

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



"Rol de marcadores de proliferación celular y viral y la eliminación o persistencia del VPH como estrategias de triaje y seguimiento a las mujeres VPH positivas en cuatro municipios de Francisco Morazán"

DOCUMENTO DE TESIS SUSTENTADA POR:

WENDY CAROLINA VALLADARES MOTIÑO, M.Q.C.

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

TEGUCIGALPA M.D.C. SEPTIEMBRE 2017 HONDURAS C. A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.

VICERRECTORA ACADÉMICA

BELINDA FLORES, M.Sc.

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

LETICIA SALOMÓN, M.Sc.

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

NABIL KAWAS, M.Sc.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRÓN, M.S.P

TEGUCIGALPA, M.D.C. SEPTIEMBRE 2017

HONDURAS C. A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESORA DE TESIS

ANNABELLE FERRERA, Ph.D.

TERNA EXAMINADORA:

ANNABELLE FERRERA, Ph.D.

GUSTAVO FONTECHA, Ph.D.

BRENDA SALGADO, M.S.P.

TEGUCIGALPA, M.D.C. SEPTIEMBRE 2017 HONDURAS C. A.

Dedicada

A mis padres Glendis y Belmin por su apoyo en todo momento...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por los momentos buenos y también por los difíciles, por los errores que he cometido y me dejaron una enseñanza y por bendecirme en cada etapa de mi camino.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Annabelle Ferrera, asesora de este estudio por su gran interés, motivación y orientación para la realización de esta investigación.

De igual manera un agradecimiento especial a los miembros del Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital General de México, en especial al Dr. Jaime Berumen, por las atenciones brindadas durante la ejecución del proyecto.

A todas las personas que colaboraron con esta investigación muy particularmente al Dr. Elmer Turcios, Dra. Odessa Henríquez por su buena disposición durante la ejecución del estudio.

A las instituciones Corporación Arbor Vita, Hospital General San Felipe, Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), Dirección de Investigación Científica y Posgrado, UNAH, Secretaria de Salud de Honduras, por su apoyo y cooperación en el estudio.

Y a todas las personas que participaron de forma directa e indirectamente, gracias por las atenciones brindadas durante la ejecución del proyecto.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE ANEXOS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN.....	v
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	5
2. 1 Cáncer cervical.....	5
2.1.1 Epidemiología descriptiva	5
2.1.1.1 Cáncer cervical y mortalidad femenina a nivel mundial	5
2.1.1.2 Cáncer cervical en América Latina.....	6
2.1.1.3 Cáncer cervical en Honduras	6
2.1.2 Histología y clasificación.....	8
2.2 Virus del Papiloma Humano	11
2.2.1 Clasificación y diversidad genética.....	11
2.2.2 Variantes del VPH tipo 16	13
2.2.3 Genoma del Virus del Papiloma Humano.....	14
2.2.4 Proteínas claves del VPH en la carcinogénesis cervical.....	15
2.2.4.1 Proteína E7	16
2.2.4.2 Proteína E6	17
2.2.4.3 Efecto de E6 sobre la proliferación celular	18
2.2.5 El ciclo biológico del VPH.....	20
2.3 Patología	22
2.4 Polimorfismos de nucleótido simple, cáncer cervical y VPH.....	24
2.4.1 Polimorfismos de nucleótido simple y genes reguladores del ciclo celular	25
2.5 Genes supresores de tumores	26
2.5.1 El gen supresor de tumores p53	27
2.5.2. El gen pRb	28
2.5.3 El gen p16 ^{INK4a}	28
2.5.4 Utilidad clínica de p16 ^{INK4a} en la clasificación de lesiones cervicales.....	29
2.6 Factores de riesgo.....	31
2.7 Diagnóstico	33

2.7.1	Estrategias de tamizaje primario	34
2.7.2	Estrategias de tamizaje secundario o triaje	35
2.8	Prevención	36
2.8.1	Vacunas	36
2.9	Tratamiento.....	37
CAPÍTULO 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.....	41
3.9	Recolección y tipos de muestras	42
3.10	Transporte y almacenamiento de las muestras.....	43
3.11	Análisis de laboratorio	44
3.11.1	Extracción de ácidos nucleicos mediante kit comercial QIAGEN	44
3.11.2	Ensayo de hibridación de ácidos nucleicos (hC2 High-Risk HPV DNA Test)	44
3.11.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para β-globina	45
3.11.4	Genotipificación del VPH por medio de LiPA (Genotyping kit HPV GP, versión 2) ..	45
3.11.5	Evaluación de dos marcadores de progresión oncogénica, marcador virológico (oncoproteína E6) y citológico (p16^{INK4a}).....	46
3.11.5.1	Método de detección de oncoproteína E6 (VPH 16/18 OncoE6)	46
3.11.5.2	Identificación de las variantes del VPH 16.....	47
3.11.5.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa para L1 (MY) y E6	47
3.11.5.2.2	Electroforesis capilar mediante el uso de la química BigDye (Secuenciación enzimática tipo Sanger)	47
3.11.5.3	Método de tinción p16 ^{INK4a} por inmunohistoquímica	48
3.12.	Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres	48
3.12	Control y seguimiento de pacientes	48
3.12.1	Infección persistente	49
3.12.3	Infección recurrente o recidiva	49
3.12.4	Eliminación del VPH.....	49

