt	42
3.10.2	Captura de Híbridos 2.....	43
3.10.3	LiPA (Genotyping kit HPV GP, versión 2).....	44

3.10.4	Citología de base líquida	45
3.10.5	Oncoproteína E6.....	45
3.10.6	Metilación de ADN	46
3.11	Análisis de datos.....	47
3.11.1	Manejo de datos	47
3.11.2	Análisis estadístico	47
3.12	Consideraciones éticas	48
3.13	Consideraciones de bioseguridad.....	49
CAPITULO 4		50
4	RESULTADOS	50
CAPITULO 6		86
6.	CONCLUSIONES.....	86
CAPITULO 7		89
7.	RECOMENDACIONES, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS.....	89
CAPITULO 8		91
8.	REFERENCIAS	91
ANEXOS		104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia cáncer cervicouterino a nivel mundial, 2012.	6
Figura 2. Organización genética de VPH.	11
Figura 3. Alteraciones en ciclo celular inducidas por oncoproteínas E6 y E7 de VPH.....	15
Figura 4. Árbol filogenético que representa la relación de secuencias de 118 tipos de VPH.....	16
Figura 5. Progresión cáncer cervicouterino mediado por VPH.....	21
Figura 6. Cambios celulares involucrados en la progresión de neoplasia intraepitelial a cáncer.	29
Figura 7. Distribución por edad de las participantes.....	50
Figura 8. Sensibilidad y especificidad para la prueba de hC2	55
Figura 9. Curva ROC para hC2	55
Figura 10. Distribución de genotipos de VPH detectados por el ensayo de LiPA .	57
Figura 11. Sensibilidad y especificidad para la prueba de LiPA.....	59
Figura 12. Curva ROC LiPA	60
Figura 13. Curva ROC citología base líquida	64
Figura 14. Detección de oncoproteína E6 en hisopados cervicales	66
Figura 15. Metilación <i>MAL-M1/CADAM1-M1/miR124-2</i>	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de proteínas de Papilomavirus Humanos	13
Tabla 2. Clasificaciones utilizadas en la interpretación de citologías y biopsias ...	22
Tabla 3. Ventajas y desventajas de métodos moleculares para detección de ADN de VPH	26
Tabla 4. Características de Vacunas de VPH	36
Tabla 5. Distribución de la frecuencia de resultados de citología convencional ...	51
Tabla 6. Prevalencia de VPH por Captura de Híbridos 2	52
Tabla 7. Datos comparativos entre los resultados de la citología convencional y la prueba hC2 para diagnóstico de patología cervical.....	53
Tabla 8. Características de desempeño de hC2 para detección de anomalías citológicas.....	54
Tabla 9. Frecuencia de VPH utilizando la prueba de LiPA.....	56
Tabla 10. Comparación de resultados de la citología convencional y LiPA para diagnóstico citológico de patología cervical.....	58
Tabla 11. Características de desempeño de LiPA	59
Tabla 12. Índice kappa y análisis de concordancia	61
Tabla 13. Diagnóstico citológico cervical mediante citología de base líquida	62
Tabla 14. Resultados comparativos de citología base líquida y colposcopia	63
Tabla 15. Características de desempeño de citología base líquida versus resultados colposcópicos	64
Tabla 16. Datos comparativos entre citología convencional y citología de base líquida en mujeres VPH positivas.....	65

Tabla 17. Resultados de Metilación del ADN de los promotores de los genes <i>CADMA1</i> , <i>MAL</i> y <i>miR124-2</i>	67
Tabla 18. Metilación de <i>MAL</i> , <i>CADM1</i> y <i>miR124-2</i> comparados con hallazgos colposcopicos.....	69

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Flujograma de trabajo

Anexo 2. Área de Estudio

Anexo 3. Consentimiento Informado

Anexo 4. Procedimiento Operativo Estándar toma de muestras cervicales

Anexo 5. Procedimiento Operativo Estándar transporte de muestras cervicales

Anexo 6. Flujograma Denaturación y Captura de Híbridos

LISTA DE ABREVIATURAS

VP – Virus del Papiloma

VPH – Virus del Papiloma Humano

OMS – Organización Mundial de la Salud

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

IARC – Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

ARN – Ácido Ribonucleico

mARN – Ácido Ribonucleico mensajero

E – Región “temprana” (early)

L – Región “tardía” (Late)

LCR – Región Larga de Control

ATP – Adenosina Trifosfato

Rb – Retinoblastoma

VIH – Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Ig – Inmunoglobulina

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

LIEBG – Lesión Intraepitelial de Bajo Riesgo

LIEAG – Lesión Intraepitelial de Alto Riesgo

hC2- Captura de Híbridos 2

FDA – Administración de Alimentos y Drogas

ASCUS – Células atípicas de significado incierto

CRPV – “Papiloma virus de Conejos cola de algodón” (Cottontail Rabbit Papiloma Virus)

VLP – “partículas parecidas a virus” (Virus-like particles)

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

El cáncer cervicouterino es un serio problema de salud pública a nivel mundial, reportándose más de 500,000 casos nuevos y cerca de 266,000 muertes de mujeres cada año, las cuales se concentran principalmente en países en vías de desarrollo (Ferlay et al., 2012).

Se estima que en América Latina se producen alrededor de 35,322 muertes por cáncer cervicouterino cada año; estas cifras pueden ser atribuibles en gran parte al difícil acceso a los servicios de salud, a la falta de programas adecuados de tamizaje de cáncer cervicouterino, así como a la desigualdad e inequidad social que afectan de forma especial a grupos vulnerables y desfavorecidos, como las mujeres indígenas, mujeres que residen en áreas rurales y trabajadoras del sexo (OPS, 2009).

En Honduras, el cáncer cervicouterino, es el cáncer más frecuente y la primera causa de muerte en la población femenina; en el año 2012, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se presentaron 991 casos nuevos (Ferlay et al., 2012).

La puesta en práctica de programas mejorados de prevención y control del cáncer cervicouterino podría contribuir al logro de los Objetivos de Desarrollo del Milenio mediante el acceso universal a los servicios de salud sexual y reproductiva para mejorar la salud de la mujer, y contribuiría a sí mismo con la Estrategia Mundial para la Salud de la Mujer y el Niño establecida por el Secretario General de la

Naciones Unidas en 2010 (Ki-moon, 2010), y a la Declaración Política de la Reunión de Alto Nivel de la Asamblea General sobre la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles en 2011 (WHO, 2011).

El virus Papiloma Humano (VPH) es un virus que se transmite por contacto entre personas infectadas, afectando preferentemente la piel y mucosas. Hay más de 100 tipos de VPH, pero solo alrededor de 40 se transmiten por contacto sexual y de éstos solo un reducido grupo de entre 10 y 20 son los causantes de verrugas genitales, lesiones precancerosas y cáncer de cuello uterino.

Los tipos de VPH genitales han sido clasificados en dos grupos de acuerdo a su potencial carcinogénico, en virus de alto y bajo riesgo. Estudios epidemiológicos y moleculares han establecido la asociación entre los tipos de VPH de alto riesgo (de manera específica los tipos 16 y 18) y el desarrollo de cáncer cervical (Bosch, Lorincz, Muñoz, Meijer, & Shah, 2002; H. zur Hausen, 2002).

A pesar de que la infección es transitoria y resuelta por el sistema inmune en un promedio de dos años, en algunos casos la infección persiste y progresa a lesiones de alto grado con el posterior desarrollo de cáncer (Doorbar et al., 2012; Harald zur Hausen, 1981; H zur Hausen, 1996). Además de una infección persistente por VPH de alto riesgo, otros factores como una alta carga viral, variantes intratipo de VPH, infecciones con múltiples tipos de VPH de alto riesgo y la predisposición genética contribuyen al desarrollo de cáncer cervical (Asiaf, Ahmad, Mohammad, & Zargar, 2013; Tábor, Ferrera, Bakkers, Massuger, & Melchers, 2008).

La citología cervical (Papanicolaou) ha sido la prueba de referencia para la detección del cáncer cervicouterino en el mundo. Esta estrategia ha sido aplicada eficazmente en países industrializados, junto a estrategias de seguimiento adecuadas de aquellas mujeres con resultados anormales. A diferencia de los países industrializados, en los países con bajos ingresos, fuera de las limitaciones intrínsecas de la citología, las deficiencias en el seguimiento y las dificultades económicas que impiden que las mujeres puedan seguir adecuadamente el tratamiento, han minimizado los beneficios de los sistemas de tamizaje (OPS, 2009)

En Honduras, debido a los escasos esfuerzos, a los pocos recursos económicos dirigidos a estos programas, a la falta de interés por parte de las autoridades de salud, y la falta de conocimiento de la población en general, no ha sido posible establecer un programa de tamizaje eficaz que permita reducir las tasas de cáncer cervicouterino.

En el país, son múltiples los estudios que han demostrado el papel central del VPH en el desarrollo de la patología cervical. Estudios caso-control en mujeres con displasia y cáncer cervical (Ferrera et al., 1999), carga viral del VPH 16 (Tábora et al., 2008), variantes moleculares del VPH 16 (Tabora, Melchers, van Doorn, Quint, & Ferrera, 2010), factores genéticos del huésped asociados al desarrollo del cáncer de cérvix (Ferrera et al., 2000), entre otros, han aportado valiosa información sobre esta patología.

En la actualidad, nuevas estrategias alternativas a la citología convencional constituyen un gran aporte para lograr una prevención eficaz del cáncer cervicouterino; entre ellas, la detección de ADN viral es una buena opción. Sin embargo, debido a que las infecciones transitorias son comunes, sobre todo en mujeres jóvenes, en las cuales la mayoría de las infecciones resolverán de forma espontánea, esta estrategia daría como resultado un alto número de mujeres referidas a consultas innecesarias de seguimiento, representando un método poco eficiente y no sostenible en países pobres.

Es por ello que surge la necesidad de establecer estrategias que permitan identificar y caracterizar de manera adecuada aquellas mujeres con infecciones por VPH con riesgo de desarrollar lesiones precursoras severas, ya que en las próximas décadas, las nuevas estrategias para el tamizaje primario serán el eje en la reducción del sufrimiento y las muertes causadas por cáncer cervicouterino.

Este estudio evaluó diferentes estrategias de tamizaje primario y triaje de cáncer cervicouterino en la población femenina hondureña, a fin de aportar ideas para el tamizaje de mujeres en riesgo. El presente estudio fue colateral a un estudio multicéntrico de tamizaje y triaje de cáncer de cuello uterino a nivel Latinoamericano, coordinado por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC).

CAPITULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cáncer cervicouterino y mortalidad femenina a nivel mundial

La mortalidad a nivel mundial por cáncer cervicouterino nos permite vislumbrar las inequidades de nuestro tiempo en lo que se refiere a distribución de la riqueza, equidad de género y a la disponibilidad y acceso a los servicios de salud. Las mujeres alrededor del mundo se encuentran expuestas a la infección por VPH, pero son las mujeres de los países subdesarrollados, las que han tenido poco o ningún acceso a la detección y al tratamiento temprano y mueren debido a las consecuencias de la infección por el virus.

El cáncer cervicouterino es considerado el cuarto cáncer más común en las mujeres a nivel mundial y el séptimo en la población general, representando casi el 12% de todos los cánceres femeninos en la mayoría de los países subdesarrollados (Ferlay et al., 2012).

Se ha estimado que para el año 2014 cerca de 266,000 mujeres fallecieron a causa de esta enfermedad, lo que representa el 7.5% de todas las muertes por cáncer en la población femenina (Ferlay et al., 2012). Las incidencias más altas de cáncer cervicouterino se presentan en el África Subsahariana, Melanesia, América Latina y el Caribe, Asia Central y meridional y el Sudeste Asiático, como se muestra en la Figura 1.

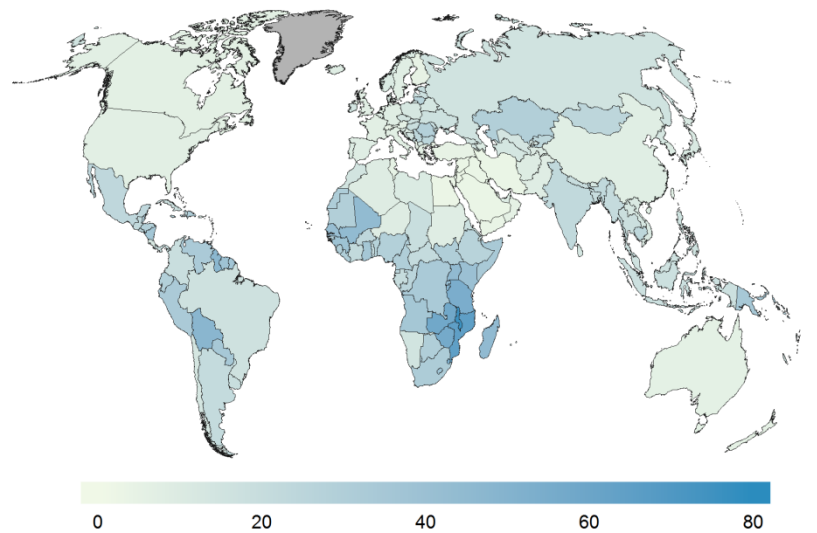


Figura 1. Incidencia cáncer cervicouterino a nivel mundial, 2012. Tomado de Ferlay et al., 2012

Durante las últimas décadas se ha producido una reducción sostenida de la incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino en países desarrollados, en gran parte debido a la implementación de tecnologías eficaces de tamizaje y tratamiento temprano (Wheeler, 2007).

A pesar de ello en los países subdesarrollados todavía no se ha logrado alcanzar un éxito similar, mientras tanto la enfermedad sigue avanzando, debido al aumento de la esperanza de vida y al crecimiento de la población. De no encontrar una solución a este problema y de continuar la situación de la misma forma, se estima que para el año 2030, el cáncer cervicouterino cobrará la vida de más de 474,000 mujeres, y que más del 95% de ellas serán mujeres de países en vías de desarrollo (Ferlay et al., 2012).

2.2. Cáncer cervicouterino en América Latina

América Latina y el Caribe presentan una de las tasas más altas de incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino en el mundo; cada año se producen alrededor de 35,322 muertes, siendo la segunda causa de muerte más frecuente por cáncer entre la población femenina (OPS, 2009). Esta es una “enfermedad de la inequidad” que afecta de manera desproporcionada a mujeres de nivel socioeconómico bajo, a menudo menos educadas y no consientes de la detección del cáncer cervicouterino o con poco acceso a ella (Villa, 2012).

Las altas tasas de incidencia y mortalidad se producen a pesar de la disponibilidad de la prueba de Papanicolaou en varios países de la región. Esto debido en gran parte a la falta de programas de tamizaje organizados, las limitación de las técnicas, la baja cobertura de la población, la deficiente vigilancia en el seguimiento y tratamiento de mujeres con citología anormal, entre otras (Almonte et al., 2010).

2.3. Cáncer cervicouterino en Honduras

El cáncer cervicouterino, es el cáncer más frecuente y la primera causa de muerte en la población femenina hondureña. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que para el año 2012, se presentaron 991 casos nuevos (Ferlay et al., 2012).

Han sido múltiples los estudios en el país encaminados a evaluar la prevalencia de la infección por VPH y su asociación con el desarrollo de cáncer cervical. Estudios caso-control han determinado VPH de alto riesgo en el 95% de los casos de

cáncer cervical; de ellos en el 42% el tipo 16. (Ferrera et al., 1999; Ferrera et al., 2000; Tabora et al., 2010; Tábor et al., 2008).

Estos estudios han demostrado, al igual que otros a nivel mundial, que la educación es un factor importante en el desarrollo y mejoramiento de la calidad de vida de las mujeres y así disminuir el riesgo de cáncer cervical; asimismo, la pobreza, el bajo nivel económico, el comportamiento sexual y la realización periódica de la citología cervical, juegan un papel importante en la incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino (Ferrera et al., 2000; Gajalakshmi, Whitlock, & Peto, 2012; Martínez & Guevel, 2013; Parikh, Brennan, & Boffetta, 2003).

En el año de 1991 la Secretaría de Salud de Honduras creó el Programa Nacional para el Control del Cáncer, con el objetivo de disminuir la morbilidad y mortalidad del cáncer en la población hondureña. Este programa establece como una de sus prioridades la detección temprana del cáncer cervicouterino. En la actualidad el sistema de tamizaje de cáncer cervicouterino para las mujeres en riesgo (30-59 años) se basa en la realización de la citología convencional, con una frecuencia de cada 3 años después de dos resultados negativos consecutivos (Secretaria de Salud de Honduras, 2013). Sin embargo, el programa no cuenta con un presupuesto asignado y no logra una amplia cobertura, poniendo de manifiesto las inequidades de nuestro sistema sanitario.

2.4. Virus Papiloma Humano y cáncer

Las primeras demostraciones experimentales de la asociación entre las verrugas humanas y animales y el posterior desarrollo de cáncer comienzan en el año 1930 con los experimentos de *Rous* y colaboradores (P. Rous, Beard, & Kidd, 1936; P. Rous & Kidd, 1940). De acuerdo a las observaciones iniciales, se demostró el potencial carcinogénico de la infección por el virus del Papiloma de conejo (Shope), en conejos domésticos (Shope, 1932), y ciertos factores que potencian la actividad carcinogénica, como las características del huésped, carga y cepa viral (P. Rous, Kidd, & Beard, 1936). Finalmente la actividad carcinogénica del virus Shope (denominado posteriormente CRPV, por las siglas en inglés “Cottontail Rabbit Papiloma Virus”) fue demostrada contundentemente por Ito, al inducir carcinomas en conejos domésticos inoculados con extractos de ADN purificados de CRPV (Ito, 1970). Así mismo, se demostró que tales extractos causaban la aparición de verrugas solo en conejos y no en otros animales lo que ilustra la especificidad del virus por su hospedero. Es hasta el año de 1933, que Shope aísla de conejos por primera vez el virus del papiloma (P Rous & Bear, 1935).

Las investigaciones en el campo se mantuvieron estáticas durante algunos años debido a la poca disponibilidad de un sistema de cultivo de tejido adecuado y a la aparente naturaleza benigna de las verrugas en el ser humano. Sin embargo, gracias a las investigaciones de diversos virus con potencial para inducir el desarrollo de cáncer, como el virus del Epstein-Barr, se abrió una nueva ventana para el estudio del VPH y su relación con el desarrollo de cáncer (Henle & Henle, 1973).

Es así que en el año de 1976 el Dr. Harald zur Hausen plantea la hipótesis de la relación causal entre la infección por VPH y el desarrollo de neoplasia cervical, (H. zur Hausen, 1976; Harald zur Hausen, 1981); dicha hipótesis ha sido validada al demostrar la presencia del genoma viral en verrugas genitales y tejidos de cáncer cervical, estableciendo el rol central del virus con el desarrollo de cáncer cervical (Bosch et al., 2002; Lorincz et al., 1992; H. zur Hausen, 1976; Harald zur Hausen, 1981; H zur Hausen, 1996).

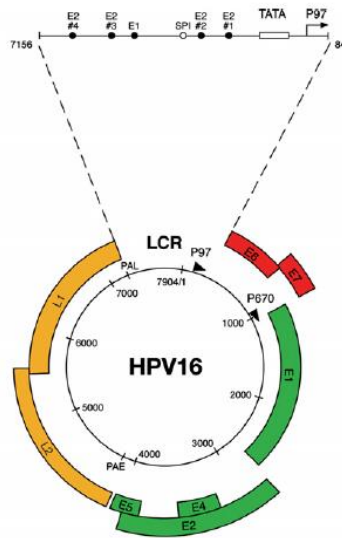
2.5. Virus del Papiloma Humano

El VPH es miembro de una familia compleja y variada de virus (Papillomaviridae), los cuales pueden ser encontrados en más de 20 especies de mamíferos, así como en otros hospederos, que incluyen pájaros, tortugas y serpientes (Doorbar et al., 2012; H zur Hausen, 1996).

El Virus del Papiloma Humano es un virus pequeño, con un genoma de ADN, circular de doble cadena de aproximadamente 8 kb de longitud, con un virión no envuelto que mide entre 45-55 nm de diámetro, el cual infecta tejidos epiteliales y mucosas del tracto anogenital, las manos y los pies (Doorbar, 2006; Longworth & Laimins, 2004).

El virus está compuesto por una cápside proteica icosaédrica formada por 72 capsómeros, cada uno formado a su vez por 5 moléculas de la proteína principal “L1” y de 12 a 36 moléculas de la proteína secundaria “L2” (Doorbar, 2007; H zur Hausen, 1996).

El genoma de VPH posee en promedio ocho marcos de lectura abiertos, los cuales son expresados mediante mARN policistrónicos transcritos a partir de una única hebra de ADN. Este se divide en tres regiones: una región temprana (E), una región tardía (L), y una región reguladora conocida como región larga de control (LCR) (Doorbar, 2007; Longworth & Laimins, 2004). Ejemplo de la organización del genoma viral se muestra en la Figura 2.



Los productos de los genes L1 y L2 son componentes estructurales correspondientes a las proteínas mayores y menores que forman la cápside icosaédrica que contiene el ADN viral (Doorbar, 2006).

La región E representa el 50% del genoma y contiene los genes que codifican proteínas implicadas en la estimulación de la proliferación celular, la replicación del ADN viral, el control de la transcripción del genoma viral y proteínas que interviene en la maduración de la partícula viral (Munger & Howley, 2002). El genoma contiene una región de control de aproximadamente 1000 pb en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como en el control de la replicación viral (Bosch et al., 2002; De la Cruz, Mohar, & Lizano, 2004; Munger & Howley, 2002).

2.5.2 Proteínas de VPH

El mecanismo de acción de VPH en el desarrollo de la neoplasia cervical se explica por la acción de sus proteínas virales, de manera particular de dos de sus oncoproteínas E6 y E7. Estas proteínas tienen la capacidad de transformar e inmortalizar las células epiteliales, al producir un alto grado de inestabilidad cromosómica.

El proceso de transformación involucra un complejo conjunto de interacciones de las proteínas virales con reguladores celulares que participan en procesos de apoptosis, proliferación y diferenciación celular (Montovani & Banks, 2009; Munger & Howley, 2002; von Knebel Doeberitz, 2002). La expresión de los genes virales es indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células en el cérvix (Longworth & Laimins, 2004; von Knebel Doeberitz, 2002). La Tabla 1 resume las principales funciones de cada una de las proteínas del VPH.

Tabla 1. Funciones de proteínas de Papilomavirus Humanos

E1	Adenosina Trifosfato (ATPasa) y ADN helicasa; reconoce y se une al origen de replicación del ADN viral como un complejo hexamérico; necesario para la replicación viral.
E2	Principal regulador de la transcripción de genes virales; se une al promotor de la transcripción viral; implicada en la replicación del ADN viral; interactúa con E1.
E4	Actúa de forma tardía en el ciclo de vida viral; interactúa con el citoesqueleto de la queratina y filamentos intermedios; induce la detención en G2; se cree facilita el ensamblaje y la liberación viral.
E5	Induce la proliferación celular no programada; puede activar los receptores de factores de crecimiento y otras proteínas quinasas; inhibe la apoptosis; inhibe el tráfico de los principales complejos de histocompatibilidad a la superficie celular
E6	Induce la síntesis de ADN; induce la telomerasa, impide la proliferación celular; interactúa con cuatro clases de proteínas de proteínas celulares: co-activadores de la transcripción, proteínas involucradas en la polaridad celular y la motilidad, supresores de tumor y los inductores de apoptosis, y la replicación del ADN y factores de reparación.
E7	Induce la proliferación celular no programada; interactúa con histonas acetil transferasas; interactúa con los reguladores negativos del ciclo celular y supresor tumoral.
L1	Proteína estructural viral mayor; ensambla en capsómeros y cápsides; interactúa con L2; interactúa con receptores celulares, codifica epítomos virales neutralizantes
L2	Proteína estructural viral menor; interactúa con el ADN; se cree facilita el ensamblaje del virión; puede interactuar con receptores celulares; codifica epítomos virales neutralizantes

Nota. Fuente: von Knebel Doeberitz M, 2002

Proteína E6

El gen *E6* codifica para una proteína de aproximadamente 150 aminoácidos (Montovani & Banks, 2009); es uno de los primeros genes que se expresa durante el ciclo viral, dicha proteína tiene la capacidad de unirse a una gran cantidad de blancos celulares, incluyendo supresores tumorales, factores de transcripción y coactivadores, transductores de señales celulares y reguladores del crecimiento celular (De la Cruz et al., 2004).