3.13 Recolección de información	49
3.14 Análisis de datos	50
3.14.1 Manejo de datos	50
3.14.2 Análisis estadístico.....	50
3.15 Consideraciones éticas	51
3.16 Consideraciones de bioseguridad	52
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	52
4.1 Determinación de la expresión de la oncoproteína E6 del VPH 16/18.	52
4.1.1 Genotipificación del VPH por medio de prueba LiPA.....	53
4.1.2 Detección de la expresión de la oncoproteína E6 del VPH 16 y 18.	55
4.2 Identificación de las variantes y sublinajes del VPH 16	58
4.2.1 Identificación de mutaciones puntuales, en las regiones L1/MY y E6 del VPH 16.....	60
4.2.2 Asociación de las variantes según el tipo histológico de cáncer cervical.	62
4.3 Determinar en mujeres VPH positivas/negativas la presencia de NIC 2 evaluando el desempeño de la tinción de p16^{INK4a} en biopsias cervicales.	62
4.3.1 Expresión de p16 ^{INK4a} en tejido cervical dependiente del diagnóstico histológico	63
4.4 Persistencia, recurrencia o eliminación de las infecciones por VPH de alto riesgo después de 18 meses de la detección inicial del virus.	64
4.4.1 Genotipificación del VPH	65
4.4.2 Identificación de infecciones persistentes o recurrentes por VPH de alto riesgo.	66
4.4.3 Clasificación de lesiones cervicales en infecciones recurrentes o persistentes.	67
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	69
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	82
CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	84
CAPÍTULO 8. Referencias	86
ANEXOS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidad por cáncer cervical en el mundo. Tomada de GLOBOCAN 2012..	6
Figura 2. Órganos genitales femeninos internos. Tomada de American Cancer Society 2015.	9
Figura 3. Diferentes vías en las que puede actuar la E7 del VPH de alto riesgo. Modificado de: Niladri, 2009.	17
Figura 4. Diferentes mecanismos de acción de la E6 del VPH de alto riesgo. Modificado de: Niladri, 2009.	20
Figura 5. Biología de la infección por el VPH. Modificado de Bergeron, 2015.	22
Figura 6. Progresión del cáncer cervical por el VPH. Modificado de Woodman y colaboradores, 2007.	24
Figura 7 A. Tinción de inmunohistoquímica no difusa de p16 ^{INK4a} en biopsia de cuello uterino argumentando un resultado de LSIL B. Tinción de inmunohistoquímica fuerte y difusa para p16 ^{INK4a} en biopsia de cuello uterino confirmando diagnóstico HSIL. (Modificado de Kruti, 2015).	30
Figura 8. Principio de la prueba OncoE6 (Tomado de Schweizer y colaboradores, 2010).	46
Figura 9. Detección de β-globina humana por medio de PCR. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 3 control positivo y negativo, carriles del 4 al 14 muestras positivas.	54
Figura 10. Detección del VPH por medio de PCR. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 3 control positivo y negativo, carriles del 4 al 25 muestras positivas.	54
Figura 11. Frecuencia del VPH 16 y 18.	55
Figura 12. Interpretación de la prueba OncoE6 VPH16/18. (C) Línea de control, (16) línea VPH16-E6, (18) Línea VPH-18-E6. Tira 1y 2: negativa; Tira 3: VPH16-E6 positivo.	56
Figura 13. Detección de la región L1/MY por medio de PCR. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 3 control positivo y negativo, carriles del 4 al 12 muestras positivas.	58
Figura 14. Amplificación de la región E6 de VPH 16. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 3 control positivo y negativo, carriles del 4 al 16 muestras positivas.	59
Figura 15. Electroferograma de la región L1/MY (450 nucleótidos) del VPH 16.	59
Figura 16. Porcentaje de las variantes del VPH 16 por grupos de edad.	61
Figura 17 A. Tinción de inmunohistoquímica negativa para p16 ^{INK4a} biopsia de cuello uterino, con diagnóstico inicial de cervicitis crónica inespecífica. B. Tinción de inmunohistoquímica positiva para p16 ^{INK4a} en biopsia de cuello uterino con diagnóstico inicial de NIC 2.	63
Figura 18. Mujeres VPH positivas a los 18 meses del reclutamiento.	65

Figura 19. Clasificación de las infecciones durante el seguimiento a 18 meses.	66
Figura 20. Tipos de VPH en infecciones persistentes	67
Figura 21. Frecuencia de infección persistente por grupos de edad.	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Terminología citológica	10
Tabla 2. Variantes del Virus del Papiloma Humano 16.....	13
Tabla 3. Funciones principales de cada uno de los genes	15
Tabla 4. Funciones de la oncoproteína E6.	18
Tabla 5. Enfermedades asociadas por el VPH.	23
Tabla 6. Detección del VPH por hC2 y PCR (GP+5/+6)	53
Tabla 7. Número de mujeres con NIC2+ y sin enfermedad por tipo de VPH (16/18, Otro y negativo) y resultado de E6.....	57
Tabla 8. Desempeño de la prueba OncoE6 para la detección de NIC2 +	57
Tabla 9. Cambios en la secuencia de nucleótidos en las regiones L1 (MY) y E6, de las variantes del VPH 16: A1/2 y D3.....	60
Tabla 10. Distribución de las variantes del VPH 16 en carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas.	62
Tabla 11. Expresión de p16 ^{INK4a} en tejido cervical normal y NIC 2 confirmadas histológicamente.	64
Tabla 12. Genotipificación del VPH en muestras de seguimiento y reclutamiento.	65
Tabla 13. Patología cervical identificada.....	68

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Solicitud de ética aprobada por el Comité de Ética de la IARC.....	95
Anexo 2. Solicitud de ética aprobada por el Comité de Ética en investigación (CEIB). 96	
Anexo 3. Solicitud de ética aprobada por el Comité de Ética en investigación CEI-MEIZ.....	97
Anexo 4. Flujograma de trabajo para la detección de la Oncoproteína E6.....	98
Anexo 5. Flujograma de trabajo detección de p16 ^{INK4a}	99
Anexo 6. Flujograma de trabajo visita de seguimiento 18 meses.....	100
Anexo 7. Consentimiento informado.....	101
Anexo 8. Formulario de datos personales	106
Anexo 9. Formulario datos socio-demográficos	107
Anexo 10. POE Toma de muestras cervicales	110
Anexo 11. POE Envío, transporte y recepción de especímenes del sitio de campo al laboratorio.	112

Anexo 12. POE Desnaturalización de muestras recolectadas en solución PreservCyt para realización posterior de pruebas de captura de híbridos.....	113
Anexo 13. POE Determinación cualitativa de ADN de VPH de alto riesgo por captura de híbridos 2	117
Anexo 14. POE Extracción de ADN de muestras cervicales QIAGEN	121
Anexo 15. POE Amplificación de ADN (Genotyping kit HPV GP)	123
Anexo 16. POE Genotipificación VPH (Genotyping kit HPV GP)	127
Anexo 17. POE Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para L1 (MY)	130
Anexo 18. POE Electroforesis capilar mediante el uso de la química BigDye (Secuenciación enzimática tipo Sanger)	134
Anexo 19. POE Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para E6	137
Anexo 20. POE Detección de oncoproteína E6 de subtipos 16 y 18 de VPH (OncoE6 Cervical Test)	141
Anexo 21. POE Amplificación de ADN (INNO-LIPA HPV Genotyping Extra)	144
Anexo 22. POE Genotyping VPH (INNO-LIPA HPV Genotyping Extra)	147
Anexo 23. POE Técnica de inmunohistoquímica detección de p16 ^{INK4a}	150
Anexo 24. POE Visita de seguimiento a las participantes después de 18 meses del reclutamiento.....	156
Anexo 25. Formulario de Bioseguridad.	159

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC	Adenocarcinoma
CaCe	Cáncer Cervical
cdK	Quinasas dependientes de ciclinas
ESTAMPA	Estudio multicéntrico de tamizaje y triaje usando la prueba del Virus de Papiloma Humano
HGSF	Hospital General San Felipe
HRP/DAB	(Horseadish peroxidase/diaminobenzidine)
LIEAG	Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado
LIEBG	Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado
NIC	Neoplasia Intraepitelial cervical
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pap	Papanicolaou
pRb	Proteína del retinoblastoma
SCC	Carcinoma de células epiteliales
UEC	Unión escamocolumnar
URR	Región no codificante
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPH	Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