A pesar de este hecho, el principal blanco celular de la proteína E6 y quizás el más importante es el supresor de tumor p53 (Longworth & Laimins, 2004).

La proteína p53, es un factor transcripcional que estimula la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y apoptosis. La interacción de la proteína E6 conduce a la degradación de p53 a través de la vía de la ubiquitina, permitiendo la immortalización y la transformación celular (Brown et al., 2012; Jiang & Yue, 2014; Montovani & Banks, 2009; Munger & Howley, 2002).

E6 es también un factor de transcripción capaz de estimular la producción y activación de la subunidad catalítica de la telomerasa, la fibronectina y del oncogen *c-Myc* (Longworth & Laimins, 2004; Montovani & Banks, 2009).

Proteína E7

La proteína E7 está formada por pequeños polipéptidos de aproximadamente 100 aminoácidos; esta proteína es fosforilada por la caseína II en el dominio N-terminal (Ganguly & Parihar, 2009; Munger, Basile, & Duensing, 2001).

E7 interactúa con diversas proteínas celulares relacionadas con la regulación de la proliferación celular, de manera particular, de la etapa de transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. (Longworth & Laimins, 2004)

Esta proteína se asocia con e inactiva a miembros de la familia de supresores de tumores del retinoblastoma (Rb) (Longworth & Laimins, 2004). Así mismo, esta proteína es capaz de asociarse con las desacetilasas de histonas, factores de transcripción, diferentes ciclinas, cinasas dependientes de ciclina y algunos de sus

inhibidores (Brown et al., 2012; Jiang & Yue, 2014; Munger, Baldwin, & Edwards, 2004).

Estas interacciones son los mecanismos por los cuales la proteína genera la pérdida de la regulación del ciclo celular, conduciendo a un aumento de la tasa de proliferación celular, a la immortalización y finalmente a la transformación (Prendiville & Davies, 2004).

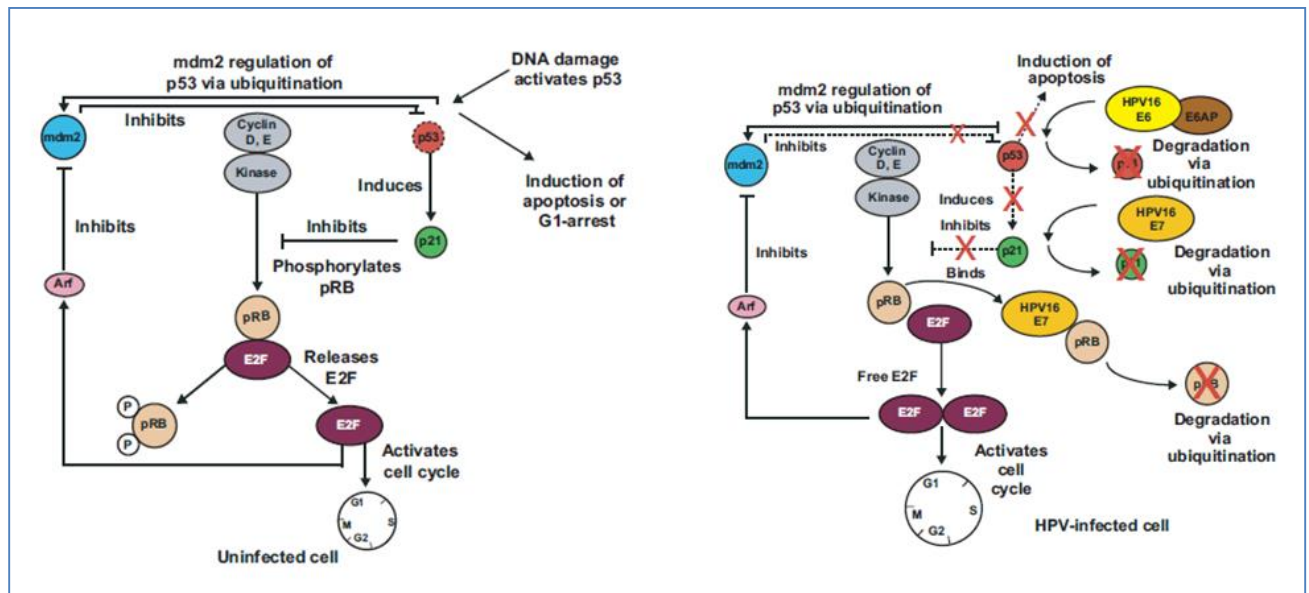


Figura 3. Alteraciones en ciclo celular inducidas por oncoproteínas E6 y E7 de VPH. Tomado de Prendiville & Davies, 2004

2.5.3 Clasificación de tipos de VPH por riesgo oncogénico

Los VPH generan una gran variedad de lesiones proliferativas en la piel, la mucosa oral, laringe y la región anogenital. Estos virus han sido agrupados en 5 géneros basados en análisis de secuencia de ADN, los cuales presentan diferentes características en cuanto a su ciclo de vida y enfermedades asociadas

(Doorbar et al., 2012). Los géneros de VPH más importantes son los papilomavirus Alfa y Beta.

Gracias a estudios basados en el análisis de secuencias de ADN se han descrito más de 100 tipos de VPH, y por lo menos 20 de ellos muestran tropismo por el tracto anogenital (Davies, Kornegay, & Iftner, 2001; Doorbar et al., 2012; H zur Hausen, 1996). La mayoría de los VPH que afectan el área anogenital pertenecen al grupo Alfa (Davies et al., 2001; de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004; IARC, 2012), como se muestra en la Figura 4.

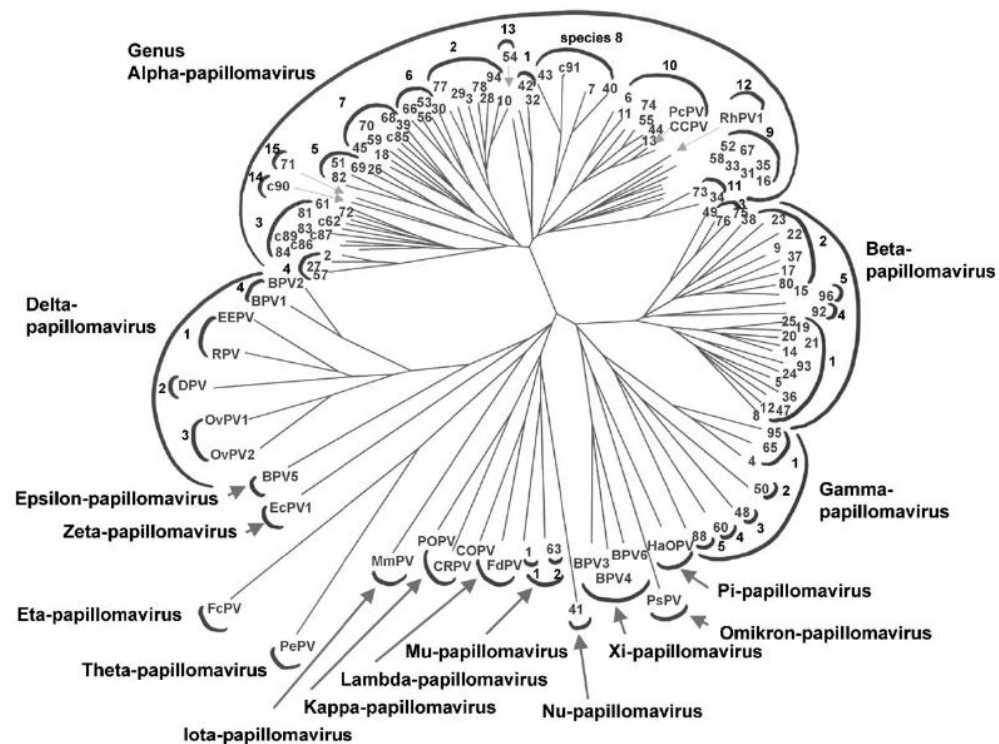


Figura 4. Árbol filogenético que representa la relación de secuencias de 118 tipos de VPH. Adaptado de E. de Villiers et al., 2004

Los tipos virales que infectan el tracto genital se clasifican a su vez en dos grupos: alto riesgo y bajo riesgo (Longworth & Laimins, 2004). Los tipos de bajo riesgo, como su nombre lo indica, no se asocian al desarrollo de neoplasias; sin embargo, éstos son capaces de producir lesiones genitales y cutáneas. Estas lesiones pueden llegar a complicarse en personas fuertemente inmunosuprimidas y pacientes con Epidermodisplasia verruciforme (Doorbar et al., 2012).

La Organización Mundial de la Salud, ha definido como tipos de alto riesgo causantes de cáncer a 12 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59 y 66), con tipos adicionales como posible causa de cáncer (68, 73). De acuerdo a diferentes investigaciones, el tipo 16 es el más prevalente de los VPH oncogénicos, siendo detectado en más de la mitad de los casos, seguido por el tipo 18 involucrado hasta en el 15% de los mismos (Doorbar et al., 2012; IARC, 2012)

2.5.4 Infección por VPH

La infección cervical por VPH es la enfermedad de transmisión sexual más prevalente en el mundo, reportándose prevalencias del 2 al 44% en mujeres sexualmente activas, con tasas más altas en mujeres jóvenes que decaen conforme la edad aumenta. El VPH es transmitido a través de lesiones microscópicas en la superficie del epitelio cervical durante las relaciones sexuales (Baseman & Koutsky, 2005).

El riesgo de infección por VPH está asociado a factores relacionados con la conducta sexual, como el inicio a temprana edad de la actividad sexual, un alto

número de parejas sexuales; otros factores como el uso de anticonceptivos orales, la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual y el tabaquismo, condicionan fuertemente el riesgo de infección y el posterior desarrollo de cáncer cervical (Baseman & Koutsky, 2005; Castellsagué, Bosch, & Muñoz, 2002; Kjellberg et al., 2000).

A pesar de que la infección por VPH es muy común, el desarrollo de neoplasias cervicales es poco frecuente. La mayoría de las lesiones cervicales producidas por VPH tienen poca probabilidad de progresar a lesiones de alto grado y cáncer cervical, ya que la mayoría regresan o involucionan de manera espontánea.

El período de tiempo necesario desde la infección hasta el desarrollo de la enfermedad pone de manifiesto que son necesarios otros factores para que avance la enfermedad; entre estos se podrían mencionar, el estado nutricional e inmunológico de la mujer, ciertos factores genéticos, multiparidad, inflamación crónica producida por otros microorganismos de transmisión sexual, variantes virales intratipo, carga viral, así como la persistencia viral (Castellsagué et al., 2002; Kjellberg et al., 2000).

Por otro lado, se ha encontrado que la infección con múltiples tipos virales de VPH está asociada con persistencia viral (Muñoz et al., 2003). Los estudios de Bachtary y van der Graaf sugieren que la infección múltiple está asociada con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad (Bachtary et al., 2002; van der Graaf et al., 2002).

Después de una infección natural solamente la mitad de las mujeres infectadas desarrollarán inmunidad contra la reinfección por el mismo tipo de VPH. Estudios en paciente con VIH, sugieren la importancia que tiene el sistema inmunológico para la eliminación de una infección por VPH (Hanisch et al., 2013; Hessol et al., 2013; Stuardo et al., 2012); éstos demuestran que la persistencia de la infección por VPH y el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer son más comunes en mujeres inmunocomprometidas que en mujeres inmunocompetentes.

La respuesta inmune contra VPH es mediada por las células T citotóxicas, requiriendo la interacción de los antígenos virales y las células del complejo mayor de histocompatibilidad clase I. De igual manera se estimula una respuesta humoral; sin embargo, las IgG e IgA producidas no intervienen en el control de la infección (Davies et al., 2001; Ouaguia, Mrizak, Renaud, Moralès, & Delhem, 2014; Stanley & Sterling, 2014).

2.6 Historia natural del cáncer cervicouterino

La historia natural del cáncer cervical es un proceso patológico continuo, que progresa de forma gradual desde lesiones moderadas a grados más severos con el desarrollo final de cáncer invasor.

Cerca del 5 al 10% de las mujeres infectadas por VPH de alto riesgo adquieren infecciones persistentes, que aumentan el riesgo de desarrollar lesiones precancerosas de alto grado y desarrollar cáncer cervicouterino si estas lesiones no se tratan (Castellsagué et al., 2002). Las células de lesiones de bajo grado permiten la síntesis de grandes cantidades de partículas virales; lo contrario ocurre

en las lesiones de alto grado, donde la síntesis de ADN viral es baja (Middleton et al., 2003).

Como se observa en la Figura 5, el evento desencadenante para la progresión de una lesión de bajo grado a una lesión de alto grado es la integración del genoma viral al genoma celular, lo que conduce a la pérdida de la expresión de la proteína E2, encargada de controlar la expresión de los genes virales tempranos, provocando una falla en la regulación de la síntesis de las oncoproteínas virales E6 y E7, originando de esta manera una proliferación desorganizada de las células basales y parabasales, así como la pérdida de la capacidad de reparación del ADN celular (Woodman, Collins, & Young, 2007). La expresión de estos genes es un requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células cervicales (Doorbar, 2007; von Knebel Doeberitz, 2002; Woodman et al., 2007).

La integración es un evento típicamente aleatorio, y puede ocurrir en cualquier sitio del genoma celular, dando como resultado diferentes niveles de disrupción en la expresión de los genes virales (Chen, Williams, Filippova, Filippov, & Duerksen-Hughes, 2014).

De esta manera la transformación de las células normales se debe a una alteración, ya sea por mutaciones o re-arreglos genéticos, de dos tipos de genes: los proto-oncogenes y los anti-oncogenes (genes supresores de tumores). Los proto-oncogenes (*c-myc*, *ras*, *erbB2*) y los anti-oncogenes (*p53* y *Rb*) son componentes celulares normales cuyas funciones intervienen en el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular (Keating, Ince, & Crum, 2001).

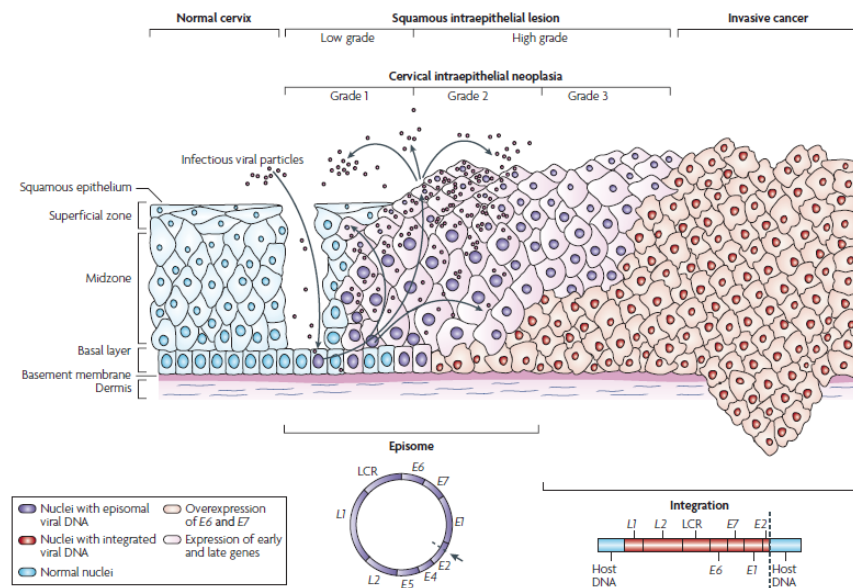


Figura 5. Progresión cáncer cervicouterino mediado por VPH. Tomado de Woodman et al., 2007

2.7 Patología del cáncer cervicouterino

La clasificación de las anomalías histológicas, se introduce inicialmente en el año 1960, clasificando las anomalías en NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) I, II, III, de acuerdo a su grado de progresión; esta clasificación ha sido la base para el diagnóstico y manejo clínico de las lesiones cervicales (IARC, 2005).

La evolución de las lesiones se caracteriza microscópicamente por la diferenciación de las células epiteliales que de manera progresiva proliferan e invaden el espacio epitelial. Inicialmente esta progresión fue descrita en función del incremento en el grado de la displasia y carcinoma *in situ*. Las displasias y atipias celulares no se infiltran a todo el espesor del epitelio, observándose una tendencia a la maduración y proliferación celular normal en los estratos superiores;

en el carcinoma *in situ* las atipias celulares comprometen todo el espacio epitelial, siendo la ausencia de la invasión del estroma la diferencia histológica entre el carcinoma *in situ* y el cáncer invasor (IARC, 2005; Sherman, 2003).

Con el objetivo de facilitar la comprensión entre las diferentes terminologías, se desarrolló en 1988, en la Conferencia de Bethesda, Maryland, Estados Unidos, una nueva clasificación denominada “Sistema Bethesda” (Dim, 2012). La nueva nomenclatura introduce los términos de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado (LIEBG y LIEAG). LIEBG incluye el NIC I, o ligera displasia, coilocitosis y condiloma; LIEAG incluye NIC II, NIC III o displasia moderada o severa respectivamente, y carcinoma *in situ* (Cox & Pathology, 2003).

A medida que se amplía el conocimiento de la historia natural de la enfermedad la clasificación de estas lesiones ha recibido diferentes denominaciones. La tabla 2 resume las diferentes nomenclaturas utilizadas en la interpretación de citologías y biopsias.

Tabla 2. Clasificaciones utilizadas en la interpretación de citologías y biopsias

Sistema clasificación Papanicolaou	Organización Mundial de la Salud	NIC	Sistema de Bethesda
I			Dentro de los límites normales
II			Cambios celulares benignos (ASC)
III	Displasia leve	NIC I	LIEBG
	Displasia moderada	NIC II	
	Displasia Severa	NIC III	LIEAG
IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	
V	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo

Nota. Fuente: IARC, 2005

2.8 Diagnóstico

Debido a que el cáncer cervicouterino manifiesta una fase pre-maligna bien definida se le considera una enfermedad detectable mediante pruebas de tamizaje.

Considerando que el cáncer cervicouterino es prevenible mediante tamizaje regular y tratamientos tempranos, es necesaria la implementación de estrategias adecuadas de tamizaje y tecnologías que contribuyan a mejorar la detección temprana.

2.8.1. Estrategias de tamizaje primario

Citología convencional y colposcopia

De manera tradicional, las anormalidades cervicales son detectadas mediante la aplicación de la prueba de Papanicolaou, la cual consiste en el estudio microscópico de células individuales procedentes del epitelio de revestimiento. En el análisis se valoran cambios morfológicos celulares, como tamaño del núcleo, cromatina, relación núcleo-citoplasma, desarrollo y maduración celular y atipias coilocíticas (IARC, 2005).

Posterior a un resultado positivo por citología, las mujeres son referidas a una visita de colposcopia, la cual consiste en una inspección visual con un estereoscopio de alta resolución del cuello uterino al cual se ha aplicado ácido acético para detectar cambios macroscópicos que pueden reflejar anomalías de maduración y diferenciación celular. Es necesaria la recolección de biopsias de

aquellas zonas que presentan las características más graves en sus cambios, ya que la detección de la enfermedad se realiza mediante histología a partir de las biopsias tomadas en esta visita.

Gracias a la aplicación de esta estrategia, en países industrializados se ha logrado reducir las tasas de morbilidad y mortalidad por cáncer cervicouterino hasta en un 70% (Brown et al., 2012). Sin embargo, esta metodología se encuentra limitada debido a su baja sensibilidad (50%) y a la elevada susceptibilidad a variantes inter-observador, reportándose muchos resultados falsos positivos y falsos negativos (Boulet, Horvath, Berghmans, & Bogers, 2008). Por su parte, las colposcopias requieren de un personal entrenado en la técnica y un equipo costoso y es por ello que la disponibilidad de una colposcopia en países pobres se dificulta; por tal motivo, se hace necesario enviar a mujeres a una colposcopia solamente cuando tenga un alto riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino y no generar una sobrecarga en estos servicios al remitir mujeres con una infección por VPH transitoria y con bajo riesgo de cáncer de cuello uterino.

Detección de ADN viral

Luego del establecimiento del papel central que juega el VPH en el desarrollo de cáncer cervical, las estrategias de tamizaje primario han sido orientadas a la detección de ADN viral en muestras cervicales.

Esta metodología se considera la más indicada en las mujeres mayores de 30 años, en las que la infección persistente por tipos de VPH de alto riesgo es un factor importante para el desarrollo de lesiones cervicouterinas precancerosas y

cancerosas. De forma muy similar a la citología, se obtiene una muestra del cuello uterino durante la exploración clínica y luego se transporta al laboratorio para ser procesada.

La detección de ADN viral ha mostrado tener una capacidad de identificar los casos positivos significativamente mayor que la citología convencional (Leinonen et al., 2009). Esto permite instaurar un tratamiento más temprano y eficaz, y por tanto disminuir la incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino. Además, ofrece la posibilidad de reducir el número de pruebas de tamizaje necesarias a lo largo de la vida de la mujer (Atkins, Jeronimo, Stoler, & Group, 2006; Naucner et al., 2007).

Se ha sugerido que estas pruebas sean aplicadas como tamizaje primario, como prueba de triaje en mujeres con resultados indeterminados o con lesiones de bajo grado en la citología cervical y como estrategia de seguimiento a mujeres después del tratamiento (Lynge et al., 2014).

La prueba de ADN viral ha sido incluida en la normativa nacional de cuatro países; Estados Unidos fue el primer país en utilizarla como estrategia de detección primaria en combinación con la citología convencional. México, Italia y España igualmente la han incluido en su normativa nacional, disponibles en determinadas comunidades (Saslow et al., 2012). Se prevé que en los próximos años, otros países comiencen a utilizar esta metodología como prueba de tamizaje primario.

Los métodos actualmente disponibles para la detección de ADN viral incluyen los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos no amplificables, métodos de

amplificación de señal y los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (Abreu, Souza, Gimenes, & Consolaro, 2012; Boulet et al., 2008; Shen-Gunther & Yu, 2011), estas metodologías se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de métodos moleculares para detección de ADN de VPH

Método	Ventajas	Desventajas	Test
Hibridación de ácidos nucleicos	Southern blot es el estándar de oro para el análisis de ADN genómico. La presencia de VPH se asocia con la morfología.	Baja sensibilidad, largo tiempo de procesamiento, cantidades relativamente grandes de ADN purificado. Southern blot e hibridación no se puede emplear ADN degradado	Southern blot, hibridación <i>In situ</i> , Dot blot
Ensayos de amplificación de señal	Cuantitativo, pruebas aprobadas por la FDA (Hc2), rangos de falsos positivos bajos, alta sensibilidad	No genotipifican de manera individual	Captura de Híbridos 2, Cervista HPV
Ensayos de amplificación de ácidos nucleicos	Tecnologías flexibles (carga viral y genotipos), elevada sensibilidad y disponibilidad de múltiples análisis	Bajas señales de amplificación de algunos genotipos de VPH, contaminación con material amplificado previamente originando falsos positivos	Microarray, Papillocheck, PCR, PCR-RFLP, PCR tiempo real, Abbot-tiempo real, Cobas 4800, INNO-LiPA, CLART HPV2, APTIMA HPV, otros

Nota: Fuente Shen-Gunther & Yu, 2011

2.8.2. Estrategias de tamizaje secundario o triaje

La prueba de tamizaje primario debería ser capaz de detectar e identificar a la mayoría de mujeres en riesgo sin necesidad de la aplicación de procedimientos diagnósticos adicionales. Sin embargo, la mayoría de pruebas basadas en la

detección de ADN viral presentan un bajo valor predictivo positivo, teniendo como resultado la referencia de mujeres con infecciones transitorias a consultas de seguimiento innecesarias (Kyrgiou et al., 2006; Lynge et al., 2014).

En la actualidad se emplea una prueba de triaje a mujeres con resultado positivo en la prueba de tamizaje primario basado en la detección de VPH para identificar a aquellas mujeres con alto riesgo de cáncer cervicouterino y que requieren de la aplicación de procedimientos invasivos adicionales.

Los procedimientos de triaje a mujeres con resultados positivos para VPH incluyen métodos visuales, citología, y biomarcadores.