En Honduras, el cáncer de cuello uterino continúa representando una carga importante para el sistema de atención de la salud, debido principalmente a la especificidad disminuida de la prueba de detección utilizada, en donde se promueve el control citológico, ya que las cifras reflejan que aún se está lejos de disminuir la mortalidad por este cáncer por lo que se está evaluando el tamizaje primario detectando el ADN del Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo. El presente estudio tiene como objetivo estimar la eficacia de marcadores de proliferación celular y viral y la eliminación, recurrencia o persistencia del VPH como estrategias de triaje y seguimiento a las mujeres VPH positivas en tamizaje primario. Un total de 264 mujeres entre 30 y 64 años de edad participaron en el estudio; 196 para evaluar la oncoproteína E6 VPH 16/18, 20 para valorar la expresión de la tinción p16^{INK4a} y 111 mujeres quienes fueron seguidas por 18 meses para detectar la eliminación, persistencia o recurrencia del VPH de alto riesgo. En la presente investigación encontramos que la oncoproteína E6 como estrategia de triaje mostró una sensibilidad del 100% en los casos NIC 2+ asociados a los tipos 16 y 18; simultáneamente logramos identificar las variantes EAS y NA/AA del genotipo VPH 16 dentro de la cohorte analizada con una prevalencia de 69.2% y 30.7%, respectivamente. Por otro lado, la tinción inmunohistoquímica de p16^{INK4a} correlacionó en un 100% en la diferenciación de casos negativos/NIC 1 y casos más severos NIC 2. Al darle seguimiento a la cohorte de mujeres VPH positivas, el 58% logró eliminar la infección a los 18 meses, mientras que el 35% de las que mostraron infección de tipo persistente desarrollaron lesiones tipo NIC 2+; por otro lado, solo el 14% mostró infecciones recurrentes, en su mayoría con

lesiones tipo NIC 1. En conclusión, nuestros resultados sugieren enfoques prometedores como triaje y seguimiento de la persistencia de virus oncogénicos a las mujeres VPH positivas en reclutamiento. Estos planteamientos podrían en un futuro aportar opciones a las autoridades del Sistema de Salud Nacional para convertir en realidad la esperanza de que toda mujer se someta a pruebas de detección de cáncer cervical al menos una vez en la vida y lograr reducir considerablemente la mortalidad por esta patología en el país.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical (CaCe) es el séptimo cáncer más frecuente en la población general y el cuarto más común entre las mujeres de todo el mundo. El 80% de los casos se presentan en países en vía de desarrollo, constituyendo uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial [Ferlay et al., 2015].

En nuestro país, el cáncer cérvico-uterino es un indicador de inequidad en salud, siendo actualmente la principal causa de muerte entre la población femenina hondureña [GLOBOCAN, 2012]. Múltiples investigaciones se han realizado en el país determinando, la prevalencia de los tipos de VPH (Virus del Papiloma Humano), estudios caso-control en mujeres con displasia y cáncer cervical, así como identificación de factores genéticos del huésped asociados al desarrollo del cáncer de cérvix. La carga viral del VPH 16 y su relación con el incremento de displasia cervical en las mujeres hondureñas también ha sido estudiada [Ferrera et al., 2011; Ferrera et al., 1999; Ferrera et al., 2000; Táborá et al., 2008].

El VPH es el virus de transmisión sexual más frecuente, pertenece a la familia *Papillomaviridae* y tiene la capacidad de afectar tanto la piel humana como las membranas húmedas que recubren el cuerpo; éste se encuentra presente en casi el 100% de los casos de CaCe, y representa una infección muy común que se adquiere usualmente poco después del inicio de la actividad sexual. En relación a su patogenia oncogénica se clasifica en tipos de alto y de bajo riesgo oncológico asociándose el cáncer cervical a los tipos de VPH filogenéticamente relacionados a alto riesgo. Los tipos de VPH 16 y 18 son considerados los responsables de alrededor del 70% de todos los tumores [Ferlay et al., 2015].

En países donde los programas de prevención de CaCe están bien estructurados, la citología ha reducido la evolución de lesiones cervicales a cáncer, mediante su detección oportuna, a pesar de presentar una muy baja sensibilidad (53%) [Almonte et al., 2010; Cuzick et al., 2006]. Sin embargo, el panorama en los países de bajos ingresos económicos ha sido distinto. Adicionalmente a este hecho, tanto en la citología como en el estudio histológico de las lesiones cervicales, nos encontramos con casos en los que es muy difícil emitir una opinión diagnóstico-pronóstica acertada, generando mucha discordancia entre los observadores.

Por esta razón es necesario recurrir a otros marcadores de proliferación que nos aclaren, en la medida de lo posible, el diagnóstico y pronóstico para cada caso. En la actualidad, los esfuerzos de las investigaciones se han enfocado en métodos de evaluación suplementarios al método de tamizaje tradicional, dando como resultado la utilización de la prueba de VPH como tamizaje primario y el empleo de biomarcadores que permitan la estratificación del riesgo para mujeres VPH positivas con citologías normales.

Uno de los marcadores moleculares propuesto como técnica de triaje (método de selección y clasificación de pacientes según la urgencia de su atención) es la Oncoproteína E6 del VPH. Las oncoproteínas son los efectores finales de la actividad oncogénica del virus, y las más estudiadas son las proteínas cancerígenas E6 y E7; la expresión de estas proteínas es diferente según el tipo de VPH: oncogénicos y no oncogénicos [Pastuszak-Lewandoska et al., 2014].

La oncoproteína E6 se expresa en niveles elevados únicamente cuando las células cervicales infectadas con VPH experimentan cambios precancerosos o

cancerosos. Por lo tanto, una prueba que permita la detección de esta proteína podría ser más específica para la detección de lesiones precancerosas [Pastuszak-Lewandoska et al., 2014], con la ventaja adicional de constituir una técnica relativamente simple que podría adaptarse para países en vías de desarrollo como Honduras.

Los marcadores de proliferación celular también se han sugerido como métodos prometedores en el diagnóstico y pronóstico de lesiones cervicales; la proteína p16^{INK4a}, codificada por el gen supresor de tumores CDKN2A, es una proteína de las células humanas que actúa como inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk), desacelerando el ciclo celular mediante la inactivación de la función de los complejos Cdk4- y Cdk6-ciclina D. La proteína p16^{INK4a} corresponde al elemento celular resultante del aumento en la expresión de la oncoproteína viral E7 que altera la proteína del retinoblastoma (pRb), un regulador celular clave. Se ha demostrado la existencia de una correlación recíproca entre pRb y p16^{INK4a}, por lo que existe una fuerte sobreexpresión de p16^{INK4a} en los carcinomas y en las lesiones premalignas del cérvix uterino [Delgado et al., 2014; Grillo-Ardila et al., 2008].

Las evidencias existentes sobre la utilidad de la sobreexpresión de la proteína p16^{INK4a} para reducir la variabilidad diagnóstica en lesiones preinvasivas e invasivas de cuello uterino son muy numerosas, de modo que se puede afirmar que se trata de una herramienta sumamente útil no sólo en el diagnóstico de lesiones de cérvix sino en el manejo posterior de las mismas, aportando un elemento objetivo con escasa variabilidad entre los observadores [Delgado et al., 2014].

La detección del VPH se ha establecido en algunos países como método de tamizaje primario; sin embargo, su principal desventaja radica en la baja especificidad de la prueba y debido al gran número de infecciones transitorias, sobre todo en las mujeres jóvenes, ya que el sistema inmunológico logra resolver la infección, eliminándola en los primeros 30 meses; por lo que la prueba resulta ser poco sostenible sobre todo en los países pobres [ACS, 2014; Bruni et al., 2015; Rodríguez et al., 2008].

Por consiguiente, el objetivo del presente estudio es estimar la eficacia de marcadores de proliferación celular y viral y la eliminación, recurrencia o persistencia del VPH como estrategias de triaje y seguimiento a las mujeres VPH positivas. Los datos obtenidos en esta investigación podrían contribuir a llenar parte del vacío de conocimiento respecto al rendimiento de la expresión de la oncoproteína E6 y la sobreexpresión de la proteína p16^{INK4a} como estrategia de triaje en mujeres hondureñas. Del mismo modo, la identificación de mujeres con infecciones por VPH de tipo persistente, por medio del seguimiento, podría contribuir a la identificación de las mujeres que requieren un seguimiento más estricto de las que no.

Por ende, este estudio surge en atención a la actual necesidad de evaluar otros procedimientos 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 metodologías para el tamizaje primario serán el eje en la reducción del sufrimiento y las muertes causadas por esta patología.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2. 1 Cáncer cervical

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. El cáncer se caracteriza por la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo propagándose a otros órganos; este proceso se conoce como metástasis [OMS, 2015]. Existen diversos tipos de cáncer siendo el cáncer cervical uno de los que más afecta a la población femenina a nivel mundial [GLOBOCAN, 2012].

2.1.1 Epidemiología descriptiva

2.1.1.1 Cáncer cervical y mortalidad femenina a nivel mundial

En el año 2015 la OMS reportó 8,2 millones de defunciones en todo el mundo a causa del cáncer, convirtiéndose en la principal causa de muerte a escala mundial. Dentro del contexto mundial el CaCe ocupa el cuarto lugar en la población femenina y el séptimo lugar entre los cánceres en general. Cada año 527,624 mujeres desarrollan cáncer de cuello uterino en el mundo y alrededor de 265,653 mueren a causa de esta enfermedad, especialmente en países en vía de desarrollo, donde se presentan casi el 80% de todos los casos [Bruni et al., 2015; Ferlay et al., 2015; GLOBOCAN, 2012]. En el siguiente mapa (Figura 1) se puede observar la mortalidad por CaCe a nivel mundial.