Métodos visuales

Estudios demuestran que la inspección visual del cuello uterino después de aplicar una solución de ácido acético (IVAA) o una solución de Lugol (IVSL) es igual o incluso más eficaz que la citología convencional en la identificación de mujeres con lesiones precancerosas (Bhatla et al., 2012; Satyanarayana, Asthana, Bhambani, Sodhani, & Gupta, 2014). La técnica es económica, sencilla y puede ser realizado por personal sanitario de nivel medio. La crioterapia para tratamiento de lesiones precancerosas podría realizarse en el mismo día en que se ha hecho el tamizaje, o pocos días después, sin necesidad de llevar a cabo un paso adicional de confirmación diagnóstica.

Algunas desventajas incluyen la limitada sensibilidad y especificidad, el entrenamiento y experiencia del personal para identificar las lesiones, así como la

necesidad de realizar capacitaciones continuas al personal (Gaffikin, McGrath, Arbyn, & Blumenthal, 2007).

Citología de base líquida

La citología cervical en medio líquido (citología líquida) fue aprobada en el año 1996 por la FDA; en ella se emplea un solo cepillo para la recolección de células, las cuales son suspendidas y fijadas en un medio líquido; un analizador las procesa eliminando artefactos antes de su extensión sobre un portaobjetos en monocapa (Simion, Căruntu, Avădănei, Balan, & Amălinei, 2014). La metodología fue desarrollada para dar solución a los inconvenientes de la citología convencional: capturar la totalidad de la muestra, inadecuada fijación, distribución aleatoria de células anormales, presencia de elementos perturbadores y calidad del frotis (Cox, 2004; Siebers, Klinkhamer, Vedder, Arbyn, & Bulten, 2012). Entre las desventajas mencionaremos que requieren un tiempo de procesamiento más largo, necesidad de formación especializada para la interpretación de los estudios y aumento del costo en todas las fases del proceso.

Biomarcadores

Diferentes biomarcadores proteicos han sido evaluados para determinar su utilidad en la detección del cáncer cervicouterino. Muchas de estas proteínas se encuentran involucradas en la regulación del ciclo celular, transducción de señales, replicación de ADN y proliferación celular (Brown et al., 2012). La alteración en la expresión de estas proteínas es producto de la unión de los oncogenes *E6* y *E7* de VPH de alto riesgo a proteínas reguladoras en la célula huésped (Sharma & Agarwal, 2014), degradando los productos de los genes

supresores de tumor *p53* (Wilting et al., 2013) y la inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRb), alterando la regulación del ciclo celular (Brown et al., 2012; Montovani & Banks, 2009; Munger et al., 2001).

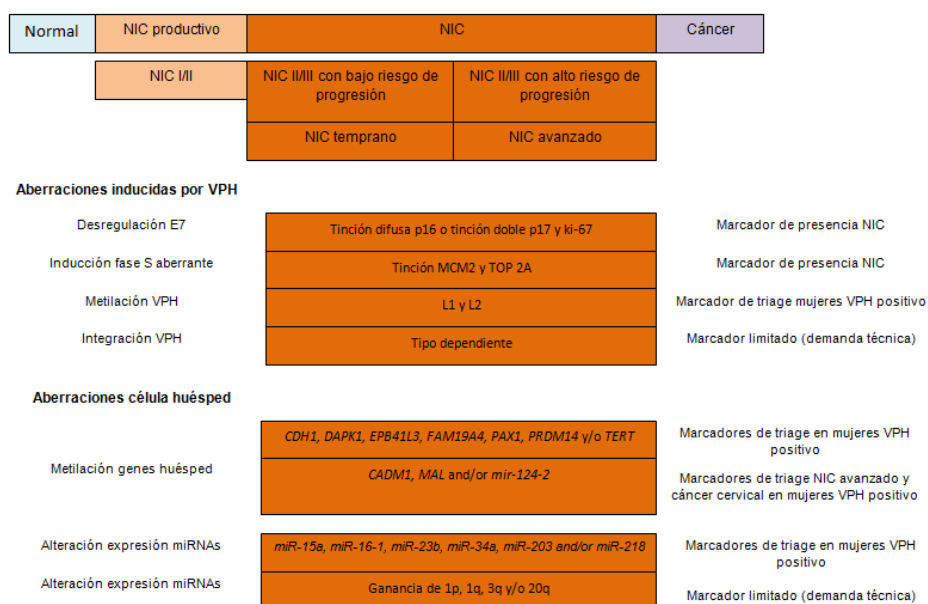


Figura 6. Cambios celulares involucrados en la progresión de neoplasia intraepitelial a cáncer. Adaptado de Steenbergen, Snijders, Heideman, & Meijer, 2014

- ARNm viral

Los ensayos que detectan ARN de VPH han sido diseñados para detectar de manera específica RNAm virales que codifican para proteínas E6 y E7, ya que son considerados los factores críticos en el desarrollo de cáncer cervical. Estas pruebas se basan en el principio de que el proceso carcinogénico es iniciado y mediado por las oncoproteínas E6 y E7 de VPH, y por ende, la expresión excesiva de los respectivos genes es un marcador de aumento del riesgo de lesiones precancerosas o cáncer (Liu et al., 2014).

Se ha propuesto que la detección de la expresión de los oncogenes *E6/E7* podría ser más específica y predecir mejor el riesgo de cáncer que las pruebas que detectan solamente ADN del VPH (Stathopoulou et al., 2014).

- Integración viral

La integración del genoma viral es un indicador de inestabilidad cromosómica severa y una etapa avanzada en el proceso de transformación celular; se han desarrollado diferentes metodologías para detectar la integración viral al genoma celular, basada en la cuantificación del ratio de *E2* y *E6/E7* (Zhang et al., 2014). El determinar el grado de integración se traduce en una elevada especificidad para la detección de lesiones avanzadas, pero presenta una limitada sensibilidad, ya que no ha sido detectada en la totalidad de los casos positivos (J. L. Cheung, Cheung, Yu, & Chan, 2013). La detección de puntos de integración de VPH para lesiones neoplásicas ha mostrado un alto potencial como marcador de progresión, es decir, para detectar las lesiones que claramente requieren tratamiento. A pesar de que cada evento de integración es único con respecto al sitio específico de integración, estudios han determinado que todas las células clonales en lesiones de alto grado y cáncer se relacionan con el sitio de integración de VPH, considerando de esta manera utilizar la integración de VPH como un marcador tumoral específico en la vigilancia post-tratamiento (Vinokurova et al., 2005; Wang, Dai, Chu, Cui, & Xu, 2013; Zhang et al., 2014).

- Biomarcadores celulares

La inactivación funcional de los oncosupresores p53 y pRB por las oncoproteínas virales E6 y E7 determinan la alteración de diferentes vías involucradas en la transformación celular y desarrollo de cáncer (Montovani & Banks, 2009), ya que presentan una alta capacidad de immortalizar y transformar queratinocitos, con un alto nivel de inestabilidad cromosómica.

El estudio molecular de los procesos de transformación celular ha revelado un complejo grupo de interacciones entre las proteínas virales con reguladores celulares involucrados en diversos procesos biológicos, principalmente en la regulación del ciclo celular.

- P16NK4a

En células en reproducción E2F está regulada por la fosforilación de pRB. La fosforilación es regulada por ciclinas dependientes de kinasas y otros inhibidores de kinasas, como CDK4 y CDK6. Cuando se produce una expresión anormal de E7 en las células basales se produce la ruptura de la unión de pRB y E2F, la cual se ve contrarrestada con la expresión masiva de p16INK4a, un importante inhibidor CDK (Wu, Li, Zhu, & Liu, 2014). De manera normal p16INK4a se expresa cuando las células se encuentran bajo estrés genómico, induciendo en las células la detención del ciclo celular de forma irreversible, para activar finalmente la apoptosis. Por ello, este marcador ha sido considerado un marcador poco representativo de la expresión de los oncogenes virales, ya que puede ser expresado en células envejecidas de manera natural o con estrés genómico

(Klaes et al., 2002). Sin embargo, en un estudio realizado se demostró que las lesiones de bajo grado positivos para p16INK4a tienen un mayor riesgo de progresión que las lesiones negativas, lo cual sugiere que p16INK4a podría ser empleado como marcador para discriminar lesiones con un mayor riesgo de progresión (Genovés et al., 2014).

- K1-67

El aumento de la proliferación de células del epitelio cervical inducida por la expresión sin regulación de oncogenes de VPH se ve reflejada por la activación de marcadores de proliferación, como el antígeno K1-67, el cual es expresado durante la fase G2 y la fase mitótica del ciclo celular (Ancuța et al., 2009; Brown et al., 2012). Kruse y col. han demostrado que la detección de K1-67 en un grupo de células puede discriminar células con lesiones de bajo grado de células normales al analizar la asociación entre el grado de la lesión y la localización epitelial de las células positivas para K1-67 (Kruse et al., 2002).

- miRNAs (MicroRNAs)

Los miRNAs son secuencias reguladoras de ARN no codificante de 21-22 nucleótidos que se unen a regiones no traducidas de ARN diana, que inhiben la traducción de proteínas o inducen la degradación de ARNm (Sharma & Agarwal, 2014). La expresión de miRNAs de manera alterada ha sido asociada con el mal funcionamiento de proteínas supresoras de tumores o la expresión descontrolada de oncogenes virales (Granados López & López, 2014). Los perfiles de expresión de miRNAs son altamente específicos y se encuentran generalmente alterados en

los cánceres, lo cual puede deberse a alteraciones en el número de copias de ADN o alteraciones epigenéticas (Sharma & Agarwal, 2014).

Diversos miRNAs, como miR-9, miR-145, miR146a, miR-199a, miR200a y miR-424, han sido encontrados desregulados en carcinomas cervicales. Estudios en los cuáles se evalúan la transformación de lesiones precancerosas han mostrado que la expresión alterada de varios miRNAs constituye un evento que se desarrolla de manera temprana en la carcinogénesis inducida por VPH (Pereira, Marques, Soares, Carreto, & Santos, 2010; Wilting et al., 2013)

- Metilación de ADN

La metilación de ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión de genes de dos maneras, ya sea directamente al impedir la unión de factores de transcripción, o de forma indirecta dando lugar a la estructura “cerrada” de la cromatina (Johannsen & Lambert, 2013). El ADN presenta regiones de 1000 a 1500 pb ricas en dinucleótidos CpG, las cuáles son reconocidas por enzimas ADN-metiltransferasas, que durante la replicación del ADN metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién formada (Greer & McCombe, 2012), manteniendo de esta forma la memoria del estado metilado en la molécula de ADN hija (Clarke et al., 2012; Greer & McCombe, 2012).

Los genes de células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios en cuanto a su nivel de metilación como marcadores tempranos en el desarrollo de tumores. En primer lugar, la hipometilación de la heterocromatina que produce inestabilidad genómica, incrementando los eventos de recombinación

mitótica; en segundo lugar, la hipermetilación de genes individuales y en tercer lugar, la hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes supresores de tumores. De forma general, los procesos de hipermetilación se asocian al silenciamiento de genes y la hipometilación se asocia con la sobreexpresión de ciertas proteínas las cuales se encuentran involucradas tanto en el proceso de invasión como en el proceso de metástasis (Clarke et al., 2012; Vaissière, Sawan, & Herceg, 2008), siendo asociada a su vez directamente con la severidad de la enfermedad. (Johannsen & Lambert, 2013; Lai et al., 2008)

En los últimos años las tecnologías basadas en la detección de ADN metilado son consideradas herramientas valiosas para el diagnóstico, terapia y pronóstico temprano de cáncer, a su vez permiten clasificar los canceres considerando los subtipos histológicos y el grado de malignidad (Clarke et al., 2012; Lai et al., 2008; Vaissière et al., 2008).

2.9 Prevención

El tamizaje y tratamiento temprano se emplea para identificar y tratar lesiones precancerosas tras la infección y persistencia del VPH. Debido a que las pruebas de detección cervical solo reconocen o detectan cambios neoplásicos después que se han producido, la vacunación contra VPH puede ser considerada como la forma primaria de prevención (Armstrong, 2010). Para que la eficacia de la vacunación sea máxima, las niñas deben vacunarse antes de que se produzca a infección por VPH, lo que ocurre a menudo poco tiempo después de inicio de la actividad sexual.

En la década de los 90 se logra la producción *in vitro* de las “virus-like particles” (VLP), las cuales son estructuralmente y antigénicamente similares a los viriones, pero que al no contener el genoma del virus, no tienen la capacidad de replicación, causar infección y mucho menos cáncer, pero mantienen intacta la capacidad de estimular el sistema inmunológico (Nayereh & Khadem, 2012).

Hasta el momento se han desarrollado dos vacunas profilácticas: una cuadrivalente (Gardasil, Merck and Co, Inc) que contiene VLP de dos tipos de alto riesgo (tipo 16 y 18) responsables en conjunto del 70% de los cánceres cervicouterinos, y dos de bajo riesgo (tipo 11 y 6) responsables del 90% de las verrugas genitales y la papilomatosis respiratoria recurrente, y una segunda vacuna bivalente (Cervarix, GlaxoSmithKline Biologicals) que contiene VLP de VPH 16 y 18. Tanto Gardasil como Cervarix son vacunas de subunidades no infecciosas compuestas por VLP, las cuales se auto-ensamblan a partir de 360 copias de L1, la principal proteína estructural del virión (Schiller, Castellsagué, & Garland, 2012). Aunque de forma conceptual ambas vacunas son similares, éstas difieren en ciertos aspectos, que se resumen en la Tabla 4.

Las últimas etapas de los ensayos de fase III que analizan las vacunas profilácticas contra VPH en mujeres jóvenes se encuentran completas en gran medida. Ambas vacunas han mostrado excelentes perfiles de seguridad e inmunogenicidad y una elevada eficacia contra los tipos virales para los cuales van dirigidas (Schiller et al., 2012).

Tabla 4. Características de Vacunas de VPH

	Gardasil	Cervarix
Fabricante	Merck	GlaxoSmithKline
Tipos	6/11/16/18	16/18
Dosis de la proteína L1	20/40/40/20 µg	20/20 µg
Células productoras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> expresando L1	Trichoplusia ni (Hi5) línea celular de insecto infectadas con baculovirus recombinante
Adyuvante	225 µg de aluminum hydroxyphosphate sulfate	500 µg hidróxido de aluminio, 50 µg 3-O-4'-monofosforil lipid A
Programa de vacunación	0,2,6 meses	0, 1, 6 meses

Nota: Fuente: Schiller et al., 2012

A partir de año 2006, la vacuna contra VPH ha estado disponible en diferentes países, y sea a través de los programas de salud públicos, o a través del sector privado para aquellas mujeres que puedan pagarla. Claramente el descubrimiento, desarrollo y evaluación de las vacunas contra VPH constituye uno de los avances más importantes en la prevención del cáncer cervicouterino, y la introducción de estas vacunas en los países pobres, quienes sufren las mayores consecuencias de la infección por el virus es un elemento importante que debe considerarse.

Por razones prácticas, no se han llevado a cabo los estudios directamente en la población diana (adolescentes y niños) de los programas actuales de vacunación; sin embargo, los estudios de inmunogenicidad demuestran excelente seguridad y una fuerte respuesta inmune en la adolescencia. Estos estudios, junto con los

resultados de las respuestas de anticuerpos duraderos y la protección de los adultos jóvenes, sugieren una proyección optimista de la eficacia de las vacunas en los programas de vacunación de los adolescentes (Nayereh & Khadem, 2012).

El 10 de diciembre de 2014, la FDA aprobó la vacuna nonavalente, Gardasil 9, que previene la infección por 9 tipos de VPH: además de los tipos 6, 11, 16 y 18, previamente incluidos en la vacuna tetravalente, incluye a 31, 33, 45, 52 y 58. La aprobación es para niñas y mujeres entre los 9 y 26 años y varones entre los 9 y 15 años, para prevenir cáncer cervical, vulvar, vaginal y anal causado por los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 y la prevención de las verrugas genitales asociadas a los tipos de VPH de bajo riesgo 6 y 11

Actualmente se anuncia una nueva vacuna de VPH para mujeres que han tenido un contacto previo con el virus; la vacuna estará disponibles con el nombre ProCervix y está probándose en varios países de la Unión Europea.

CAPITULO 3

3 METODOLOGÍA

3.1 Objetivo General

Determinar el desempeño (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo) de las estrategias alternas de tamizaje y triaje de cáncer cervicouterino en mujeres de 30 a 64 años en el Municipio de Valle de Ángeles, Francisco Morazán.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el desempeño como estrategia de tamizaje primario la prueba de Hibridación reversa (LiPA) en comparación con la prueba de Captura de Híbridos (hC2) para la detección de VPH.
2. Determinar el desempeño de la citología de base líquida para la detección de lesiones precursoras de cáncer en comparación con la citología convencional en mujeres VPH positivo.
3. Determinar la proporción de mujeres VPH positivo que expresan la oncoproteína E6 con riesgo de desarrollar lesiones precancerosas y cáncer cervical.
4. Evaluar como posible marcador pronóstico de cáncer cervicouterino la prueba de ADN metilado en mujeres VPH positivo.

3.3 Hipótesis

1. Las técnicas para la detección de ADN viral evaluadas (hC2 y LiPA) presentan una sensibilidad y especificidad similares, constituyendo metodologías aplicables como estrategias de tamizaje primario de cáncer cervicouterino.
2. Los métodos de triaje evaluados presentan un alto valor pronóstico para detectar cambios precancerosos o cancerosos en mujeres VPH positivo.

3.4 Diseño de Investigación

El diseño del estudio fue de tipo prospectivo y corte transversal.

3.5 Período de estudio

El estudio se realizó entre los meses de marzo 2014 y diciembre 2014.

3.6 Población de estudio

Por ser el objetivo del estudio la evaluación de métodos de tamizaje y triaje de cáncer cervicouterino, la población estuvo constituida por mujeres entre los 30 y 64 años de edad de una comunidad fuera del casco urbano de Tegucigalpa donde el tamizaje no es accesible a todas las mujeres.

La recolección de las muestras se llevo a cabo en el Municipio de Valle de Ángeles, Francisco Morazán, situado a 30 Kilómetros al noreste de Tegucigalpa, en dos Centros de Salud (CESAMO) dependientes de la Secretaría de Salud:

CESAMO Valle de Ángeles y CESAMO Cerro Grande. Ambos centros contaban con la infraestructura y el personal adecuado para la atención a la mujer.

3.7 Muestra

Se aplicó un muestreo por conveniencia. Se incluyeron en el estudio todas las mujeres elegibles que acudieron al tamizaje por invitación, perifoneo o a través de afiches o volantes, con el objetivo de que todas las mujeres que residían en el área tuvieran la oportunidad de participar. Se tuvo como meta, la colecta de 300 muestras de raspados cervicales de mujeres entre los 30 y 64 años de edad.

El tiempo de muestreo para alcanzar la meta fue dependiente del flujo de mujeres que acudieron voluntariamente a participar en el estudio y que reunían los criterios de inclusión.

3.8 Selección de los participantes

Se seleccionaron las mujeres que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Edad entre 30 y 64 años
- Mentalmente competente para comprender el consentimiento informado
- Capaz de comunicarse con el personal del estudio
- Ser apta físicamente para realizarle el examen ginecológico

Se excluyeron aquellas mujeres que:

- Reportaron ausencia de actividad sexual previa

- Reportaron historia de cáncer de cuello uterino
- Reportaron tratamiento para lesiones precancerosas en los últimos 6 meses
- Hubieran sido tratadas mediante histerectomía

En el CESAMO el proceso del consentimiento informado se llevó a cabo por personal capacitado, médicos o enfermeras. A las mujeres participantes se les explicó el objetivo del estudio, los beneficios y riesgos de su participación; las mujeres tuvieron tiempo para hacer preguntas y aclarar dudas. Las mujeres que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado; el consentimiento fue firmado por un testigo en los casos de mujeres participantes que no sabían leer ni escribir. En el caso de que la mujer deseaba tomarse un tiempo para decidir se difería y aquellas que no quisieron participar se les agradeció y recordó la importancia de realizarse el tamizaje para cáncer cervical.

Las mujeres participantes proporcionaron su información de contacto (nombre, dirección y teléfono). Se garantizó a cada participante que toda la información proporcionada sería manejada con confidencialidad y que su participación era libre y voluntaria.

3.9 Recolección de muestras

Una vez llevado a cabo el proceso de consentimiento informado, se asignó un número de estudio a cada participante, a las que un médico les realizó la recolección de células cervicales. Después de insertar un espéculo de tamaño adecuado, el personal de salud entrenado tomó una muestra de células del cuello

uterino usando un aplicador de Dacrón, el cual fue transportado sin medio de conservación. Posteriormente se utilizaron 2 cepillos de recolección adicionales. Para realizar la citología convencional, se utilizó el primero de los cepillos, el cual fue lavado vigorosamente en un vial con medio de conservación (PreservCyt); se procedió a recolectar la tercera muestra de células cervicales empleando el segundo cepillo de recolección.

Los viales de PreservCyt y el Dacrón se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta ser trasladados el mismo día al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, para realizar las respectivas pruebas moleculares para la detección de VPH utilizadas como métodos de tamizaje primario y la ejecución de las diferentes pruebas de triaje bajo evaluación.

3.10 Análisis de laboratorio

3.10.1 Células cervicales en PreservCyt

La solución PreservCyt es un reactivo conservante tamponado cuyo componente principal es el metanol, que actúa como medio de transporte, conservante y antibacteriano para muestras ginecológicas. Este medio de transporte es aplicable a diferentes tecnologías empleadas para la detección de ADN de VPH.

Inicialmente las muestras se utilizaron para realizar la prueba primaria de VPH mediante detección del ADN viral, usando un método de detección altamente sensible, específico y aprobado por la FDA. El método utilizado fue el de hC2. De igual manera las muestras fueron evaluadas utilizando un segundo método de detección del ADN viral mediante la prueba de LiPA con aprobación CE.

Las muestras de PreservCyt de las mujeres con resultado de VPH positivo, se utilizaron para producir una lámina de citología de base líquida, y determinar el grado de metilación de ADN; por su parte, el aplicador de Dacrón se utilizó para el ensayo de detección de la oncoproteína E6.

3.10.2 Captura de Híbridos 2

Todas las muestras fueron analizadas para tamizaje primario con la prueba hC2. Este es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de la señal; el sistema emplea una microplaca quimioluminiscente para su detección. Contiene 13 sondas para virus de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), pero no permite distinguir entre los diferentes tipo virales ni la presencia de infecciones múltiples.

Las muestras que contienen al ADN diana se hibridan con una sonda específica de ARN de VPH; los híbridos ARN-ADN resultantes se capturan sobre la superficie de una microplaca, cuyos pocillos están recubiertos con anticuerpos específicos para híbridos de ARN-ADN. Los híbridos inmovilizados se hacen reaccionar con un conjugado de fosfatasa alcalina y anticuerpos específicos para híbridos ARN-ADN, para ser detectados posteriormente por un sustrato quimioluminiscente. A medida que el sustrato es escindido por la enzima unida, se emite luz que se mide como unidades relativas de luz (RLUs) las cuales son detectadas y cuantificadas por un luminómetro.

Una medición de RLUs igual o mayor al punto corte indica la presencia de secuencias de ADN de VPH de alto riesgo en la muestra. Por su parte, una

medición menor al punto de corte indica la ausencia de secuencias de ADN de VPH de alto riesgo o niveles de ADN de VPH menores al límite de detección del ensayo. La prueba permite detectar 1 pg/ml de DNA/HPV, equivalente a 0.1 copia viral/célula.

Se siguieron las instrucciones del fabricante para su utilización.

3.10.3 LiPA (Genotyping kit HPV GP, versión 2)

El ensayo se basa en la hibridación reversa empleando cebadores GP5+/6+ para la identificación cualitativa de los tipos de VPH clasificados de alto riesgo oncogénico 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82; así como la detección de los tipos de VPH de bajo riesgo más comunes 6, 11, 30, 67 y 70, en muestras de ADN extraídas a partir de especímenes clínicos. Se emplea la detección de B-Globina para garantizar la calidad de la muestra y la presencia de factores inhibidores.

Durante el proceso de genotipificación, los amplicones biotinilados desnaturalizados, que son el resultado de la amplificación de una porción de la región L1 con cebadores GP, son hibridados con sondas de oligonucleótidos específicos, los cuales se encuentran inmovilizados como líneas paralelas en tiras de nitrocelulosa. Después de la hibridación y un lavado astringente, el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina es adicionado; éste se une a los híbridos biotinilados formados previamente. La incubación con cromógeno BCIP/NBT da lugar a un precipitado púrpura, siendo el resultado interpretado de manera visual.

3.10.4 Citología de base líquida

La lámina de citología de base líquida se realizó empleando el sistema Thinprep de Hologic en todas aquellas muestras que resultaron positivas para VPH en el tamizaje primario. El procesador es una unidad para la preparación automatizada de cualquier monocapa de células, en nuestro caso para realizar la lámina de citología cervicouterina. Una vez en el procesador, la muestra es purificada de restos de sangre, moco, desechos no celulares y debris, mediante una suave dispersión. Las células son posteriormente recolectadas por un filtro diseñado específicamente para esta función. A continuación una fina capa es transferida en un portaobjetos de vidrio en un círculo de 20 mm de diámetro, siendo depositada automáticamente en una solución fijadora. Las láminas fueron preparadas en el Laboratorio del Proyecto Epidemiológico Guanacaste, en la Ciudad de Liberia, Costa Rica; y evaluadas por un médico patólogo adjudicado al Proyecto en Guanacaste. Previó al envío de las mismas la estudiante de Maestría se trasladó a ese país para ser capacitada en la ejecución de la prueba.

3.10.5 Oncoproteína E6

Las muestras de las mujeres con un resultado VPH positivo fueron analizadas para la detección de la oncoproteína E6 de VPH 16/18 mediante un ensayo inmunocromatográfico (AVantage HPV E6 Test, Arbor Vita Corporation).

La técnica se basa en la captura y detección de la oncoproteína E6 utilizando anticuerpos monoclonales de alta afinidad (mAB) acoplados en una tira de nitrocelulosa. Se permite la migración capilar del lisado celular a través de la tira

de reacción, donde el analito es detectado por el conjugado mAB-fosfatasa alcalina (AP). El complejo mAB-AP-analito en la tira de reacción es visualizada mediante la adición de sustrato, produciendo una línea coloreada.

3.10.6 Metilación de ADN

Patrones anormales de metilación en el ADN han sido asociados a una mayor actividad carcinogénica, y las modificaciones epigenéticas en el ADN debido a patrones aberrantes de metilación en ciertos genes han sido identificadas en múltiples tipos de cáncer. En algunos cánceres humanos, incluyendo el cáncer de cérvix, cánceres de cuello y cabeza, y en el cáncer gástrico, se han detectado la metilación de los loci CADM1 (molécula de adhesión celular 1), MAL (proteína asociada a maduración de linfocito T) y/o miR 124-2.

En nuestro estudio las muestras positivas para VPH fueron analizadas con el ensayo de PCR en tiempo Real qMSP para la detección combinada de CADM1, MAL y miR124-2 metilados a partir de muestras cervicales. El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio DDL Diagnostic Laboratory de Vreiburg, Holanda, desarrolladores y donantes de la prueba. El ensayo fue ejecutado por la Asesora de Tesis, quien se trasladó a ese país donde fue capacitada para la realización del mismo.

El ADN de las muestras cervicales fue aislado empleando el sistema MagNAPure de Roche para la extracción automatizada de ácidos nucleicos de acuerdo al protocolo del fabricante. El ADN extraído fue sujeto a un tratamiento con bisulfito empleando el kit EZ DNA Methylation. El análisis de metilación de CADM-1, MAL y

miR124-2 fue llevado a cabo con un PCR Multiplex qMSP (PreCursor-M); este sistema emplea cebadores y sondas específicas para CADM-1, MAL y miR124-2 metilados, así como B-actina como control de calidad de la muestra.

3.11 Análisis de datos

3.11.1 Manejo de datos

A cada participante se le asignó un número único de identificación para el estudio y toda información que permitía identificarla fue manejada de forma confidencial. La recolección de datos se llevó a cabo usando formularios estándar, basados en manuales de operaciones. Se creó un registro electrónico y un libro de registro como respaldo.

3.11.2 Análisis estadístico

En el estudio se evaluó el rendimiento de nuevas técnicas de tamizaje y triaje para cáncer cervicouterino en mujeres entre los 30 y 64 años.

Para evaluar el primer objetivo se emplearon los resultados de cada prueba para calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada una con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%. Dichas características se evaluaron haciendo uso de las Curvas ROC para la determinación gráfica de rendimiento.

Se determinó el nivel de concordancia, mediante el cálculo del valor Kappa entre los resultados de la citología de base líquida y la citología convencional para cumplir el segundo objetivo propuesto.

Para el cumplimiento del tercer objetivo establecido se determinó la proporción de mujeres VPH positivo que expresaban la oncoproteína E6, sugiriendo un mayor riesgo de desarrollar lesiones precancerosas y cancerosas.

Para el objetivo 4 se determinó la proporción de mujeres VPH positivo que manifestaban niveles detectables de metilación en los promotores de los genes CADM1, MAL y miR 124-2.

3.12 Consideraciones éticas

El estudio fue sometido para evaluación al Comité de Ética de Investigación de Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ), el cual obtuvo su respectiva aprobación. Todas las mujeres participantes en el estudio firmaron el formulario de consentimiento informado. Éste incluía detalles acerca de los antecedentes, procedimientos del estudio, riesgos y beneficios, la declaración de confidencialidad, el uso de las muestras y el personal del estudio que debían contactar en caso necesario.

El estudio fue considerado de riesgo mínimo ya que los procedimientos constituyen una práctica habitual en los programas de tamizaje de cáncer de cuello uterino. Se aseguró de que las mujeres comprendieran que continuaban teniendo acceso a su atención médica usual si se negaban a participar en el estudio. También se garantizó que las mujeres que aceptaran participar estuvieran conscientes de que podían retirarse del estudio en cualquier momento sin que esto afectara su acceso al tamizaje regular de cáncer de cuello uterino.

3.13 Consideraciones de bioseguridad

El tipo de agente biológico estudiado representa un riesgo mínimo de infección por lo que todos los procesos de laboratorio fueron desarrollados en un laboratorio de bioseguridad tipo II.

Tanto las muestras de raspados cervicales como los reactivos utilizados en el estudio fueron manejados siguiendo los lineamientos básicos del Oficial de Bioseguridad de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas.

CAPITULO 4

4 RESULTADOS

La recolección de muestras cervicales se realizó en dos comunidades del municipio de Valle de Ángeles, Francisco Morazán; se recolectaron un total de 300 dacrones, 300 citologías convencionales y 300 raspados cervicales de mujeres entre 30 y 64 años de edad. El periodo de recolección comprendió los meses de abril y julio del año 2014; la recolección de muestras se realizó siguiendo los POEs del estudio, garantizándose de esta forma la adecuada calidad de las muestras a estudiar.

4.1 Descripción de la población

Las participantes del estudio cumplieron con el criterio de inclusión de una edad comprendida entre los 30 y 64 años, reportando una edad media de 40.5 años y una mediana de 40 años. Los rangos de edad establecidos se muestran en la Figura 7.

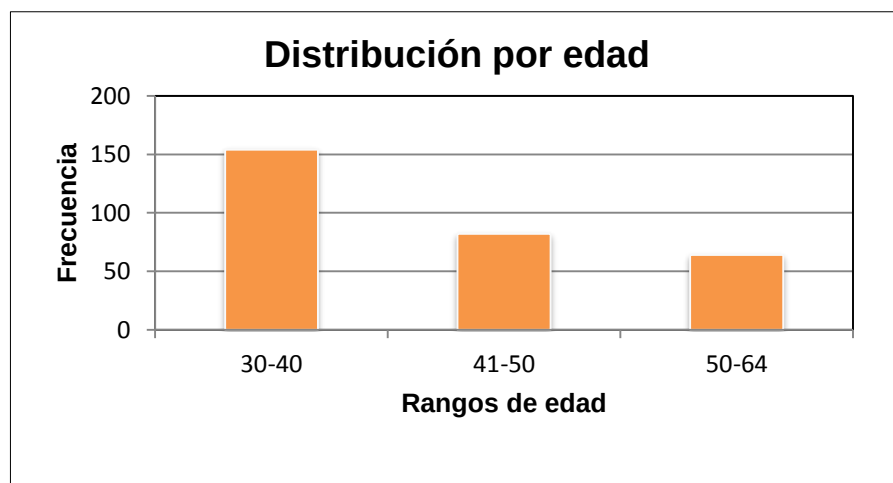


Figura 7. Distribución por edad de las participantes

El muestreo estratificado incluyó mujeres entre los 30-40 años (154/51%), esta población presentó una mayor anuencia a participar por lo cual se encuentra en mayor proporción. El 27% (82 participantes) correspondió a mujeres entre los 41-50 años de edad y un 21% (64 participantes) entre los 59-64 años; todas cumplieron con los criterios de inclusión del estudio.

4.2 Citología Convencional

La citología convencional es la prueba utilizada por el Sistema de Salud Nacional para referir a las mujeres con un resultado anormal a una visita de colposcopia; en esta visita se realiza una evaluación cervical detallada en busca de lesiones sospechosas de cáncer y la recolección de biopsias cuando la lesión lo amerita.

Los resultados obtenidos se detallan a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de la frecuencia de resultados de citología convencional

Citología convencional	No.	%
Negativo	288	96
AGC	1	0.3
Inadecuada	11	3.7
Total	300	100

AGC: Células glandulares anormales

Se evaluó un total de 300 citología cervicales convencionales; de éstas 11 (3.7%) reportaron una muestra insatisfactoria para diagnóstico, siendo algunas razones los frotis oscurecidos por sangre, frotis oscurecidos por inflamación y en otros la ausencia de componentes de la zona de transformación. En solamente una (0.3%) de las muestras citológicas fue posible la detección de cambios celulares

indicativos de una posible neoplasia, la cual fue confirmada posteriormente por colposcopia e histología. Por su parte, 288 (96%) citologías convencionales tuvieron un resultado negativo por malignidad, reportándose solamente 3 muestras con cambios reactivos por inflamación.

4.3 Captura de Híbridos 2

Las muestras fueron evaluadas con la prueba de hC2 aprobada por el FDA de la casa comercial DIGENE, para detectar la presencia de ADN de VPH en las muestras cervicales. Al emplear esta metodología como tamizaje primario se obtuvieron dos poblaciones: mujeres VPH negativo, resultado que determinó su finalización de su participación en el estudio, y mujeres VPH positivo quienes constituyeron la cohorte del estudio. Las mujeres de la cohorte fueron citadas a una segunda visita para una evaluación por colposcópica. La Tabla 6 muestra las frecuencias de VPH al aplicar la prueba de hC2.

Tabla 6. Prevalencia de VPH por Captura de Híbridos 2

	hC2		
	FA	FR	%
Positivo	35	0.12	12
Negativo	265	0.88	88
Total	300	1	100

Del total de 300 muestras cervicales analizadas en PreservCyt, en el 12% (35) fue posible detectar ADN viral de alto riesgo oncogénico; por su parte, en el 88% (265) de las muestras no se detectó ADN viral de los tipos oncogénicos detectados por

la prueba. Estos resultados muestran una prevalencia del 12% de infección por VPH en población aparentemente normal.

4.3.1 Características de desempeño de hC2

Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad relativa de hC2 como tamizaje primario para referir mujeres a una segunda evaluación, los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados de la citología convencional como método de base. El número total de muestras analizadas y comparadas por ambas metodologías fue de 289; se excluyeron del análisis estadístico 11 resultados de citología convencional ya que en ellas no fue posible establecer un diagnóstico.

Tabla 7. Datos comparativos entre los resultados de la citología convencional y la prueba hC2 para diagnóstico de patología cervical

hC2	Citología Convencional		Total
	Positiva	Negativa	
Positivo	1(0.35%)	32 (11.1%)	33
Negativo	0 (0%)	256 (88.6%)	256
Total	1	288	289

En la Tabla 8 podemos observar las características de rendimiento de hC2 utilizando el programa estadístico XLSTAT.

Tabla 8. Características de desempeño de hC2 para detección de anormalidades citológicas

Característica	Valor	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
Sensibilidad	1.000	0.171	1.000
Especificidad	0.889	0.847	0.920
Tasa de falsos positivos	0.111	0.075	0.147
Tasa de falsos negativos	0.000	0.000	0.000
VPP (Valor Predictivo Positivo)	0.030	0.000	0.089
VPN (Valor Predictivo Negativo)	1.000	1.000	1.000
P=0.003			

La evaluación estadística nos muestra una sensibilidad relativa del 100% de hC2 para detección de anormalidades cervicales identificadas en una citología convencional; por otro lado, una especificidad del 89% para identificar a mujeres sin lesiones cervicales detectables por citología. Como resultado de la elevada sensibilidad de la prueba, se determinó una tasa del 0% de falsos negativos, ya que la prueba identifica a todas las mujeres con lesiones cervicales detectables por citología; por otro lado, la especificidad demostró una tasa del 11% de falsos positivos, es decir que el 11% de mujeres con un resultado VPH positivo no presentó una citología anormal. Debido a sus características analíticas la prueba de hC2 reporta un VPP bajo (3%), y un VPN elevado (100%) para detección de lesiones cervicales en comparación con la citología convencional.

La Figura 8 resume de manera gráfica las características de rendimiento de la prueba de hC2, mostrando una capacidad del 100% de la prueba para detectar a mujeres con anormalidades citológicas.

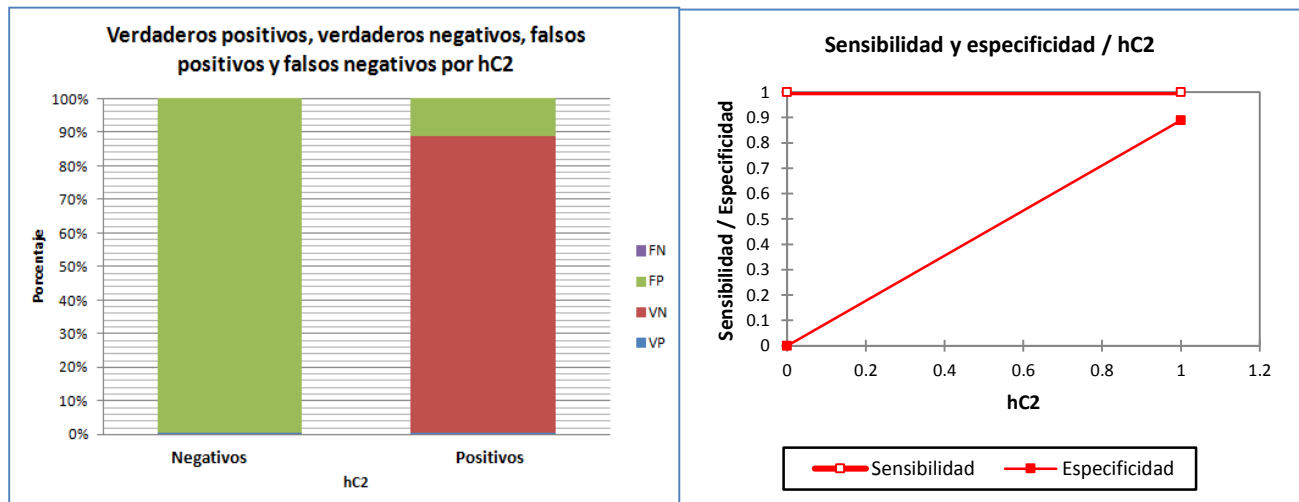


Figura 8. Sensibilidad y especificidad para la prueba de hC2

4.3.2 Análisis ROC de hC2:

El análisis ROC para la prueba de hC2 en relación a la citología convencional se presenta en la Figura 8; el área bajo la curva reporta un valor del 0.944 (95% IC: 0.944 – 0.944), y determina que la prueba permite identificar a la mayoría de las mujeres con y sin anomalías citológicas cervicales de forma correcta.

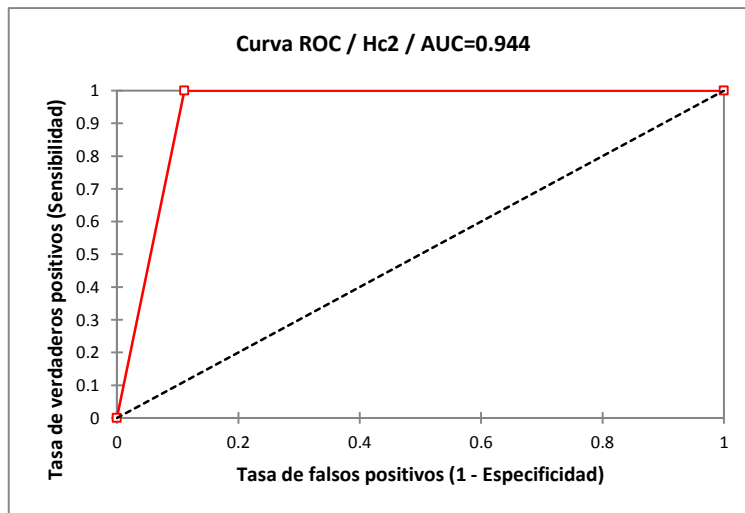


Figura 9. Curva ROC para hC2

4.4 LiPA

Las muestras en PreservCyt fueron procesadas por una segunda prueba para detección de ADN viral; la prueba empleada fue la prueba de hibridización reversa LiPA, la cual cuenta con aprobación CE para ser empleada como método de tamizaje primario de cáncer cervicouterino. Como se observa en la Tabla 9, un total de 215 muestras fueron analizadas por LiPA; en 85 de las muestras cervicales no se logró la amplificación del gen de la β -Globina, el cual asegura la calidad de la muestra y la ausencia de factores inhibidores del PCR, por lo que fueron excluidas de los análisis estadísticos. En el 11.6% (25) de las muestras cervicales analizadas por LiPA se identificó ADN de VPH de alto riesgo oncogénico; por su parte, en el 88.4% (190) de las muestras de ADN evaluadas no se detectó ADN viral.

Tabla 9. Frecuencia de VPH utilizando la prueba de LiPA

	LiPA		
	FA	FR	%
Positivo	25	0.11	11.6
Negativo	190	0.88	88.4
Total	215	1	100

4.4.1 Genotipificación VPH

La prueba LiPA nos permite identificar de manera individual los genotipos de VPH en la muestra analizada. En nuestro estudio se detectaron en total 7 tipos de VPH de alto riesgo oncogénico y 3 genotipos de VPH clasificados como tipos de bajo riesgo, como se muestra en la Figura 9.

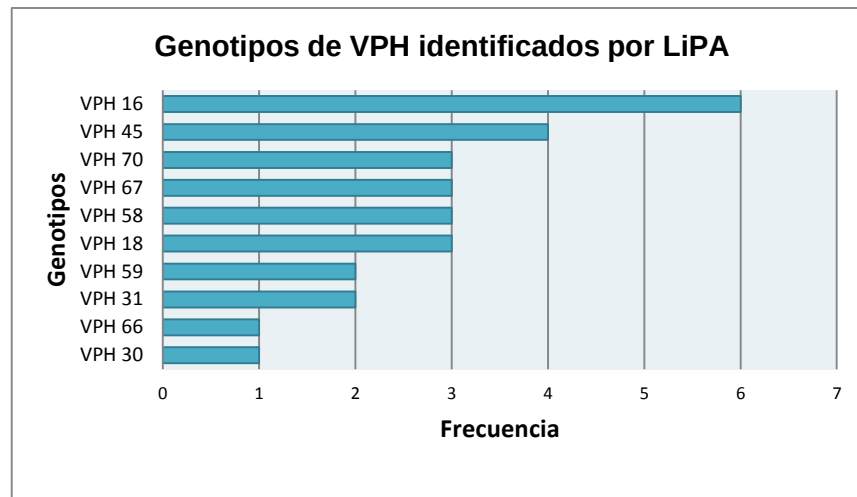


Figura 10. Distribución de genotipos de VPH detectados por el ensayo de LiPA

En el 28.6% (6) de las muestras positivas para VPH se identificó el genotipo 16, el cual constituye el tipo oncogénico con la prevalencia más alta, seguido del tipo 45, detectado en 19% (4) de los casos. Por su parte, los genotipos oncogénicos 18 y 58 se reportaron en 14.3% (3) de las muestras evaluadas. Los tipos oncogénicos 31 y 66 se detectaron en el 9.5% y 1% de las muestras estudiadas, respectivamente.

En el análisis de las muestras cervicales se identificaron los genotipos 30, 67 y 70, considerados de bajo riesgo oncogénico pero asociados en algunos casos con el desarrollo de cáncer cervicouterino. La proporción de coinfecciones con múltiples tipos virales fue baja, reportándose solamente en dos casos. No se identificaron coinfecciones de dos o más tipos de alto riesgo oncogénico, solamente asociaciones entre tipos de alto y bajo riesgo oncogénico.

4.4.2 Características de desempeño de LiPA

La sensibilidad y especificidad relativa del ensayo para identificar a mujeres con anomalías cervicales, se calcularon al evaluar los resultados de la prueba de LiPA como prueba de tamizaje primario con los resultados de la citología convencional como prueba de base. Un total de 209 muestras clínicas fueron evaluadas por ambas metodologías; se excluyeron del análisis estadístico 6 citologías convencionales insatisfactorias para evaluación.

Tabla 10. Comparación de resultados de la citología convencional y LiPA para diagnóstico citológico de patología cervical

LiPA	Citología convencional		Total
	Positiva	Negativa	
Positivo	1(0.48%)	18 (8.6%)	19
Negativo	0 (0%)	190 (91%)	190
Total	1	208	209

Se empleó el programa estadístico XLSTAT para el cálculo de las características de rendimiento de la prueba; los datos de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y las tasas de falsos positivos y negativos se muestran en la Tabla 11 y se resumen de manera gráfica en la Figura 10.

Tabla 11. Características de desempeño de LiPA

Prueba estadística	Valor	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
Sensibilidad	1.000	0.171	1.000
Especificidad	0.894	0.844	0.929
Tasa de falsos positivos	0.106	0.064	0.147
Tasa de falsos negativos	0.000	0.000	0.000
VPP (Valor Predictivo Positivo)	0.043	0.000	0.127
VPN (Valor Predictivo Negativo)	1.000	1.000	1.000
P= 0.005			

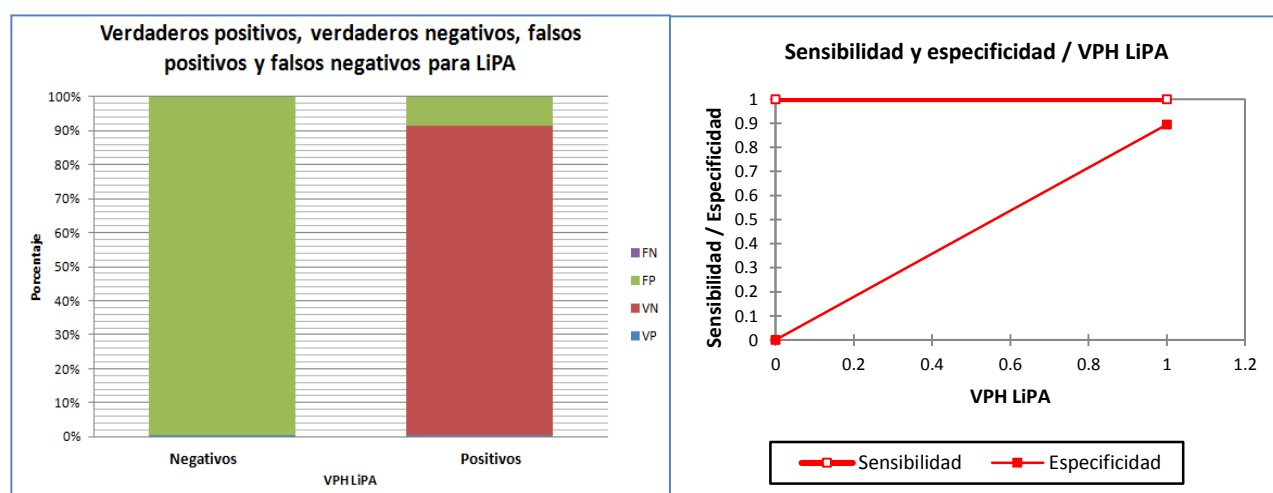


Figura 11. Sensibilidad y especificidad para la prueba de LiPA

Los cálculos y gráficas anteriores indican que la sensibilidad relativa de LiPA fue del 100% para detectar el total de positivos diagnosticados por citología convencional, y una tasa de falsos negativos del 0%; la especificidad relativa de LiPA nos muestra que la prueba fue negativa en el 89% del total de negativos diagnosticados por citología convencional, con una tasa de falsos positivos del 11%. Estos resultados demuestran un 100% de probabilidad que una mujer con un

resultado VPH negativo por LiPA tenga un resultado negativo por citología convencional.