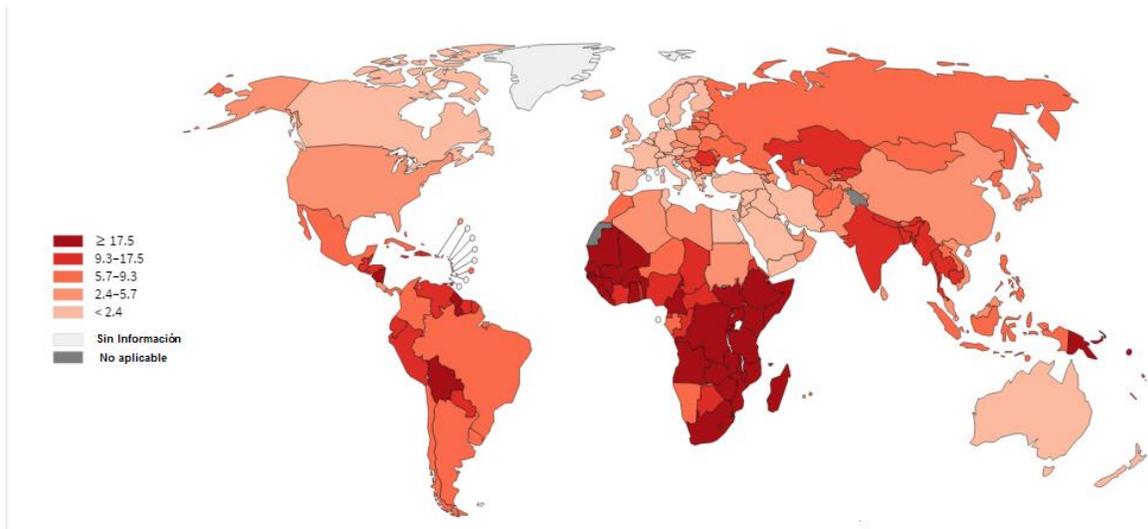


Figura 1. Mortalidad por cáncer cervical en el mundo. Tomada de GLOBOCAN 2012.

2.1.1.2 Cáncer cervical en América Latina

El cáncer cervical afecta principalmente a los países en subdesarrollo, como los de Latinoamérica. Estadísticas reportadas en 2012 por la OMS muestran 83,195 nuevos casos de CaCe anualmente en las Américas, convirtiéndose en el cuarto cáncer más común entre las mujeres de este continente, y el segundo más común entre la población femenina en edades tempranas [Bruni et al., 2015]. En Centro América ocurre un panorama muy similar al que se presenta en el resto del continente, el CaCe ocupa el segundo lugar entre las mujeres centroamericanas con un porcentaje de incidencia del 17% [GLOBOCAN, 2012].

2.1.1.3 Cáncer cervical en Honduras

Según datos publicados en 2016 por El Instituto Nacional de Estadística (INE), se estima que la población femenina mayor de 15 años en Honduras está constituida con 3.20 millones de mujeres. En el año 2012 se contabilizaron 991 nuevos casos

de cáncer cervical y 417 muertes a causa de este padecimiento; por lo que, el CaCe sigue representando la primera causa de muerte entre nuestras mujeres [GLOBOCAN, 2012].

Varios estudios realizados en el país se han destinado a evaluar la prevalencia de la infección por VPH y su asociación con el desarrollo de cáncer cervical. Estudios de casos y controles han determinado la presencia de VPH de alto riesgo en casi el 95% de los casos de cáncer de cuello uterino en donde la infección con VPH 16 se detectó en el 46% de los casos y el tipo 18 en un menor porcentaje [Ferrera et al., 1999]. Estudios similares realizados por Tábor y colaboradores, 2008, en el país, encontraron una asociación entre el incremento de las lesiones intraepiteliales cervicales en mujeres hondureñas en relación a un aumento de la carga viral del VPH 16 [Tábor et al., 2008].

Al igual que otros países en el mundo, los estudios realizados en Honduras han demostrado que el VPH genotipo 16 es el más frecuentemente asociado a lesiones de alto grado y CaCe. Estas investigaciones han destacado que la educación es un factor muy importante para reducir el riesgo de cáncer de cuello uterino; además, la pobreza, el bajo nivel socio-económico, el comportamiento sexual y la falta de servicios de detección de calidad juegan un papel importante en la incidencia y mortalidad por CaCe en el país [Ferrera et al., 2000; Tábor et al., 2010; Velema et al., 2002].

El cáncer cervical continua siendo uno de los principales problemas de salud pública en el país; sin embargo, el pobre éxito de los programas de prevención del CaCe en los últimos años ha generado la búsqueda de nuevas estrategias de

prevención como la incorporación de la vacuna contra el VPH en el sistema de salud en el 2016 [Aguilara et al., 2015].

2.1.2 Histología y clasificación

Histológicamente, entre 90 y 95% de los cánceres invasores del cuello uterino son tumores de células escamosas; mientras que el adenocarcinoma constituye menos del 5% de los cánceres del cuello uterino [IARC, 2003].

El cuello uterino es la porción inferior estrecha del útero, parte de la cual se proyecta dentro de la vagina. El cáncer cervical se origina en el cuello uterino; la parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérvix, el cual une la vagina y la cavidad uterina; y la parte próxima a la vagina es el exocérvix (o ectocérvix) (Figura 2). Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (en el exocérvix) y las células glandulares (en el endocérvix) que se unen en la denominada zona de transformación; en esta zona el epitelio cilíndrico ha sido reemplazado o está siendo reemplazado, formando un nuevo epitelio conocido como unión escamo-columnar (UEC) ubicado en el orificio cervical externo. La zona de transformación es el área en donde ocurre el 90% de los cambios anormales del cérvix, siendo un sitio muy vulnerable a infecciones por VPH; su forma varía según edad, embarazo, u otros. Es por esta razón que las pruebas de tamizaje como la citología deben enfocarse a examinar esta zona [ACS, 2014; Ovalle et al., 2015].

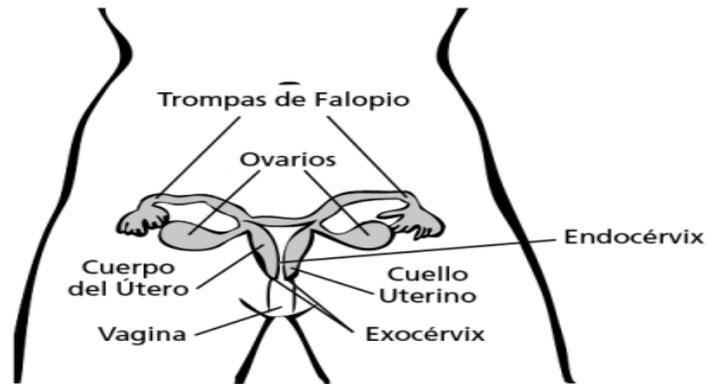


Figura 2. Órganos genitales femeninos internos. Tomada de American Cancer Society 2015.

En los cánceres de cuello uterino las células no se tornan en cáncer de repente, sino que las células normales se transforman gradualmente en cambios precancerosos, los cuales se convierten en cáncer. A lo largo de la historia se han utilizado muchos términos para referirse a las lesiones precancerosas o cáncer. El sistema Bethesda tiene como objetivo proporcionar una terminología y criterios diagnósticos uniformes para la caracterización de la patología cervical. La clasificación de Bethesda es la más moderna, y divide las lesiones en lesiones intraepiteliales escamosas de alto (LIEAG) o bajo grado (LIEBG). Aquellas anomalías que no corresponden a estas categorías o que se deben a cambios reactivos benignos se clasifican como atipia de células escamosas de significado incierto o ASCUS (“*atypical squamous cell of uncertain significance*” en inglés). Es importante mencionar que aunque este sistema es altamente conocido, no es utilizado en todos los países [Pelea, 2003]. En nuestro país se utiliza la descrita en 1967 por Richart quien introdujo el término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC o “*CIN*” en inglés) con tres grados progresivos [Pelea, 2003]. NIC es una lesión premaligna que puede existir en cualquiera de los tres estadios siguientes: NIC 1

(displasia leve), NIC 2 (displasia moderada) y NIC 3 (displasia severa carcinoma *in situ*). Si no se trata, una NIC 2 o una NIC 3 (conjuntamente denominadas NIC2+) pueden progresar hacia cáncer cervicouterino. Datos de la OMS en 2012 estiman que cada año aproximadamente un 1 a un 2% de las mujeres en el mundo presentan una lesión de tipo NIC 2+ (Neoplasia intraepitelial cervicouterina de alto grado). Estas lesiones pueden ser detectadas como sospecha en la citología convencional y confirmadas posteriormente mediante un examen histológico del material cervical (biopsia).

Tabla 1. Terminología citológica

Terminología de displasia.	Terminología original de NIC	Terminología modificada de NIC	Terminología Sistema de Bethesda
			-Dentro de los límites de normalidad
Normal	Normal	Normal	-Alteraciones celulares benignas -ASCUS
Atipia	-Atipia coliocítica		
	-Alteraciones epiteliales,	NIC de bajo grado	LSIL
	-Condiloma plano		
Displasia leve	NIC 1	NIC de bajo grado	LIEBG
Displasia moderada	NIC 2	NIC de alto grado	LIEAG
Displasia grave	NIC 3	NIC de alto grado	LIEAG
Carcinoma in situ	NIC 3	NIC de alto grado	LIEAG
Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo

2.2 Virus del Papiloma Humano

2.2.1 Clasificación y diversidad genética

El VPH es un agente infeccioso epiteliotrópico semejante en su estructura superficial a los poliomavirus, por lo que anteriormente era clasificado en la Familia *Papovaviridae*, pero en la actualidad ha sido clasificado dentro de la familia *Papillomaviridae* [Regenmortel et al., 2000], ya que se demostró que ambos tipos virales tienen genomas de tamaño distinto, organización genómica completamente diferente, por lo que fueron reconocidas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV) como dos familias distintas [Villiers et al., 2004].