4.4.3 Análisis ROC:

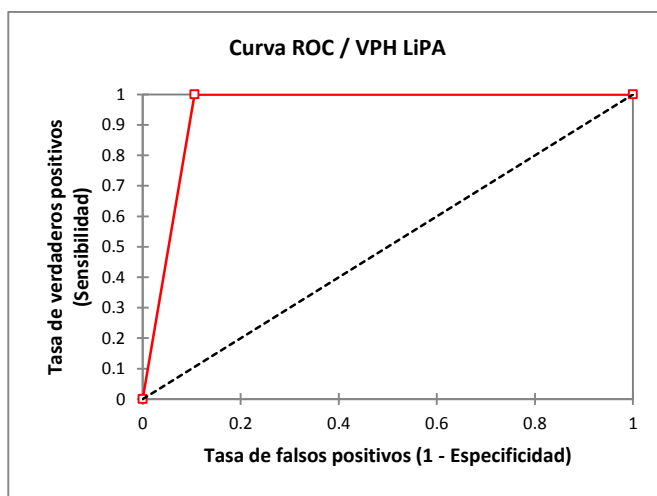


Figura 12. Curva ROC LiPA

AUC	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
0.947	0.000	0.947	0.947

El análisis del área bajo la curva para la prueba de LiPA en relación a la citología convencional, la cual se muestra en la Figura 11, determina que la prueba de LiPA permite discriminar de manera correcta a las mujeres con resultados positivos y negativos identificados por citología convencional.

4.5 Concordancia hC2-LiPA

Para determinar el nivel de concordancia entre hC2 y LiPA para discriminar mujeres con lesiones cervicales de mujeres sin lesiones, se empleó la prueba estadística Kappa para relacionar los resultados de ambos ensayos.

Los niveles de concordancia se analizaron de la siguiente manera:

Tabla 12. Índice kappa y análisis de concordancia

Valor K	Fuerza de concordancia
<0.20	Pobre
0.21-0.40	Débil
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Buena
0.81-1.00	Muy buena

El cálculo del nivel de concordancia entre ambos ensayos fue calculada mediante el analizador en línea VassarStats.

	hC2		
LiPA	Positiva	Negativa	Total
Positivo	20 (9.3%)	1 (0.47%)	21
Negativo	15 (7%)	179 (83.3%)	194
Total	35	180	215

Índice Kappa	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
0.67	0.074	0.53 (IC 95%)	0.82 (IC 95%)

Los datos sugieren que hC2 y LiPA presentan un buen nivel de concordancia para detectar ADN de VPH en raspados cervicales y referir a una segunda evaluación cuando el caso lo amerite. Cabe mencionar que el cálculo discrepante puede ser

resultado de las muestras inadecuadas para diagnóstico que fueron excluidas de las estadísticas.

4.6 Citología de base líquida

En la Tabla 13 mostramos los resultados de citología líquida de las mujeres VPH positivas después de ser analizadas por el Patólogo del Proyecto Epidemiológico Guanacaste, en Liberia, Costa Rica.

Los diagnósticos reportados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Diagnóstico citológico cervical mediante citología de base líquida

Citología de base líquida			
Diagnóstico	FA	FR	%
ASC	1	0.03	3
ASC-US	5	0.14	14
LIEAG	1	0.03	3
LIEBG	6	0.17	17
Negativo	12	0.34	34
Inadecuada	10	0.29	29

LIEAG: Lesión Intraepitelial de Alto Grado; LIEBG: Lesión Intraepitelial de Bajo grado

4.6.1 Características de desempeño de Citología de base líquida

Nuestro estudio es colateral a un estudio multicéntrico de tamizaje y triaje de cáncer cervicouterino llevado a cabo a nivel Latinoamericano y es por ello que disponemos de los resultados obtenidos por colposcopia. Los resultados colposcópicos fueron empleados como método de base para el cálculo de sensibilidad y especificidad de la citología de base líquida para detectar lesiones sospechosas de cáncer cervicouterino.

Tabla 14. Resultados comparativos de citología base líquida y colposcopia

Citología base líquida	Colposcopia		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	4 (16.7%)	8 (33.3%)	12
Negativa	2 (8.3%)	10 (41.7%)	12
Total	6	18	24

En la Tabla 14 se muestran los resultados comparativos de la citología de base líquida en relación a los resultados de colposcopia para identificar a mujeres con anomalías citológicas cervicales y que ameritan un diagnóstico histológico. De las 35 muestras de mujeres VPH positivo que constituyeron la cohorte del estudio, 11 de ellas fueron excluidas del análisis estadístico debido ya sea a una citología inadecuada para diagnóstico o una colposcopia pendiente. De un total de 24 muestras evaluadas, en el 50% (12) de mujeres con una colposcopia positiva se identificó alguna anomalía citológica; de igual manera se observa en un 50% (12) de mujeres con una colposcopia normal un resultado negativo por citología convencional.

Para calcular sensibilidad y especificidad relativa de la citología de base líquida en relación a la evaluación colposcópica, se empleó el programa estadístico XLSTAT (Tabla 15).

Tabla 15. Características de desempeño de citología base líquida versus resultados colposcópicos

Característica	Valor	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
Sensibilidad	0.667	0.296	0.904
Especificidad	0.556	0.337	0.754
Tasa de falsos positivos	0.444	0.237	0.652
Tasa de falsos negativos	0.333	0.041	0.626
VPP (Valor Predictivo Positivo)	0.333	0.067	0.600
VPN (Valor Predictivo Negativo)	0.833	0.622	1.000

La sensibilidad relativa de la citología líquida nos indica que la prueba fue positiva en el 67% del total de positivos para colposcopia; por su parte, la especificidad relativa de la citología de base líquida en comparación con una impresión colposcópica indica que la prueba fue negativa en el 56% del total de negativos identificados por colposcopia; este análisis nos permite estimar 33% de falsos negativos, y una tasa del 44% de falsos positivos diagnosticados por citología de base líquida.

4.6.2 Análisis ROC:

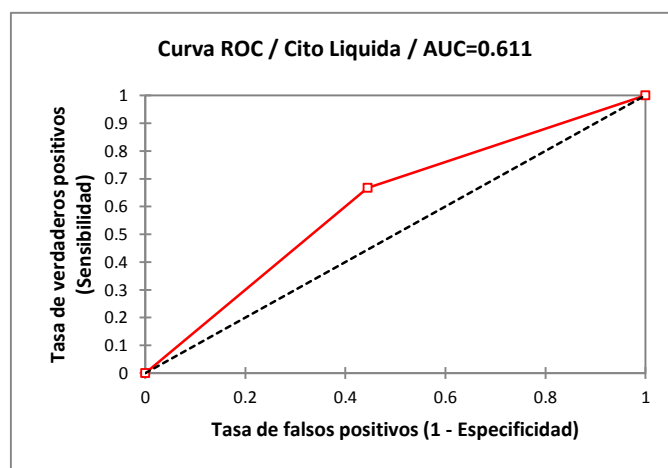


Figura 13. Curva ROC citología base líquida

Al analizar el resultado del área bajo la curva (0.611), representado gráficamente en la Figura 12, un dato cercano al punto medio de la gráfica sugiere una capacidad de discriminación limitada de la citología de base líquida en relación a la detección de lesiones sospechosas mediante colposcopia.

4.6.2 Concordancia Citología convencional-Citología de base líquida

La Tabla 16 resume las características de concordancia de la citología convencional y citología de base líquida para detectar lesiones cervicales en mujeres VPH positivas. Del análisis estadístico fueron excluidos 10 reportes citológicos debido a que no poseían un resultado diagnóstico al ser muestras inadecuadas.

Tabla 16. Datos comparativos entre citología convencional y citología de base líquida en mujeres VPH positivas

	Citología convencional		Total
	Positiva	Negativa	
Citología base líquida Positiva	0 (0%)	13 (52%)	13
Negativa	1 (4%)	11 (44%)	12
Total	1	24	25

Al utilizar el analizador en línea VassarStats para determinar el nivel de concordancia entre ambas citologías pudimos observar que no existe un nivel de concordancia entre ambas pruebas. Sugerimos que esta discrepancia radica en la subjetividad del observador al identificar y discriminar extendidos con hallazgo celulares anormales para ambas pruebas.

4.7 Oncoproteína E6

Se determinó la presencia de la oncoproteína E6 en muestras cervicales de mujeres con resultado VPH positivo, con la finalidad de ser evaluada como una estrategia de triaje de cáncer cervicouterino para aquellas mujeres con mayor posibilidad de progresión a lesiones más severas. En la Figura 13 se representa la proporción de mujeres VPH positivo por hC2 en las cuales se identificó la oncoproteína E6 de VPH 16/18.

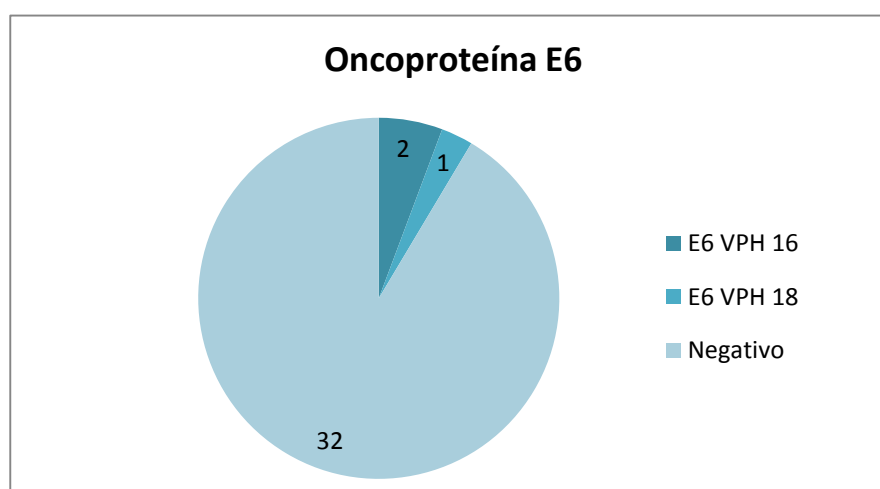


Figura 14. Detección de oncoproteína E6 en hisopados cervicales

Se analizaron 35 hisopados cervicales de mujeres VPH positivo identificados por hC2 para detectar la presencia de la oncoproteína E6; el 6% (2) de las muestras mostraron un resultado positivo para la oncoproteína E6 del genotipo 16, lo que concuerda con la genotipificación con la prueba LiPA. Por su parte la oncoproteína E6 del genotipo 18 fue detectada en una participante, la que representa el 3% de la cohorte. En cambio, en el 91% de las muestras (32) no se determinó la actividad de la oncoproteína E6 de ninguno de los genotipos identificables.

Al relacionar la presencia de la oncoproteína E6 en las muestras cervicales con los resultados de la evaluación colposcópica, observamos que el 67% de las mujeres positivas E6 mostraron una colposcopia positiva, y en un caso positivo para oncoproteína E6 no se demostró una lesión cervical aparente. Por su parte, en el 73.3% de las mujeres con un resultado para E6 negativo se obtuvo una colposcopia normal. Estos datos nos sugieren la importancia de la evaluación de las mujeres con una prueba de tamizaje primaria positiva por un método de triaje antes de una evaluación por metodologías invasivas.

4.8 Metilación de ADN

El grado de metilación de los promotores de los genes *MAL-M1*, *CADM1-M18* y *miR124-2* fueron determinadas mediante la prueba DIASSAY, un ensayo de PCR en Tiempo Real, cuyos resultados se muestran en la Tabla 17.

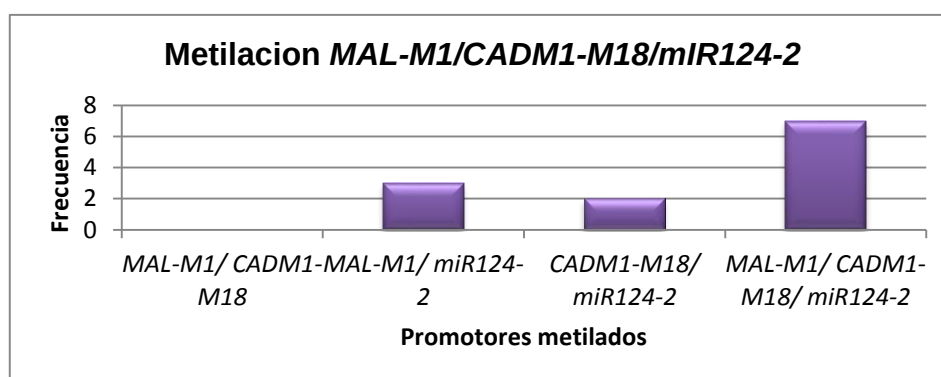
Tabla 17. Resultados de Metilación del ADN de los promotores de los genes *CADMA1*, *MAL* y *miR124-2*

	MAL-M1	CADM1-M18	miR124-4
Positivo	12 (34%)	9 (26%)	14 (40%)
Negativo	10 (29%)	13 (37%)	8 (22%)
Inadecuada	13 (37%)	13 (37%)	13 (37%)

Se analizaron un total de 22 muestras cervicales en las cuales se determinó el grado de metilación de los promotores antes mencionados; 13 muestras de mujeres VPH positivo fueron excluidas de las estadísticas debido a que en dichas

muestras no se cumplieron los estándares de calidad requeridos por la prueba. Un total de 12 muestras fueron positivas para metilación del gen *MAL-M1*, representando un 34% de las muestras evaluadas; por su parte, en el caso del promotor del gen *CADM1-M18*, 26% (9) de las muestras estudiadas reportaron un resultado positivo para metilación; y un total del 40% fueron positivas para metilación del promotor *miR124-2*.

Figura 15. Metilación *MAL-M1/CADM1-M18/miR124-2*



En un total de 7 muestras analizadas (32%) se determinó la presencia de los tres marcadores evaluados; la combinación de los promotores metilados *MAL-M1/miR124-2* se determinó en 3 muestras (14%); y la combinación *MAL-M1/CADM1-M18* no fue identificada en ninguna de las muestras analizadas.

En la Tabla 18 se muestra la positividad para uno o varios promotores metilados y la presencia de lesiones sospechosas de cáncer cervicouterino de acuerdo a los hallazgos colposcópicos reportados.

Tabla 18. Metilación de *MAL*, *CADM1* y *miR124-2* comparados con hallazgos colposcopicos

Metilación	Colposcopia		
	Grado 1	Grado 2	Normal
<i>MAL-M1</i>	7	1	5
<i>CADM1-M18</i>	4	1	3
<i>MiR124-2</i>	6	1	5
Negativo	0	0	6

El análisis de los datos nos muestran que de un total de 17 muestras con un resultado Grado 1 en colposcopia, 7 (41%) fueron positivos para *MAL-M1*, de este total 4 (24%) fueron positivas para *CADM1-M18* y en 6 (35%) muestras se detectó metilación del promotor *miR124-2*. En 3 muestras de mujeres con una colposcopia Grado 2 fue posible identificar por lo menos un promotor metilado. Por otro lado, en 19 participantes con una colposcopia normal, 5 de ellas (26%) reportaron metilación para el promotor *MAL-M1*, en 3 (16%) muestras se identificó metilación de *CADM1-M18*; y en 5 muestras (26%) fue detectado *miR124-2*. Finalmente, en un total de 6 muestras (32%) no se detectó la presencia de ningún promotor metilado.

CAPITULO 5

5. DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar diferentes estrategias de tamizaje y triaje de cáncer cervicouterino en mujeres entre los 30 y 64 años de edad, en la comunidad de Valle de Ángeles, Francisco Morazán. Planteamos que las estrategias evaluadas una vez analizadas podrían ser una buena opción en el futuro para ser incorporadas a un Programa Nacional de Tamizaje.

La citología cervicouterina busca como meta final la identificación de mujeres que requieren de una evaluación adicional con colposcopia para detectar lesiones precursoras de cáncer. Tras su introducción y uso extendido las muertes por cáncer cervicouterino se han reducido en 75% en los Estados Unidos y en otros países desarrollados, no así en países en vías de desarrollo (Schiffman, Wheeler, Castle, & Group, 2002).

En nuestro estudio en el 96% de las participantes se reportó un resultado de citología convencional negativa, incluyendo algunos casos de inflamación cervical debido a infecciones. Solamente en uno de los casos evaluados mediante la citología convencional fue posible identificar cambios celulares indicativos de neoplasia cervical, lo cual fue confirmado posteriormente por histología.

Los resultados de la presente investigación sugieren que la técnica de recolección es un punto crítico para el rendimiento de la prueba como estrategia de detección de cáncer cervicouterino, ya que la transferencia de las células es aleatorio y sujeto a error si las células anormales no se distribuyen de forma uniforme por el

portaobjetos (Marchand, Mundt, Klein, & Agarwal, 2005). Nuestros análisis arrojaron un 3.7% de citologías inadecuadas para diagnóstico, este es un aspecto importante a tomar en cuenta en los programas de tamizaje para cáncer cervicouterino; en concordancia con nuestras observaciones Weintraub & Morabia sugieren que las limitaciones de la técnica se deben a la presencia de muestras no valorables o poco significativas, estimando que hasta dos tercios de las limitaciones son producto de errores en la toma de la muestra cervical (Weintraub & Morabia, 2000). Por otro lado, la preparación del frotis es una técnica variable y poco controlada; se sugiere que las muestras citológicas deben ser fijadas rápidamente para evitar la desecación y la degeneración de las células extendiéndose de forma uniforme por todo el portaobjetos.

Uno de los principales problemas que se identificó en los extendidos evaluados fue la presencia de sangre que limitaba la capacidad diagnóstica de la prueba.

Por otro lado, Othman & Othman demuestran en su estudio que los instrumentos de recolección contiene una cantidad considerable de material posterior a realizar el frotis de citología convencional, las cuales pueden ser utilizadas en otras metodologías diagnósticas. En esta investigación se evaluaron las células que son retenidas en los dispositivos de recolección empleados para realizar la citología convencional. Para su evaluación, después de la preparación del frotis para citología convencional, los mismos cepillos fueron lavados en solución de PreservCyt para realizar posteriormente una monocapa de células (ThinPrep). Ambos extendidos fueron evaluados por médicos patólogos y sus diagnósticos fueron comparados, los resultados mostraron un buen acuerdo entre ambos

extendidos (Othman & Othman, 2012). Esta metodología fue aplicada en nuestra investigación para llevar a cabo la recolección de las muestras cervicales y coincidimos en que el material que se retiene en los cepillos cervicales posterior a realizar el extendido citológico es útil para evaluaciones posteriores.

Como una alternativa a la solución de los problemas que presenta la citología convencional, como ser la recolección de las células y la preparación de las láminas, se ha propuesto el empleo de la citología de base líquida. Una de las ventajas observadas en el presente trabajo fue la reducción de los falsos negativos ya que en la citología líquida fue posible la identificación de casos de LIEBG (17%), LIEAG (3%) y ASC-US (14%), los cuales no fueron identificados mediante citología convencional. Estos datos coinciden con los presentados por A.N Cheung y col. en un estudio comparativo entre la citología convencional y la citología líquida. Con la citología de base líquida los resultados insatisfactorios se redujeron de 0.48% (convencional) a un 0.32% (base líquida); los resultados satisfactorios pero limitados se redujeron del 19.1% (convencional) a 12.9% (base líquida) y la detección de ASC-US (3.7%), ASG-US (0.09%) y LIEBG (1.07%) aumentó (A. N. Cheung, Szeto, Leung, Khoo, & Ng, 2003).

Otro estudio que comparte estas observaciones es el de Simion et al, cuyo objetivo fue evaluar los resultados de citología convencional y citología líquida; los resultados fueron similares en 78 (75%) de los casos analizados, mientras que en 26 (25%) de los casos se presentaron errores inherentes a la citología convencional. La citología de base líquida fue capaz de detectar otras entidades que no fueron identificadas en la citología convencional, entre ellas ASC-US,

LIEAG y adenocarcinoma in situ y un mayor número de casos de LIEBG (Simion et al., 2014).

Raffle y colaboradores reportan como una ventaja adicional la reducción de muestras insatisfactorias (Raffle, Alden, Quinn, Babb, & Brett, 2003), esta observación difiere de los resultados obtenidos ya que no se logró demostrar que la citología líquida reduce el número de citologías inadecuadas para diagnóstico. Sin embargo, al evaluar el estudio de Alsharif et al., nuestros datos coinciden ya que detectan un porcentaje similar de muestras insatisfactorias (0.23%) tanto en citología convencional y citología líquida siendo la causa principal la baja celularidad de las muestras independiente del método empleado (Alsharif, McKeon, Gulbahce, Savik, & Pambuccian, 2009).

Al comparar y determinar el nivel de concordancia entre ambas pruebas, se determinó que no están acorde en el diagnóstico y por ello no presentan ningún tipo de concordancia; según nuestras conclusiones la causa de ésta discordancia radica en el hecho del elevado número de muestras oscurecidas por sangre reportadas en el estudio. Con relación a la sensibilidad y especificidad para la detección de lesiones de alto grado y cáncer de cuello uterino, en algunos estudios se encuentran diferencias entre ambas citologías para detectar lesiones de alto grado y cáncer de cuello uterino (Gibb & Martens, 2011; Nandini et al., 2012; Strander, Andersson-Ellström, Milsom, Rådberg, & Ryd, 2007). Contrario a estas observaciones, otras investigaciones no reportan tales diferencias, indicando solamente que los extendidos de citología líquida mejoran la evaluación celular de

la muestra y por ello son más sensibles para la detección de lesiones de alto grado y cáncer de cuello uterino (Arbyn et al., 2008; Davey et al., 2006).

Con base en nuestros hallazgos podemos inferir que ambas citologías están limitadas por los elevados falsos negativos y positivos, algunos factores que pueden influir en la obtención de falsos negativos, mencionaremos errores en la toma y procesamiento de la muestra o errores en la búsqueda e identificación de las células malignas y su interpretación. Entre las causas de los falsos positivos, una lesión de bajo grado presente al momento de tomar la muestra de citología, pero desaparece previamente a la toma de la biopsia; procesos inflamatorios, atrofia, toma de la biopsia, cirugías cervicales, entre otras.

Es un hecho definido que la prueba de VPH es una técnica mucho más sensible que la citología convencional para detectar mujeres con riesgo de desarrollar lesiones precursoras severas y cáncer cervicouterino, fue objeto de estudio la evaluación de estas técnicas para ser empleadas como estrategias únicas de tamizaje primario o bien conjuntamente con la citología convencional. En nuestro trabajo, el 12% de las mujeres evaluadas con la prueba de hC2 mostró un resultado positivo para genotipos de alto riesgo de VPH; la prueba de hC2 para referir a mujeres a una visita de colposcopia demostró una sensibilidad del 100%; es por ello que se propone a la prueba de VPH como estrategia de tamizaje primario y la citología como prueba de triaje para reducir esta sensibilidad y disminuir el número de visitas colposcópicas innecesarias.

Un estudio que aporta información en el tema es el llevado a cabo por Mayrand et al, en el cual se comparó una prueba de detección de ADN viral y la citología convencional como método de tamizaje para identificar neoplasias de alto grado en mujeres entre 30 y 69 años en Montreal y St. John, Canadá. Sus resultados muestran una sensibilidad de la prueba de VPH para detectar NIC II o más del 94.6% (95% IC: 84.4 - 100), mientras que la sensibilidad para la citología alcanzó el 54.5% (95% IC: 33.6 – 77.2); la especificidad fue del 94.1% (95% IC: 93.4 – 94.8) para la prueba de VPH y del 96.8% (95% IC: 96.3 – 97.3) para la citología convencional, datos que demuestran que en comparación con la citología convencional, la prueba de VPH tiene una mayor sensibilidad para la detección de NIC II o más (Mayrand et al., 2007).

En la investigación de Salaheddin y colaboradores se comparó el rendimiento del tamizaje con citología convencional y dos pruebas para detección de ADN viral (hC2 y una versión posterior que incluye 4 tipos adicionales hC2+4) para detección de cáncer cervicouterino. En el estudio se determinó un nivel de concordancia del 0.94 (95% IC: 0.91 – 0.96) entre ambas pruebas, con una sensibilidad combinada del 83% y una especificidad del 91% para detección de NIC II o más. La citología por su parte presentó una sensibilidad del 63% y 97% de especificidad para la detección de NIC I o más. Datos que muestran que las pruebas de VPH son más sensibles pero menos específicas que la citología convencional (Salaheddin et al., 2014). Sin embargo, las estrategias que maximicen la detección de mujeres con mayor riesgo de desarrollar lesiones de alto grado o mujeres con riesgo intermedio aumentan los beneficios mientras

disminuyen el daño potencial, así la incorporación de técnicas de VPH que identifiquen genotipos de alto riesgo oncogénico y la citología como estrategia de triaje para mujeres VPH positivas proporcionan un buen equilibrio entre la maximización de la sensibilidad (beneficio) y especificidad al limitar el número de colposcopias (daño potencial).

Al comparar la prevalencia de VPH encontrada en nuestro estudio (12%) con otra investigación llevada a cabo en el país, encontramos que difiere con los datos obtenidos por Tábor y colaboradores ya que dicha investigación tuvo como propósito estimar la prevalencia de VPH tipo específico entre las mujeres hondureñas sexualmente activas con citología normal entre 18-65 años de edad con el fin de tener una base poblacional de la distribución de los diferentes tipos de VPH, ya sea de alto o bajo riesgo. Se obtuvo una prevalencia global de VPH de 51% y se detectaron 23 diferentes tipos del virus, siendo los tipos más comunes el VPH16, 51, 31, 18 y 11 (Tábor et al., 2009). Es posible sugerir que la causa de la discrepancia residió en parte en la prueba utilizada, debido a que este estudio tuvo como método de detección de VPH la prueba de LiPA SPF10, la cual detecta genotipos tanto de alto y bajo riesgo, igualmente la población estudiada incluyó mujeres menores de 30 años, quienes presentan las prevalencias más altas de infección por VPH. Debido a las características de esta población, se enfatiza la importancia de realizar la prueba de VPH solamente a mujeres mayores de 30 años, como se sugiere en el estudio poblacional llevado a cabo en Guanacaste, Costa Rica, en donde la prevalencia de la infección fue del 25% en mujeres

menores de 25 años, descendiendo al 15% en mujeres entre 25 y 34 años, y al 10% en mujeres mayores de 35 años (Herrero et al., 2005).

Por otro lado, se ha demostrado que a partir de los 30 años o más las diferencias entre la prueba de VPH y la citología convencional son mínimas en cuanto a la especificidad (Ronco et al., 2010), muy de acuerdo con los resultados de nuestro estudio, ya que la especificidad de la prueba de hC2 para detectar mujeres sin lesiones precursoras fue de un 89%, con un total de 0 falsos negativos. Es decir, que todas las mujeres con un resultado negativo para VPH tuvieron un resultado negativo o normal en la citología convencional, por lo que podemos sugerir al igual que Kjaer et al., que el empleo en conjunto de la prueba de VPH y la citología en el tamizaje tiene su justificación en el elevado valor predictivo negativo para detectar a mujeres sanas.

El segundo método utilizado para la detección de ADN viral fue un PCR convencional con los cebadores GP+5/+6 y genotipificación mediante hibridación reversa en tira de nitrocelulosa, LiPA; la prueba ha sido validada para el uso de especímenes cervicales colectadas y transportadas en el mismo medio PreservCyt empleada con el método de hC2.

Al aplicar esta metodología para la detección del ADN viral se obtuvo una prevalencia de un 11.6% de las muestras analizadas; sin embargo se presentaron un elevado número de muestras poco satisfactorias para evaluación por LiPA (85 muestras) debido a que no fue posible amplificar el gen de β -Globina, indicativo de una muestra inadecuada. Podríamos mencionar que la presencia de muestras

sanguinolentas y con poco contenido celular hizo dificultosa la extracción de una cantidad adecuada de ADN para amplificación. Sin embargo y a pesar de esta limitación encontramos que en términos generales el método de genotipificación de VPH mediante hibridación reversa representa una alternativa útil para diagnóstico, principalmente en estudios epidemiológicos que buscan determinar los genotipos circulantes de manera individual.

En nuestro estudio se identificó el tipo 16 de VPH en el 28.6% (6 muestras), siendo el genotipo con mayor prevalencia; el tipo 45 fue el segundo en mayor prevalencia (19%); los restantes genotipos de alto riesgo encontrados incluyen los tipos 18, 48, 31 y 66. Se ha discutido la importancia de la genotipificación en mujeres con citología normal, sin embargo en ciertas investigaciones, ha sido demostrado que el VPH tipo 16 está vinculado a un 22-26% de riesgo de sufrir NIC II o más, el tipo 18 a un 17-19%, el VPH 31 a un 14.3% y el VPH 33 a un 14.9% (Ciapponi, Bardach, Glujovsky, Gibbons, & Picconi, 2011; Khan et al., 2005). De igual manera, otro estudio demuestra que el resto de tipos de VPH de alto riesgo se asocian a un 3% de riesgo de desarrollo de patología cervical; en estos casos se recomendaría repetir la prueba junto con una citología en los próximos 12 meses (Khan et al., 2005). Cabe mencionar, que la genotipificación de VPH es útil para evaluar y monitorear el efecto de la vacunación en la prevalencia de la infección, como lo sugiere el estudio realizado por Castle et al., en Costa Rica. Ésta investigación aporta información sobre la utilidad de la prueba de hibridación reversa para identificar infecciones por VPH de alto riesgo, de manera especial los tipos 16 y 18 para los cuales va dirigida la vacunación; concluyendo que las

pruebas de hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa son adecuadas para el control del impacto de la vacunación en ensayos clínicos (Castle et al., 2008).

Los genotipos de bajo riesgo identificados en nuestra población, incluyen los tipos 30, 67 y 70. Algunos autores recomiendan no emplear pruebas que detecten VPH de bajo riesgo, ya que éstos no incrementan el riesgo de cáncer de cérvix pero si aumentan el gasto de cribado innecesario (Stoler, Castle, Solomon, Schiffman, & Pathology, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que ciertos tipos de VPH de bajo riesgo se encuentran asociados al desarrollo de algunos cánceres cervicales, como lo reportado por de Sanjose y colaboradores que identifica al genotipo 70 de VPH en canceres cervicales (de Sanjose et al., 2010).

Se debate la importancia y el riesgo que representa la detección de varios tipos de VPH respecto a la detección de un solo tipo viral. En este estudio el número máximo de tipos virales detectados en una muestra cervical fue de 2 tipos, irrespectivamente de una citología positiva y/o lesiones precursoras sospechosas. En otros estudios de igual manera no se demuestra un incremento o un menor riesgo de progresar a una enfermedad de alto grado si se detectan varios tipos de VPH de alto riesgo (Bosch et al., 2002; Cuschieri et al., 2004). En contraposición a ello, otros autores encuentran una importante relación, principalmente cuando la coinfección incluye al genotipo 16 (Matsumoto et al., 2011; Trottier et al., 2006); en la presente investigación las coinfecciones involucraron al genotipo 16 en el 50% de los casos. Se postula que el mecanismo por el cual se produce un incremento en el riesgo al presentar una lesión por múltiples tipos virales se postula podría ser la susceptibilidad del huésped, lo que se traduce en el aumento de la persistencia

de la infección (Trottier et al., 2008) o a un fallo en el sistema inmune (Hessol et al., 2013).

En estudios como el realizado por Perrons y colaboradores se establece la utilidad de las técnicas para detectar infecciones por VPH de alto riesgo y por múltiples tipos virales (Perrons, Jelley, Kleter, Quint, & Brink, 2005). Solamente al utilizar LiPA o Linear Array para el genotipificado se garantizan la mayor eficacia en la detección de múltiples tipos virales (van Hamont, van Ham, Bakkers, Massuger, & Melchers, 2006).

Cuando se comparan los dos métodos para detección de ADN viral evaluados en este trabajo, el nivel de concordancia mostrado por ambas pruebas fue bueno, reportándose un valor de 0.67 (95% IC: 0.53-0.82), muy similares a los resultados reportados por Schiffman y colaboradores quienes evaluaron el ensayo de hC2 y un ensayo de PCR para un grupo de muestras cervicales de mujeres con resultados ASC-US/LIEBG; el índice kappa para ambos ensayos fue de 0.65, con un 82.7% de resultados positivos. En esta investigación la prueba de hC2 fue más sensible pero menos específica que el PCR para detección de LIEAG o cáncer. La presencia de múltiples tipos virales detectados por PCR o anormalidad citológica aumentó la probabilidad de un resultado por hC2 positiva (Schiffman et al., 2005).

Por otra parte, y en discrepancia con nuestra investigación, el estudio realizado por Safaeian y colaboradores reporta un nivel de concordancia mayor entre ambas pruebas. El nivel de concordancia entre los dos ensayos fue del 88%, con un valor

kappa de 0.75 (95% IC: 0.73-0.76), observando un muy buen nivel de concordancia entre hC2 y SPF-10 LiPA para la detección de VPH carcinogénicos; sugerimos como posible causa el elevado número de muestras inadecuadas y por ende la necesidad de exclusión de los análisis estadísticos en nuestra investigación (Safaeian et al., 2007).

Algunas desventajas de los métodos para detección de VPH evaluados podemos mencionar, que debido a su elevada sensibilidad se hace necesario establecer programas bien estructurados para no sobre-tratar a las mujeres con resultados positivos para VPH. Podríamos mencionar también la necesidad de un laboratorio con una infraestructura adecuada para la implementación de las técnicas descritas y contar con personal capacitado para la ejecución de las mismas; al igual que el costo monetario para la adquisición de los reactivos y materiales necesarios.

La actividad de las oncoproteínas E6 de VPH es esencial para que se lleve a cabo la transformación de las células del cuello uterino.

En un estudio clínico realizado por Arbor Vita Corporation, PATH y la Academia de Ciencias de China, cuyo objetivo fue determinar la factibilidad de la aplicación de la prueba de OncoE6 en el diagnóstico de lesiones precursoras y cáncer, se informan una buena correlación entre la positividad de la oncoproteína E6 y la gravedad de lesiones histopatológicas, la cual incrementa el riesgo de progresión a lesiones de alto grado y cáncer cervical. Estos investigadores detectaron una prueba positiva entre un 14 y 18% de mujeres con un resultado positivo de VPH de alto riesgo y en un 7.3% de mujeres con un IVA positivo. Así mismo, la

sensibilidad para la detección de LIEAG o más fue del 53.5% reportando un VPP del 40.8% para LIEAG (Care HPV, hC2 e IVA), considerando la detección de la oncoproteína E6 un biomarcador prometedor para determinar la actividad oncogénica mediada por la expresión de los oncogenes virales a partir de muestras cervicales (Zhao et al., 2013).

El estudio pretendió evaluar la factibilidad de la detección de la oncoproteína E6 y la detección de ADN de VPH 16/18 a partir de muestras cervicales; para ello se empleó una prueba inmunocromatográfica de flujo lateral para la detección de E6 de VPH 16 y 18. En las muestras cervicales de mujeres VPH positivo analizadas fue posible identificar la oncoproteína E6 del tipo 16 en el 6% de los mismos, y en el 3% la oncoproteína del tipo 18. Al relacionar estos datos junto a los resultados de colposcopia encontramos que una de las muestras positivas para E6/HPV 16 correspondía a una participante diagnosticada histológicamente con cáncer invasor. A su vez, una de las muestras positivas para E6/HPV 18 reportó una impresión colposcópica de grado 1, indicando riesgo de progresión a lesiones más severas; por su parte y fuera de lo esperado, se determinó la presencia de E6/HPV 16 en una participante sin una lesión precursora aparente, se recomienda un seguimiento controlado y específico para dicho caso.

Por su parte, la investigación de Scheweizer et al., analizó un primer grupo de 16 mujeres con un resultado negativo por histología (Unidad de Planificación Familiar, San José, Costa Rica); un segundo grupo formado por 55 especímenes, que incluyeron casos de LIEBG, LIEAG y cáncer invasor, obtenidos de un ensayo clínico llevado a cabo en la India; y un tercer grupo que consistió en 89 muestras

acumulados por el programa de Tecnología Apropriada en Salud (PATH) como parte de los estudios en curso de la prueba de VPH en China y la India. En el estudio se detectó la presencia de la oncoproteína E6 de VPH 16/18 en 51 (68%) de las 75 muestras analizadas de mujeres con un diagnóstico de LIEAG, al contrario la oncoproteína no fue detectada en ninguno de las muestras de mujeres con un diagnóstico negativo o una LIEB, concluyendo en la utilidad que presenta la detección de la oncoproteína E6 para detectar y determinar el riesgo de progresión a cáncer (Schweizer et al., 2010).

El silenciamiento de genes supresores de tumores mediante mecanismos epigenéticos por metilación de ADN en casos de cáncer cervicouterino ha demostrado ser un biomarcador potencial para el diagnóstico de enfermedad cervical. (Hesselink et al., 2011; Wilting et al., 2009). Se ha establecido que la metilación de islas CpG en regiones promotoras de los genes *CADM1* y *MAL*, así como el microARN *miR 124-2*, juega un papel importante para la carcinogénesis cervical (Wilting et al., 2013).

El estudio evaluó la relevancia clínica del análisis de PCR multiplex para la detección de metilación de regiones promotoras de los genes *CADM1*, *MAL* y *miR 124-2* a partir de muestras cervicales; se detectó la metilación de por lo menos un promotor en 16 de 22 muestras analizadas, lo que indica una positividad del 73%. Se observó que las participantes con metilación de los tres promotores analizados presentaron al menos una colposcopia positiva para lesiones sospechosas precursoras de cáncer, incluso el ensayo fue capaz de discriminar un caso de neoplasia cervical, lo cual sugiere que el análisis de metilación de *CADM1*, *MAL* y

miR 124-2 podría ser útil en el tamizaje cervical, ya que identifica a la mayoría de mujeres con lesiones precursoras y que requieren tratamiento.

Overmeer y colaboradores indican de la prueba de metilación de ADN en un 100% de los casos de cáncer cervical investigados (Overmeer et al., 2011). De igual manera, Bierkens et al., demuestran que el número de marcadores positivos, independientemente del grado de metilación, aumenta con la severidad de la enfermedad (Bierkens et al., 2013). Estas consideraciones dan soporte al afirmación que las mujeres con lesiones cervicales y con resultados positivos para el ensayo de metilación presentan mayor riesgo de desarrollo de lesiones neoplásicas severas y cáncer.

Algunas investigaciones demuestran que las mayores tasas de sensibilidad para detectar LIEAG o más se obtiene mediante la combinación de marcadores metilados (Hesselink et al., 2011; Rijkaart et al., 2012). Basados en nuestros datos, *MAL* y *miR 124-2* son los marcadores predominantes en los casos evaluados; a su vez, fueron los que presentaron una mayor relación con resultados de colposcopia positiva. Por su parte, el marcador *CADM1* fue identificado siempre en combinación con *MAL* o *miR 124-2*, pero en ninguna muestra de manera individual.

Vivimos en una época extraordinaria, en la que la necesidad humana de generar conocimientos, aplicar soluciones creativas y dar continuidad a compromisos sinceros ha dado lugar a una oportunidad única de eliminar prácticamente una de las principales causas de sufrimiento y pérdida para familias y comunidades de

todo el mundo. Como se destaca en esta investigación, nuestros resultados aportan conocimientos de diferentes tecnologías para el tamizaje y triaje de mujeres en riesgo de desarrollar lesiones precancerosas y cáncer, las cuales podrían ser consideradas en un futuro como pruebas alternas en el Sistema de Salud Nacional cuando se obtenga mayor información lograda a través de estudios más extensos y con mayor peso estadístico.

CAPITULO 6

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con la experiencia durante la ejecución de la investigación y los resultados obtenidos, podemos concluir:

1. Las técnicas para de hC2 para detección de ADN de VPH evaluadas en el estudio, demuestran ser un procedimiento adecuado y factible para determinar la presencia de genotipos de alto riesgo oncogénico en las muestras cervicales examinadas y por ende contribuir oportunamente al diagnóstico de lesiones severas y precursoras de cáncer cervical, así mismo la prueba de LiPA podría ser empleada principalmente en estudio epidemiológicos que busque determinar la prevalencia de los genotipos circulantes en la población.
2. El ensayo de hC2 en relación a la prueba de LiPA demostró de manera relativa mayor sensibilidad para referir mujeres a una evaluación colposcópica; sin embargo, la prueba de LiPA presentó una mayor especificidad para detectar a mujeres que no requerían otras evaluaciones, por tal razón concluimos que ambas pruebas cuentan con características propias e interesantes que las hacen útiles de ejecutar en diversos escenarios.
3. Opinamos que los estrategias de tamizaje primario evaluadas refieren a un gran número de mujeres a visitas de seguimiento innecesarias, y por ello se

hace necesario el empleo de otras técnicas (pruebas de triaje) que discriminen específicamente a aquellas mujeres con una infección por VPH con mayor riesgo de desarrollar lesiones severas y cáncer cervicouterino, evitando de esta manera la sobrecarga de los sistemas de salud y más importante aún la estabilidad emocional de las mujeres.

4. Las técnicas de examen citológico evaluadas en el estudio mostraron ser ensayos altamente específicos pero poco sensibles para discriminar a mujeres con lesiones precursoras aparentes, siendo extremadamente influenciadas por la calidad de la toma de la muestra, la preparación del extendido y la interpretación del mismo.
5. La expresión de los oncogenes virales es uno de los factores claves para la evolución de lesiones severas a cáncer cervical, y la detección de la oncoproteína E6 en hisopados cervicales puede ser empleado convenientemente como método de triaje para evaluar a mujeres con un resultado VPH positivo.
6. El análisis de PCR Multiplex para metilación de promotores CADM1, MAL y miR124-2 en muestras cervicales empleado para detección de riesgo de progresión a cáncer en mujeres VPH positivo, demostró ser un biomarcador prometedor para ser aplicable como método de triaje en los programas de prevención y permitir abrir paso a una nueva generación de técnicas de tamizaje molecular.

En resumen, los resultados provistos por el estudio al evaluar diferentes estrategias de tamizaje primario y triaje de cáncer cervicouterino aportan ideas para la identificación de mujeres en riesgo y sugieren que estos ensayos podrían ser factibles y aplicables a un sistema Nacional de Salud que busque establecer medidas de control y prevención adecuadas a su población.

CAPITULO 7

7. RECOMENDACIONES, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

- Una de las principales limitaciones con la que nos encontramos durante la ejecución de la investigación fue la poca anuencia de las mujeres de mayor edad a realizarse la citología cervical y las pruebas que se evaluaron en el estudio. Quizás y en su mayor parte debido a factores culturales y sociales que influyeron en esta población.
- Las limitaciones intrínsecas de las pruebas citológicas evaluadas se presentaron durante el desarrollo del estudio, como ser la toma de la muestra cervical, el extendido, la fijación de las muestras y la interpretación del frotis. Sin embargo, es importante mencionar que una adecuada recolección de muestras cervicales es un punto clave no solo en las técnicas citológicas, sino también en las pruebas moleculares, ya que la presencia o ausencia de material celular afecta tanto la ejecución como la interpretación de las pruebas.
- Recomendamos la oportuna capacitación de los servidores de atención primaria en salud en cuanto a la recolección adecuada de las muestras cervicales y la relevancia de este punto en los sistemas de tamizaje para cáncer cervicouterino.
- De la misma manera recomendamos la necesidad de concientizar a la población femenina del país la importancia de realizar el tamizaje para

cáncer cervicouterino de manera oportuna y a conciencia, ya que en nuestro entorno la mujer es una pieza fundamental en la sostenibilidad familiar y el avance productivo del país.

- Recomendamos que las estrategias evaluadas en el estudio sean tomadas en cuenta por parte de nuestras autoridades en Salud para ser incorporadas en un futuro al Sistema Nacional de Salud, y reducir de esta manera la incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino en la población femenina del país.
- Recomendamos el desarrollo de nuevos estudios de investigación de mayor proporción y alcance relacionados con el tema, de manera que en futuro estas estrategias de tamizaje y triaje de cáncer cervicouterino puedan ser aplicadas como métodos de prevención y control en el país.

CAPITULO 8

8. REFERENCIAS

- Abreu, A. L. P., Souza, R. P., Gimenes, F., & Consolaro, M. E. L. (2012). A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal*, 9(1), 262-270. doi: 10.1186/1743-422X-9-262
- Almonte, M., Murillo, R., Sánchez, G. I., Jerónimo, J., Salmerón, J., Ferreccio, C., . . . Herrero, R. (2010). [New paradigms and challenges in cervical cancer prevention and control in Latin America]. *Salud Publica Mex*, 52(6), 544-559.
- Alsharif, M., McKeon, D. M., Gulbahce, H. E., Savik, K., & Pambuccian, S. E. (2009). Unsatisfactory SurePath liquid-based Papanicolaou tests: causes and significance. *Cancer*, 117(1), 15-26. doi: 10.1002/cncy.20009
- Ancuța, E., Ancuța, C., Cozma, L. G., Iordache, C., Anghelache-Lupașcu, I., Anton, E., . . . Chirieac, R. (2009). Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferation factor and E-cadherin expression. *Rom J Morphol Embryol*, 50(3), 413-418.
- Arbyn, M., Bergeron, C., Klinkhamer, P., Martin-Hirsch, P., Siebers, A. G., & Bulten, J. (2008). Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 111(1), 167-177. doi: 10.1097/01.AOG.0000296488.85807.b3
- Armstrong, E. P. (2010). Prophylaxis of cervical cancer and related cervical disease: a review of the cost-effectiveness of vaccination against oncogenic HPV types. *J Manag Care Pharm*, 16(3), 217-230.
- Asiaf, A., Ahmad, S. T., Mohammad, S. O., & Zargar, M. A. (2013). Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *Eur J Cancer Prev*. doi: 10.1097/CEJ.0b013e328364f273
- Atkins, K. A., Jeronimo, J., Stoler, M. H., & Group, A. (2006). Description of patients with squamous cell carcinoma in the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *Cancer*, 108(4), 212-221. doi: 10.1002/cncr.21940
- Bachtiary, B., Obermair, A., Dreier, B., Birner, P., Breitenecker, G., Knocke, T. H., . . . Pötter, R. (2002). Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer*, 102(3), 237-243. doi: 10.1002/ijc.10708

- Baseman, J. G., & Koutsky, L. A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*, 32 Suppl 1, S16-24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008
- Bhatla, N., Puri, K., Kriplani, A., Iyer, V. K., Mathur, S. R., Mani, K., & Pandey, R. M. (2012). Adjunctive testing for cervical cancer screening in low resource settings. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 52(2), 133-139. doi: 10.1111/j.1479-828X.2011.01402.x
- Bierkens, M., Hesselink, A. T., Meijer, C. J., Heideman, D. A., Wisman, G. B., van der Zee, A. G., . . . Steenbergen, R. D. (2013). CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *Int J Cancer*, 133(6), 1293-1299. doi: 10.1002/ijc.28138
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C. J., & Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55(4), 244-265.
- Boulet, G. A., Horvath, C. A., Berghmans, S., & Bogers, J. (2008). Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(4), 810-817. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2865
- Brown, C. A., Bogers, J., Sahebali, S., Depuydt, C. E., De Prins, F., & Malinowski, D. P. (2012). Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. *J Oncol*, 2012, 289315. doi: 10.1155/2012/289315
- Castellsagué, X., Bosch, F. X., & Muñoz, N. (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*, 89(2), 191-199.
- Castle, P. E., Porras, C., Quint, W. G., Rodriguez, A. C., Schiffman, M., Gravitt, P. E., . . . Group, C. (2008). Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J Clin Microbiol*, 46(10), 3437-3445. doi: 10.1128/JCM.00620-08
- Chen, Y., Williams, V., Filippova, M., Filippov, V., & Duerksen-Hughes, P. (2014). Viral carcinogenesis: factors inducing DNA damage and virus integration. *Cancers (Basel)*, 6(4), 2155-2186. doi: 10.3390/cancers6042155
- Cheung, A. N., Szeto, E. F., Leung, B. S., Khoo, U. S., & Ng, A. W. (2003). Liquid-based cytology and conventional cervical smears: a comparison study in an Asian screening population. *Cancer*, 99(6), 331-335. doi: 10.1002/cncr.11786
- Cheung, J. L., Cheung, T. H., Yu, M. Y., & Chan, P. K. (2013). Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. *Gynecol Oncol*, 131(2), 374-379. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.08.026
- Ciapponi, A., Bardach, A., Glujovsky, D., Gibbons, L., & Picconi, M. A. (2011). Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in

- Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 6(10), e25493. doi: 10.1371/journal.pone.0025493
- Clarke, M. A., Wentzensen, N., Mirabello, L., Ghosh, A., Wacholder, S., Harari, A., . . . Burk, R. D. (2012). Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21(12), 2125-2137. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0905
- Cox, J. T. (2004). Liquid-based cytology: evaluation of effectiveness, cost-effectiveness, and application to present practice. *J Natl Compr Canc Netw*, 2(6), 597-611.
- Cox, J. T., & Pathology, A. S. f. C. a. C. (2003). The clinician's view: role of human papillomavirus testing in the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology Guidelines for the management of abnormal cervical cytology and cervical cancer precursors. *Arch Pathol Lab Med*, 127(8), 950-958. doi: 10.1043/1543-2165(2003)1272.0.CO;2
- Cuschieri, K. S., Cubie, H. A., Whitley, M. W., Seagar, A. L., Arends, M. J., Moore, C., . . . McGoogan, E. (2004). Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*, 57(1), 68-72.
- Davey, E., Barratt, A., Irwig, L., Chan, S. F., Macaskill, P., Mannes, P., & Saville, A. M. (2006). Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet*, 367(9505), 122-132. doi: 10.1016/S0140-6736(06)67961-0
- Davies, P., Kornegay, J., & Iftner, T. (2001). Current methods of testing for human papillomavirus. *Res Clin Obstet*, 15(5), 677-700.
- De la Cruz, E., Mohar, A., & Lizano, M. (2004). Elementos viricos y celulares que intervienen en el proceso de replicacion. *Rev Oncol*, 6, 263 - 271.
- de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., . . . Group, R. I. S. a. H. T. T. S. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, 11(11), 1048-1056. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70230-8
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033
- Dim, C. C. (2012). Towards improving cervical cancer screening in Nigeria: a review of the basics of cervical neoplasm and cytology. *Niger J Clin Pract*, 15(3), 247-252. doi: 10.4103/1119-3077.100615
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110(5), 525-541. doi: 10.1042/CS20050369

- Doorbar, J. (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers*, 23(4), 297-313.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. (2012). Cancer incidence and mortality worldwide. GLOBOCAN Retrieved 05/01/2015 globocan.iarc.fr
- Ferrera, A., Velema, J. P., Figueroa, M., Bulnes, R., Toro, L. A., Claros, J. M., . . . Melchers, W. J. (1999). Human papillomavirus infection, cervical dysplasia and invasive cervical cancer in Honduras: a case-control study. *Int J Cancer*, 82(6), 799-803.
- Ferrera, A., Velema, J. P., Figueroa, M., Bulnes, R., Toro, L. A., Claros, J. M., . . . Melchers, W. J. (2000). Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol*, 29(5), 817-825.
- Gaffikin, L., McGrath, J. A., Arbyn, M., & Blumenthal, P. D. (2007). Visual inspection with acetic acid as a cervical cancer test: accuracy validated using latent class analysis. *BMC Med Res Methodol*, 7, 36. doi: 10.1186/1471-2288-7-36
- Gajalakshmi, V., Whitlock, G., & Peto, R. (2012). Social inequalities, tobacco chewing, and cancer mortality in south India: a case-control analysis of 2,580 cancer deaths among non-smoking non-drinkers. *Cancer Causes Control*, 23 Suppl 1, 91-98. doi: 10.1007/s10552-012-9905-1
- Ganguly, N., & Parihar, S. P. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci*, 34(1), 113-123.
- Genovés, J., Alameda, F., Mancebo, G., Solé, J. M., Bellosillo, B., Lloveras, B., . . . Carreras, R. (2014). Human papillomavirus detection and p16INK4a expression in cervical lesions: a comparative study. *Hum Pathol*, 45(4), 826-833. doi: 10.1016/j.humpath.2013.10.035
- Gibb, R. K., & Martens, M. G. (2011). The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer. *Rev Obstet Gynecol*, 4(Suppl 1), S2-S11.
- Granados López, A. J., & López, J. A. (2014). Multistep model of cervical cancer: participation of miRNAs and coding genes. *Int J Mol Sci*, 15(9), 15700-15733. doi: 10.3390/ijms150915700
- Greer, J. M., & McCombe, P. A. (2012). The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biologics*, 6, 307-327. doi: 10.2147/BTT.S24067
- Hanisch, R. A., Sow, P. S., Toure, M., Dem, A., Dembele, B., Toure, P., . . . Group, U. o. W.-D. H. a. C. C. S. (2013). Influence of HIV-1 and/or HIV-2 infection

- and CD4 count on cervical HPV DNA detection in women from Senegal, West Africa. *J Clin Virol*, 58(4), 696-702. doi: 10.1016/j.jcv.2013.10.012
- Henle, W., & Henle, G. (1973). Evidence for an oncogenic potential of the Epstein-Barr virus. *Cancer Res*, 33(6), 1419-1423.
- Herrero, R., Castle, P. E., Schiffman, M., Bratti, M. C., Hildesheim, A., Morales, J., . . . Burk, R. D. (2005). Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*, 191(11), 1796-1807. doi: 10.1086/428850
- Hesselink, A. T., Heideman, D. A., Steenbergen, R. D., Coupé, V. M., Overmeer, R. M., Rijkaart, D., . . . Snijders, P. J. (2011). Combined promoter methylation analysis of CADM1 and MAL: an objective triage tool for high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *Clin Cancer Res*, 17(8), 2459-2465. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2548
- Hessol, N. A., Holly, E. A., Efird, J. T., Minkoff, H., Weber, K. M., Darragh, T. M., . . . Palefsky, J. M. (2013). Concomitant anal and cervical human papillomavirusV infections and intraepithelial neoplasia in HIV-infected and uninfected women. *AIDS*, 27(11), 1743-1751. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283601b09
- IARC. (2005). *IARC Handbooks of Cancer Prevention* (Vol. 10). Lyon, France.
- IARC. (2012). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human (Vol. 100B, pp. 255-313).
- Ito, Y. (1970). Induction of papillomas in rabbits with nucleic acid extracts from Vx7 carcinomas. *Br J Cancer*, 24(3), 535-541.
- Jiang, P., & Yue, Y. (2014). Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). *Exp Ther Med*, 7(1), 3-7. doi: 10.3892/etm.2013.1374
- Johannsen, E., & Lambert, P. F. (2013). Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology*, 445(1-2), 205-212. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.016
- Keating, J. T., Ince, T., & Crum, C. P. (2001). Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol*, 8(2), 83-92.
- Khan, M. J., Castle, P. E., Lorincz, A. T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D. R., . . . Schiffman, M. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*, 97(14), 1072-1079. doi: 10.1093/jnci/dji187
- Ki-moon, B. (2010). Estrategia Mundial de Salud de las Mujeres y los Niños. New York: Naciones Unidas.
- kjellberg, L., Hallmasn, F., Ahren, A., Johansson, R., Bergman, F., Wadell, G., . . . Dillner, J. (2000). Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Brit J Can*, 82(7), 1332-1338.

- Klaes, R., Benner, A., Friedrich, T., Ridder, R., Herrington, S., Jenkins, D., . . . von Knebel Doeberitz, M. (2002). p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 26(11), 1389-1399.
- Kruse, A. J., Baak, J. P., Helliesen, T., Kjelleevold, K. H., Bol, M. G., & Janssen, E. A. (2002). Evaluation of MIB-1-positive cell clusters as a diagnostic marker for cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 26(11), 1501-1507.
- Kyrgiou, M., Koliopoulos, G., Martin-Hirsch, P., Arbyn, M., Prendiville, W., & Paraskevaides, E. (2006). Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 367(9509), 489-498. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68181-6
- Lai, H. C., Lin, Y. W., Huang, T. H., Yan, P., Huang, R. L., Wang, H. C., . . . Yu, M. H. (2008). Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *Int J Cancer*, 123(1), 161-167. doi: 10.1002/ijc.23519
- Leinonen, M., Nieminen, P., Kotaniemi-Talonen, L., Malila, N., Tarkkanen, J., Laurila, P., & Anttila, A. (2009). Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting. *J Natl Cancer Inst*, 101(23), 1612-1623. doi: 10.1093/jnci/djp367
- Liu, T. Y., Xie, R., Luo, L., Reilly, K. H., He, C., Lin, Y. Z., . . . Wang, H. B. (2014). Diagnostic validity of human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples. *J Virol Methods*, 196, 120-125. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.10.032
- Longworth, M. S., & Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2), 362-372. doi: 10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004
- Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W., & Kurman, R. J. (1992). Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol*, 79(3), 328-337.
- Lynge, E., Rygaard, C., Baillet, M. V., Dugué, P. A., Sander, B. B., Bonde, J., & Rebolj, M. (2014). Cervical cancer screening at crossroads. *APMIS*, 122(8), 667-673. doi: 10.1111/apm.12279
- Marchand, L., Mundt, M., Klein, G., & Agarwal, S. C. (2005). Optimal collection technique and devices for a quality pap smear. *WMJ*, 104(6), 51-55.
- Martínez, M. L., & Guevel, C. G. (2013). [Social inequalities in cervical cancer mortality in the Autonomous City of Buenos Aires, 1999-2003 and 2004-2006]. *Salud Colect*, 9(2), 169-182. doi: 10.1590/S1851-82652013000200004
- Matsumoto, K., Oki, A., Furuta, R., Maeda, H., Yasugi, T., Takatsuka, N., . . . Group, J. H. A. C. C. S. (2011). Predicting the progression of cervical

- precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *Int J Cancer*, 128(12), 2898-2910. doi: 10.1002/ijc.25630
- Mayrand, M. H., Duarte-Franco, E., Rodrigues, I., Walter, S. D., Hanley, J., Ferenczy, A., . . . Group, C. C. C. S. T. S. (2007). Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*, 357(16), 1579-1588. doi: 10.1056/NEJMoa071430
- Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K., Nakahara, T., . . . Doorbar, J. (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*, 77(19), 10186-10201.
- Montovani, F., & Banks, L. (2009). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant carcinogenesis. *J Med Res*, 13, 286 - 295.
- Munger, K., Baldwin, A., & Edwards, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 78, 11451-11460.
- Munger, K., Basile, J., & Duensing, S. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogen*, 20, 7888-7898.
- Munger, K., & Howley, P. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 89, 213-228.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., . . . Group, I. A. f. R. o. C. M. C. C. S. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348(6), 518-527. doi: 10.1056/NEJMoa021641
- Nandini, N. M., Nandish, S. M., Pallavi, P., Akshatha, S. K., Chandrashekhar, A. P., Anjali, S., & Dhar, M. (2012). Manual liquid based cytology in primary screening for cervical cancer--a cost effective proposition for scarce resource settings. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(8), 3645-3651.
- Naucler, P., Ryd, W., Törnberg, S., Strand, A., Wadell, G., Elfgrén, K., . . . Dillner, J. (2007). Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med*, 357(16), 1589-1597. doi: 10.1056/NEJMoa073204
- Nayereh, K. G., & Khadem, G. (2012). Preventive and Therapeutic Vaccines against Human Papillomaviruses Associated Cervical Cancers. *Iran J Basic Med Sci*, 15(1), 585-601.
- OPS. (2009). Estrategia y plan de acción regional para la prevención y el control del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe (pp. 24).
- Othman, N., & Othman, N. H. (2012). Adequacy of cellular material in split-sampling of cervical scrapings for routine cancer screening: an analysis of 702 smears. *Malays J Pathol*, 34(2), 115-121.
- Ouaguia, L., Mrizak, D., Renaud, S., Moralès, O., & Delhem, N. (2014). Control of the Inflammatory Response Mechanisms Mediated by Natural and Induced

- Regulatory T-Cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-Associated Cancers. *Mediators Inflamm*, 2014, 564296. doi: 10.1155/2014/564296
- Overmeer, R. M., Louwers, J. A., Meijer, C. J., van Kemenade, F. J., Hesselink, A. T., Daalmeijer, N. F., . . . Steenbergen, R. D. (2011). Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-)malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women. *Int J Cancer*, 129(9), 2218-2225. doi: 10.1002/ijc.25890
- Parikh, S., Brennan, P., & Boffetta, P. (2003). Meta-analysis of social inequality and the risk of cervical cancer. *Int J Cancer*, 105(5), 687-691. doi: 10.1002/ijc.11141
- Pereira, P. M., Marques, J. P., Soares, A. R., Carreto, L., & Santos, M. A. (2010). MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One*, 5(7), e11780. doi: 10.1371/journal.pone.0011780
- Perrons, C., Jelley, R., Kleter, B., Quint, W., & Brink, N. (2005). Detection of persistent high risk human papillomavirus infections with hybrid capture II and SPF10/LiPA. *J Clin Virol*, 32(4), 278-285. doi: 10.1016/j.jcv.2004.08.009
- Prendiville, W., & Davies, P. (2004). *The Health's Professional HPV HANDBOOK, I: Human Papillomavirus and Cervical Cancer*: The European Consortium for Cervical Cancer Education. Taylor & Francis Group.
- Raffle, A. E., Alden, B., Quinn, M., Babb, P. J., & Brett, M. T. (2003). Outcomes of screening to prevent cancer: analysis of cumulative incidence of cervical abnormality and modelling of cases and deaths prevented. *BMJ*, 326(7395), 901. doi: 10.1136/bmj.326.7395.901
- Rijkaart, D. C., Berkhof, J., Rozendaal, L., van Kemenade, F. J., Bulkman, N. W., Heideman, D. A., . . . Meijer, C. J. (2012). Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 13(1), 78-88. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70296-0
- Ronco, G., Giorgi-Rossi, P., Carozzi, F., Confortini, M., Dalla Palma, P., Del Mistro, A., . . . Group, N. T. f. C. C. s. N. W. (2010). Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 11(3), 249-257. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70360-2
- Rous, P., & Bear, J. (1935). Progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas. *J. Exp.Med*, 62, 523-545.
- Rous, P., Beard, J. W., & Kidd, J. G. (1936). OBSERVATIONS ON THE RELATION OF THE VIRUS CAUSING RABBIT PAPILLOMAS TO THE CANCERS DERIVING THEREFROM : II. THE EVIDENCE PROVIDED BY THE TUMORS: GENERAL CONSIDERATIONS. *J Exp Med*, 64(3), 401-424.

- Rous, P., & Kidd, J. G. (1940). THE ACTIVATING, TRANSFORMING, AND CARCINOGENIC EFFECTS OF THE RABBIT PAPILLOMA VIRUS (SHOPE) UPON IMPLANTED TAR TUMORS. *J Exp Med*, 71(6), 787-812.
- Rous, P., Kidd, J. G., & Beard, J. W. (1936). OBSERVATIONS ON THE RELATION OF THE VIRUS CAUSING RABBIT PAPILLOMAS TO THE CANCERS DERIVING THEREFROM : I. THE INFLUENCE OF THE HOST SPECIES AND OF THE PATHOGENIC ACTIVITY AND CONCENTRATION OF THE VIRUS. *J Exp Med*, 64(3), 385-400.
- Safaeian, M., Herrero, R., Hildesheim, A., Quint, W., Freer, E., Van Doorn, L. J., . . . Group, C. R. V. T. (2007). Comparison of the SPF10-LiPA system to the Hybrid Capture 2 Assay for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes among 5,683 young women in Guanacaste, Costa Rica. *J Clin Microbiol*, 45(5), 1447-1454. doi: 10.1128/JCM.02580-06
- Salaheddin, M., Sangwa, G., Nasr, S., Kayembe, P., Tozin, R., Drouin, P., . . . Franco, E. (2014). Comparison of human papillomavirus testing and cytology for cervical cancer screening in a primary health care setting in the Democratic Republic of the Congo. *Gynecologic Oncology*, 124(2), 286 - 291. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.10.031>
- Secretaria de Salud Pública de Honduras, S. d. (2013). Plan estratégico nacional para la prevención y control del cáncer, Honduras.
- Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H. W., Killackey, M., Kulasingam, S. L., Cain, J., . . . Pathology, A. S. f. C. (2012). American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*, 137(4), 516-542. doi: 10.1309/AJCPTGD94EVRSJCG
- Satyanarayana, L., Asthana, S., Bhambani, S., Sodhani, P., & Gupta, S. (2014). A comparative study of cervical cancer screening methods in a rural community setting of North India. *Indian J Cancer*, 51(2), 124-128. doi: 10.4103/0019-509X.138172
- Schiffman, M., Wheeler, C. M., Castle, P. E., & Group, A. S. C. o. U. S. L.-G. S. I. L. T. S. (2002). Human papillomavirus DNA remains detectable longer than related cervical cytologic abnormalities. *J Infect Dis*, 186(8), 1169-1172. doi: 10.1086/343816
- Schiffman, M., Wheeler, C. M., Dasgupta, A., Solomon, D., Castle, P. E., & Group, A. (2005). A comparison of a prototype PCR assay and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus DNA in women with equivocal or mildly abnormal papanicolaou smears. *Am J Clin Pathol*, 124(5), 722-732. doi: 10.1309/E067-X0L1-U3CY-37NW

- Schiller, J. T., Castellsagué, X., & Garland, S. M. (2012). A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F123-138. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.04.108
- Schweizer, J., Lu, P. S., Mahoney, C. W., Berard-Bergery, M., Ho, M., Ramasamy, V., . . . Castle, P. E. (2010). Feasibility study of a human papillomavirus E6 oncoprotein test for diagnosis of cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol*, 48(12), 4646-4648. doi: 10.1128/JCM.01315-10
- Sharma, G., & Agarwal, S. M. (2014). Identification of critical microRNA gene targets in cervical cancer using network properties. *Microrna*, 3(1), 37-44.
- Shen-Gunther, J., & Yu, X. (2011). HPV molecular assays: defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens. *Gynecol Oncol*, 123(2), 263-271. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.07.017
- Sherman, M. E. (2003). Chapter 11: Future directions in cervical pathology. *J Natl Cancer Inst Monogr*(31), 72-79.
- Shope, R. E. (1932). A TRANSMISSIBLE TUMOR-LIKE CONDITION IN RABBITS. *J Exp Med*, 56(6), 793-802.
- Siebers, A. G., Klinkhamer, P. J., Vedder, J. E., Arbyn, M., & Bulten, J. (2012). Causes and relevance of unsatisfactory and satisfactory but limited smears of liquid-based compared with conventional cervical cytology. *Arch Pathol Lab Med*, 136(1), 76-83. doi: 10.5858/arpa.2011-0113-OA
- Simion, N., Căruntu, I. D., Avădănei, E. R., Balan, R., & Amălinei, C. (2014). Conventional cytology versus liquid based cytology in cervical pathology: correspondences and inconsistencies in diagnosis, advantages and limits. *Rom J Morphol Embryol*, 55(4), 1331-1337.
- Stanley, M. A., & Sterling, J. C. (2014). Host responses to infection with human papillomavirus. *Curr Probl Dermatol*, 45, 58-74. doi: 10.1159/000355964
- Stathopoulou, V., Koliopoulos, G., Zygouris, D., Pappas, A., Spathis, A., Karakitsos, P., . . . Chrelias, C. (2014). The diagnostic accuracy of E6 & 7 mRNA detection as a primary screening test for the detection of severe cervical lesions. *J BUON*, 19(2), 490-496.
- Stoler, M. H., Castle, P. E., Solomon, D., Schiffman, M., & Pathology, A. S. f. C. a. C. (2007). The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays. *Am J Clin Pathol*, 127(3), 335-337. doi: 10.1309/RNF3C01JKADQCLKP
- Strander, B., Andersson-Ellström, A., Milsom, I., Rådborg, T., & Ryd, W. (2007). Liquid-based cytology versus conventional Papanicolaou smear in an organized screening program : a prospective randomized study. *Cancer*, 111(5), 285-291. doi: 10.1002/cncr.22953
- Stuardo, V., Agustí, C., Godinez, J. M., Montoliu, A., Torné, A., Tarrats, A., . . . Casabona, J. (2012). Human papillomavirus infection in HIV-1 infected

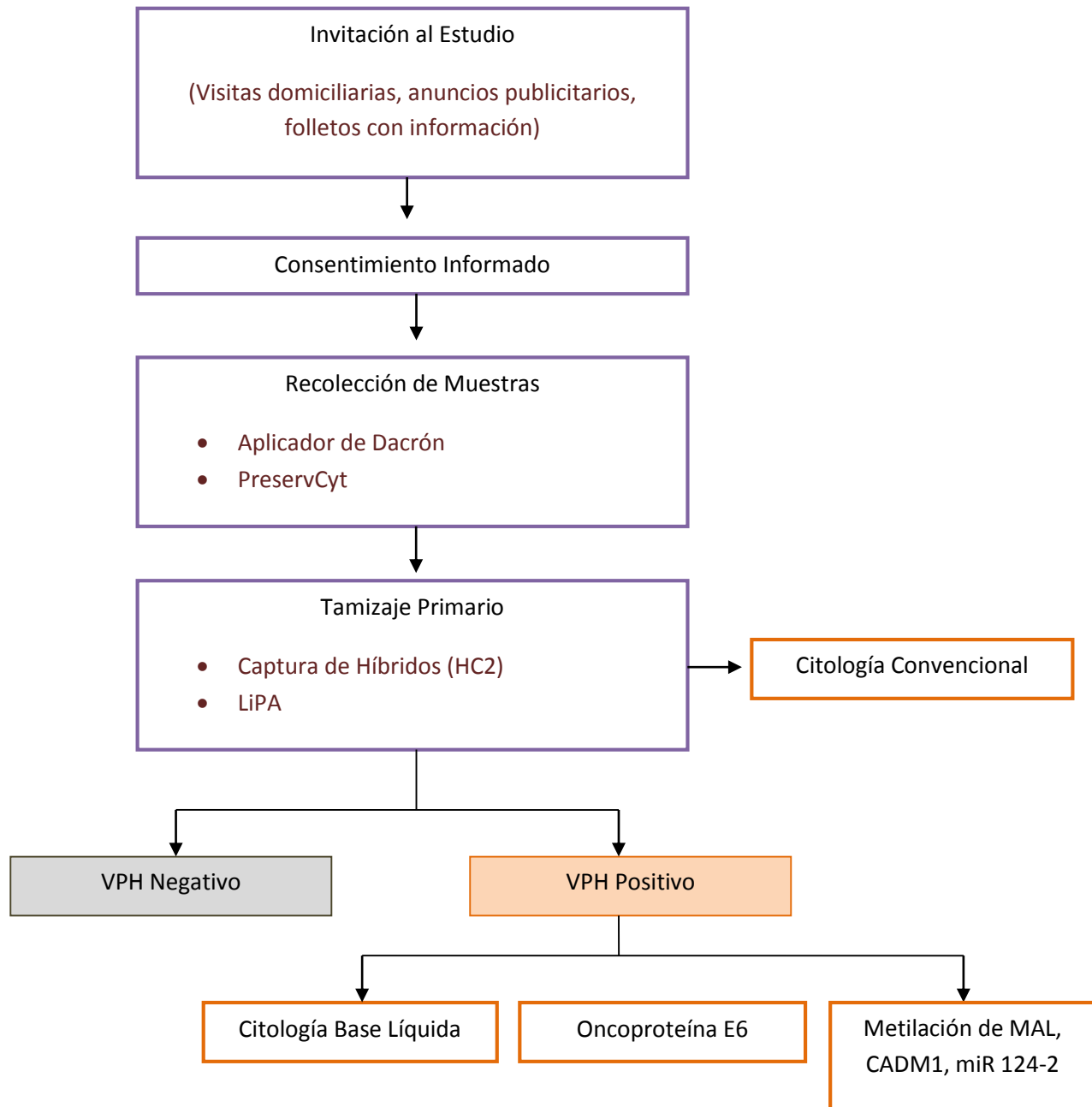
- women in Catalonia (Spain): implications for prevention of cervical cancer. *PLoS One*, 7(10), e47755. doi: 10.1371/journal.pone.0047755
- Tabora, N., Melchers, W. J., van Doorn, L. J., Quint, W., & Ferrera, A. (2010). Molecular Variants of HPV Type 16 E6 Among Honduran Women. *Int J Gynecol Cancer*, 20(3), 323-328. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181d1c2f8
- Trottier, H., Mahmud, S., Costa, M. C., Sobrinho, J. P., Duarte-Franco, E., Rohan, T. E., . . . Franco, E. L. (2006). Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(7), 1274-1280. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0129
- Trottier, H., Mahmud, S., Prado, J. C., Sobrinho, J. S., Costa, M. C., Rohan, T. E., . . . Franco, E. L. (2008). Type-specific duration of human papillomavirus infection: implications for human papillomavirus screening and vaccination. *J Infect Dis*, 197(10), 1436-1447. doi: 10.1086/587698
- Tábor, N., Bakkers, J. M., Quint, W. G., Massuger, L. F., Matute, J. A., Melchers, W. J., & Ferrera, A. (2009). Human papillomavirus infection in Honduran women with normal cytology. *Cancer Causes Control*, 20(9), 1663-1670. doi: 10.1007/s10552-009-9414-z
- Tábor, N., Ferrera, A., Bakkers, J. M., Massuger, L. F., & Melchers, W. J. (2008). High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women. *Am J Trop Med Hyg*, 78(5), 843-846.
- Vaissière, T., Sawan, C., & Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res*, 659(1-2), 40-48. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.02.004
- van der Graaf, Y., Molijn, A., Doornwaard, H., Quint, W., van Doorn, L. J., & van den Tweel, J. (2002). Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol*, 156(2), 158-164.
- van Hamont, D., van Ham, M. A., Bakkers, J. M., Massuger, L. F., & Melchers, W. J. (2006). Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol*, 44(9), 3122-3129. doi: 10.1128/JCM.00517-06
- Villa, L. L. (2012). Cervical cancer in Latin America and the Caribbean: the problem and the way to solutions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21(9), 1409-1413. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0147
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Eienkel, J., Klaes, R., Ziegert, C., Melsheimer, P., . . . von Knebel Doeberitz, M. (2005). Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. *J Natl Cancer Inst*, 97(24), 1816-1821. doi: 10.1093/jnci/dji428
- von Knebel Doeberitz, M. (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*, 38(17), 2229-2242.

- Wang, L., Dai, S. Z., Chu, H. J., Cui, H. F., & Xu, X. Y. (2013). Integration sites and genotype distributions of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(6), 3837-3841.
- Weintraub, J., & Morabia, A. (2000). Efficacy of a liquid-based thin layer method for cervical cancer screening in a population with a low incidence of cervical cancer. *Diagn Cytopathol*, 22(1), 52-59.
- Wheeler, C. M. (2007). Advances in primary and secondary interventions for cervical cancer: human papillomavirus prophylactic vaccines and testing. *Nat Clin Pract Oncol*, 4(4), 224-235. doi: 10.1038/ncponc0770
- WHO. (2011). National Cancer Control Strategy Plan of Action.
- Wiling, S. M., Snijders, P. J., Verlaat, W., Jaspers, A., van de Wiel, M. A., van Wieringen, W. N., . . . Steenbergen, R. D. (2013). Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene*, 32(1), 106-116. doi: 10.1038/onc.2012.20
- Wiling, S. M., Steenbergen, R. D., Tijssen, M., van Wieringen, W. N., Helmerhorst, T. J., van Kemenade, F. J., . . . Snijders, P. J. (2009). Chromosomal signatures of a subset of high-grade premalignant cervical lesions closely resemble invasive carcinomas. *Cancer Res*, 69(2), 647-655. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2478
- Woodman, C., Collins, S., & Young, L. (2007). The nature history of cervical infection: unresolved issues. *Nature Rew*, 7, 11-22.
- Wu, J., Li, X. J., Zhu, W., & Liu, X. P. (2014). Detection and pathological value of papillomavirus DNA and p16(INK4A) and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Oncol Lett*, 7(3), 738-744. doi: 10.3892/ol.2014.1791
- Zhang, R., He, Y. F., Chen, M., Chen, C. M., Zhu, Q. J., Lu, H., . . . Yu, L. (2014). Diagnosis of 25 genotypes of human papillomaviruses for their physical statuses in cervical precancerous/cancerous lesions: a comparison of E2/E6E7 ratio-based vs. multiple E1-L1/E6E7 ratio-based detection techniques. *J Transl Med*, 12(1), 282. doi: 10.1186/s12967-014-0282-2
- Zhao, F. H., Jeronimo, J., Qiao, Y. L., Schweizer, J., Chen, W., Valdez, M., . . . Castle, P. E. (2013). An evaluation of novel, lower-cost molecular screening tests for human papillomavirus in rural China. *Cancer Prev Res (Phila)*, 6(9), 938-948. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0091
- zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*, 36(2 pt 2), 794.
- zur Hausen, H. (1981). Molecular cloning of viral DNA from human genital wartz. *Virology Journal*, 40, 932 - 935.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infecions, a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288, F55 - F78.

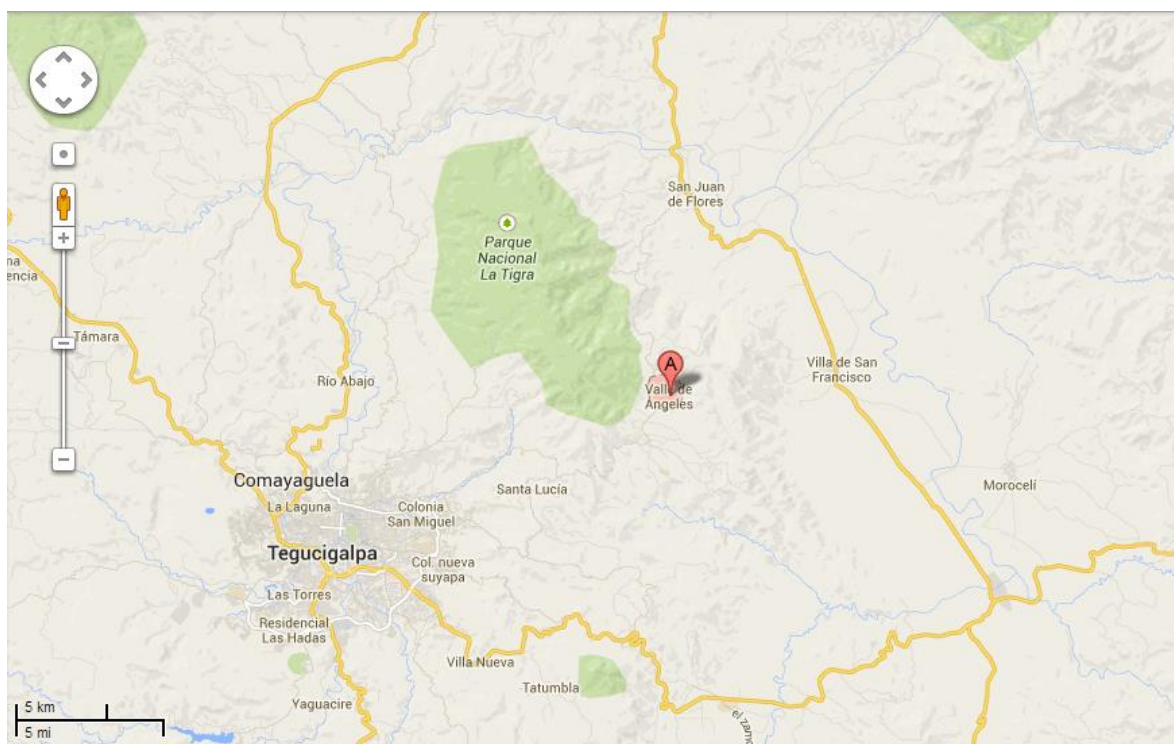
zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2(5), 342-350. doi: 10.1038/nrc798

ANEXOS

ANEXO 1. Flujograma de Trabajo



ANEXO 2. Área de estudio



Indicador A: Comunidad de Valle de Ángeles, Francisco Morazán, Honduras

Elaborado utilizando Google Maps

Comunidad El Tablón, Valle de Ángeles



ANEXO 3. Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: Evaluación de Estrategias Alternativas de Tamizaje de Cáncer Cervicouterino en Mujeres del Municipio de Valle de Ángeles, Francisco Morazán, Honduras

Realizado por: Escuela de Microbiología, UNAH; Programa Nacional de Cáncer, Ministerio de Salud

Patrocinado por: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), Organización Mundial de la Salud (OMS)

Investigadores: Annabelle Ferrera, Ph.D. –Escuela de Microbiología

Yessy Cabrera, Lic. Microbiología –Escuela de Microbiología

Identificación del participante: _____

Introducción

El cáncer de cuello uterino o cáncer de cuello del útero es un problema de salud importante en nuestro país, y ha sido muy difícil controlarlo. Actualmente sabemos que el cáncer de cuello del útero es causado por una infección por algunos tipos del virus del papiloma humano (VPH). (Un virus es un organismo muy pequeño no visible al microscopio). Esta infección viral es muy común y las defensas del cuerpo usualmente eliminan la infección durante los dos años siguientes a su adquisición. Sin embargo, algunas mujeres que padecen la infección no la eliminan y podrían desarrollar cáncer. Actualmente para prevenir el cáncer de cuello del útero se utiliza la prueba de la citología, conocida como Papanicolaou. Esta prueba consiste en examinar las células recolectadas del cuello del útero utilizando un microscopio, para identificar si hay cambios anormales en algunas de ellas. Si se encuentran células con cambios anormales, estos podrían haber sido causados por algún VPH y pueden representar la existencia de una lesión en el cuello del útero, que si es detectada a tiempo puede ser tratada antes de convertirse en cáncer. Estamos investigando nuevas técnicas que podrían ser mejores que el Papanicolaou para detectar lesiones causadas por el VPH, que al

ser identificadas y tratadas adecuadamente no se convertirán en cáncer de cuello del útero.

¿De qué se trata este estudio?

Este estudio busca evaluar diferentes estrategias para definir cuál de ellas identifica mejor a las mujeres con riesgo de desarrollar cáncer entre aquellas infectadas con el VPH. Invitaremos a 300 mujeres entre los 30 y 64 años de edad en el Municipio de Valle de Ángeles, Francisco Morazán.

¿Quiénes pueden participar?

Mujeres entre los 30 y 64 años que ya hayan tenido relaciones sexuales, que no estén embarazadas y que no hayan tenido un parto o aborto en los últimos tres meses.

¿Qué implica para mí participar?

Si usted acepta participar, en su visita le haremos preguntas acerca de sus datos personales. Además, se le recolectarán muestras de células de su cuello del útero para detectar la presencia del virus (VPH). La recolección de las muestras es similar a la recolección para el Papanicolaou.

Usando una de las muestras recolectadas, realizaremos la prueba de VPH. Si su resultado de la prueba de VPH es negativo, no se le realizarán los estudios posteriores y por lo tanto debe continuar con sus controles médicos de rutina dentro de su sistema de salud. Cualquier remanente de las muestras recolectadas no utilizado será desechado.

En caso de que su resultado sea positivo para la prueba de VPH, sus muestras se utilizarán para la realización de las diferentes pruebas que se encuentran en evaluación, estas incluyen pruebas para detectar ciertas proteínas del virus, técnicas que mejoran la calidad del Papanicolaou entre otras.

Le pedimos autorización para almacenar sus muestras, las cuales utilizaremos para la evaluación de otras estrategias que puedan mejorar la detección temprana del cáncer de cuello del útero. Para cualquier evaluación de nuevas estrategias, solo se usarán sus muestras, pero sus datos personales no serán utilizados ni compartidos.

Finalmente le recalamos que su participación es completamente voluntaria y puede negarse a participar en cualquier parte del estudio o retirarse de este cuando quiera. Esto no afectará los servicios que usted recibe dentro de su sistema de salud.

¿Mi participación tendrá algún costo para mí o recibiré algún pago por mi participación?

Todos los procedimientos del estudio son completamente gratis. Usted ni pagará, ni recibirá ningún pago por su participación.

¿Qué muestras serán recolectadas durante el estudio y para qué serán utilizadas?

Vamos a recolectar tres muestras de células de su cuello del útero durante su visita.

Las muestras de su cuello del útero se utilizarán para determinar la presencia de VPH y para estudiar las diferentes manifestaciones del virus en las células que nos puedan ayudar a identificar a las mujeres que estén en mayor riesgo de desarrollar cáncer.

Las muestras serán almacenadas en el Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Microbiología, UNAH. En este documento le pedimos autorización para usar sus muestras en estudios futuros y por lo tanto usted no volverá a ser contactada por este motivo en el futuro.

Usted recibirá los resultados de las pruebas de VPH recolectadas durante su participación. Los resultados de las otras estrategias en investigación no le serán informados porque no serán utilizados para decidir si usted necesita ser tratada o no. Sin embargo, si usted prefiere, puede solicitarlos contactando al investigador principal, Dra. Annabelle Ferrera, Escuela de Microbiología, UNAH, quien se los comunicara cuando estén disponibles.

Una vez más le recordamos que sus muestras almacenadas no serán marcadas con información que la identifique. Solo tendrán un código que permitirá asociarlas con sus otros datos.

¿Cuáles son los beneficios de mi participación?

El beneficio es que se le realizarán pruebas de alta calidad para la detección de lesiones que podrían convertirse en cáncer de cuello del útero.

¿Cuáles son los riesgos de mi participación?

El examen ginecológico es incómodo y en muy pocas ocasiones puede producirle un sangrado ligero muy corto que desaparece espontáneamente.

¿La información que voy a brindar es confidencial?

Toda la información que brinde, incluyendo los resultados de sus pruebas, será confidencial. Se va a usar un número de estudio que la identificará a usted, sus documentos y sus muestras. La información que permite vincular este número con su nombre se guardará en un lugar seguro y estará disponible únicamente para el personal del estudio.

El investigador principal es responsable de asegurar la confidencialidad de sus datos. Todo el personal del estudio mantendrá la confidencialidad de su identidad y su nombre no aparecerá en ninguna publicación con respecto al estudio o sus resultados.

Instituciones, aprobaciones, seguimientos, preguntas adicionales y futuros contactos

Este estudio está coordinado por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer y es realizada en Honduras por la Escuela de Microbiología, UNAH. Es estudio es financiado por la IARC.

El protocolo del estudio y el consentimiento informado han sido revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer y por el Comité de Ética de la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina y por el Comité de Ética de la OPS.

Si tiene preguntas adicionales puede hacerlas y discutir las con el personal del estudio. Si tiene preguntas adicionales puede contactarse con la Dra. Annabelle Ferrera, investigador principal de la Escuela de Microbiología en el teléfono 99902713.

He leído el consentimiento informado y este formulario.

Iniciales _____

Y sé lo siguiente:

- Que el Virus del Papiloma Humano (VPH) puede causar cáncer de cuello del útero si la infección no es eliminada por las defensas del cuerpo
- Que actualmente es posible detectar las lesiones en el cuello del útero utilizando una prueba que detecta el VPH
- Que en este estudio se investigarán varias estrategias para detectar las lesiones en el cuello del útero que podrían convertirse en cáncer
- Que como parte de los procedimientos del estudio, se me realizarán pruebas y se recolectarán muestras para investigación
- Que si tengo un resultado positivo en la prueba de VPH se realizaran pruebas adicionales, de lo contrario debo continuar mi tamizaje regular dentro de mi sistema de salud
- Que mis muestras serán almacenadas y podrán ser utilizadas en el futuro en la evaluación de nuevas estrategias que puedan servir para mejorar la detección temprana del cáncer de cuello del útero
- Que mi participación es voluntaria y no tendrá ningún costo y que no me pagarán por participar
- Los riesgos y beneficios de participar en este estudio
- A quién puedo llamar si tengo dudas o preguntas acerca del estudio
- Que me puedo retirar del estudio en cualquier momento o negarme a cualquier parte del estudio y que esto no representará ningún problema para mí

Sí, yo acepto participar

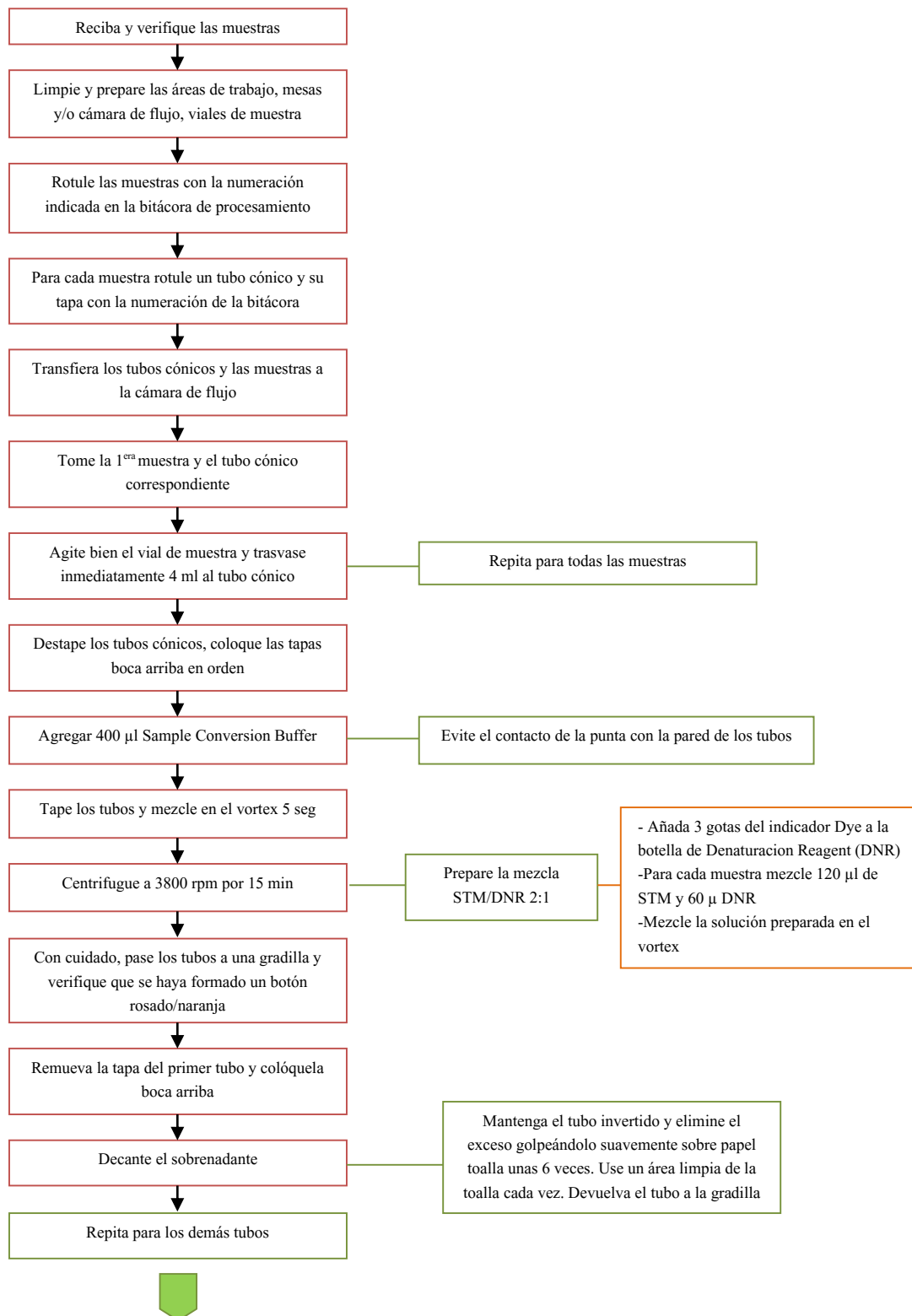
Firma de la participante	Nombre completo	Fecha
--------------------------	-----------------	-------

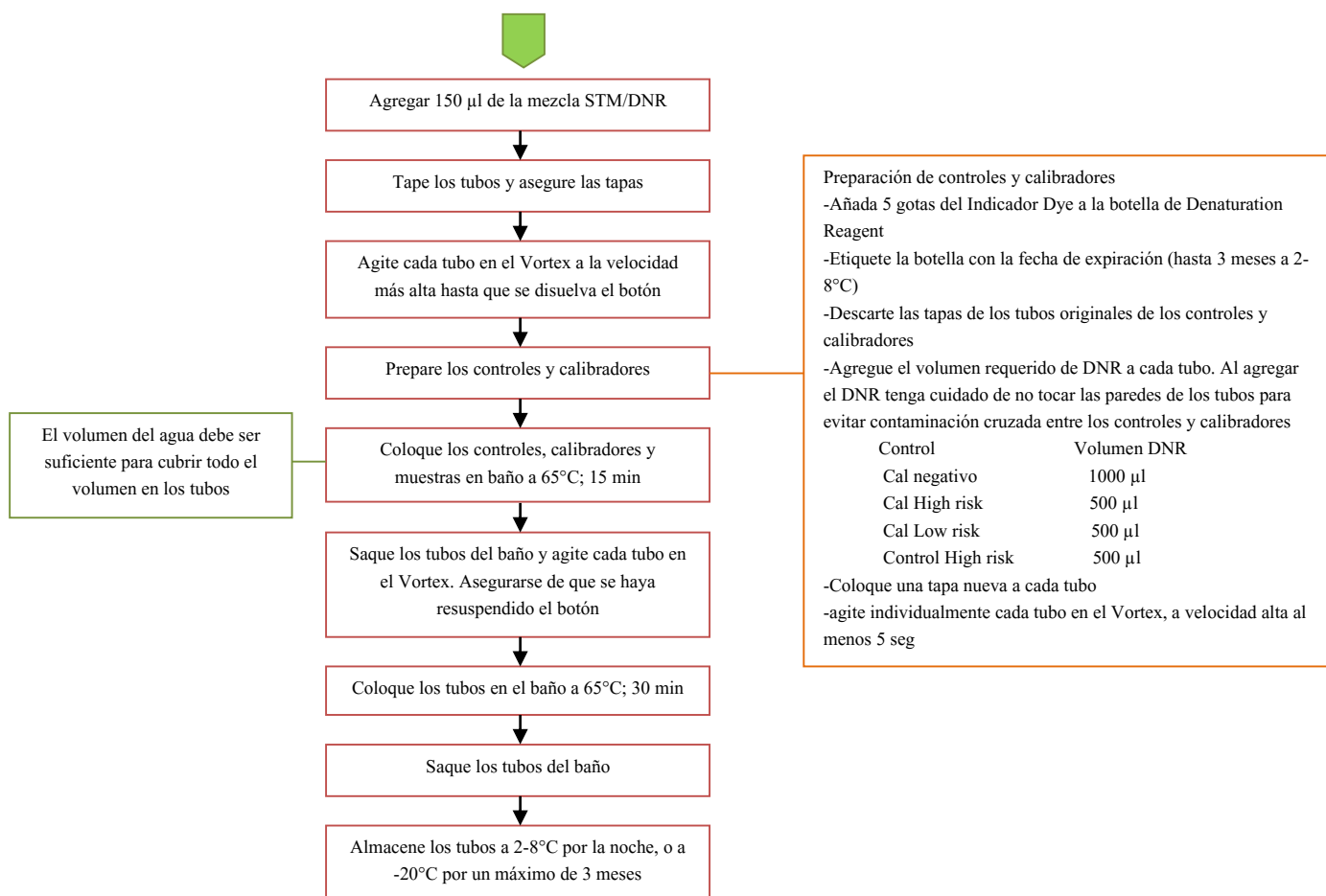
Firma del administrador del consentimiento	Nombre completo	Fecha
--	-----------------	-------

Firma del testigo	Nombre completo	Fecha
-------------------	-----------------	-------

Anexo 6. Flujograma Denaturación y Captura de Híbridos

Desnaturalización de muestras recolectadas en solución PreservCyt para la realización de prueba de Captura de Híbridos





Determinación Cualitativa de ADN de VPH de Alto Riesgo por Captura de Híbridos