Los VPH se denominan con el término "tipo" de los cuales se han aislado e identificado más de 189; 120 en muestras humanas y más de 60 en animales (reptiles, aves y otros mamíferos) [Villiers et al., 2004]. Su genoma está constituido por 8 genes, uno de ellos codifica por la proteína L1 que será descrita más adelante. El estatus taxonómico de los tipos, subtipos y variantes de los papilomavirus se determina por el porcentaje de variación en el gen L1. Por consiguiente, al observar una diferencia entre 2% a 10% en las secuencias de la región L1 entre dos tipos virales, se consideran dos tipos de VPH distintos; si la diferencia es menor al 2% son considerados subtipos o variantes [Bernard et al., 2010]. En vista de estas variaciones, los VPH se han clasificado en 16 géneros, de los cuales los que infectan al ser humano se agrupan en 5: *Alphapapillomavirus* (lesiones cutáneas y mucosas en humanos y primates), *Betapapillomavirus* (lesiones cutáneas), *Gammapapillomavirus* (lesiones cutáneas), *Mupapillomavirus*

(lesiones cutáneas), *Nupapillomavirus* (lesiones cutáneas malignas y benignas) [Klug et al., 2008; Ríos J, 2010; Villiers et al., 2004].

Por otra parte, los VPH se han clasificado de acuerdo a su potencial oncogénico, dividiéndolos en dos grupos; los de alto riesgo, que se asocian con el desarrollo de lesiones cervicales y CaCe, abarcan 13 tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68; de estos tipos el VPH 16 y el 18 son, sin duda, los más importantes dado que se encuentran en el 70% de los casos vinculados al cáncer cervicouterino [Ibeanu, 2011; Zur-Hausen, 1996]. El segundo grupo está conformado por los VPH de bajo riesgo oncológico, asociados mayormente a verrugas genitales, entre los que se encuentran los genotipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 y 81 [Longworth and Laimins, 2014], siendo los tipo 6 y 11 los más comunes.

Aun cuando la infección por el VPH es muy frecuente, en el 90% de los casos el sistema inmune logra resolver la infección, persistiendo solo en un pequeño porcentaje que evolucionan a lesiones precancerosas y posteriormente a cáncer [Martínez et al., 2004]. Este hecho apoya la hipótesis de que la infección por VPH puede iniciar una lesión, pero no necesariamente promoverla a un estadio de carcinoma cervical. A pesar de ello, ciertas influencias oncogénicas dadas por otros factores o cofactores, intervendrían en el proceso de transformación y establecimiento de la malignidad; de este modo, la persistencia de la infección sería una condición necesaria, pero no suficiente, para el desarrollo de lesiones intraepiteliales cervicales.

2.2.2 Variantes del VPH tipo 16

El virus del papiloma humano es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de CaCe, identificándose al tipo VPH 16 como el más prevalente [Takashi et al., 1995; Zur-Hausen, 1996]. Diversos estudios se han realizado en todo el mundo en relación a este tipo viral, investigando el papel de sus genes en el desarrollo de lesiones del cuello uterino y CaCe [Alfaro et al., 2016; Berumen et al., 2001; Qmichou et al., 2013; Sun et al., 2013]; a través de la secuenciación de las regiones L1, E6 y LCR (temprana, tardía y la región de control largo). En consecuencia, se han distinguido 4 linajes del VPH 16: europeos/asiáticos, africanos 1, africanos 2 y norteamericano/asiático-americano [Alfaro et al., 2016; Cornet et al., 2012; Guardado-Estrada et al., 2014] (Tabla 2).

Tabla 2. Variantes del Virus del Papiloma Humano 16.

Linaje	Sublinaje	Nomenclatura
Europeos/Asiáticos (EAS)	Europeo (EUR)	A1/2
	Asiático (As)	A3
Africanos 1 (AFR1)	AF1a	B1
	AF1b	B2
Africanos 2 (AFR2)	AFR2a	C1
	AFR2b	C2
Norteamericano / Asiático-americano (NA/AA).	NA	D1
	AA1 D2	D2
	AA2	D3

La distribución de las variantes del VPH 16 se vincula a regiones geográficas específicas alrededor del mundo, distinguiéndose variantes distintas en cada continente. Se ha estudiado la asociación de las variantes del VPH 16 con el desarrollo de lesiones tipo NIC 2+, comprobando que algunas variantes son más carcinogénicas que otras [Alfaro et al., 2016; Cornet et al., 2012; Guardado-Estrada et al., 2014]. Según Alfaro y colaboradores, se ha encontrado en mujeres jóvenes la presencia de variantes como la NA/AA del VPH 16 con formas agresivas del cáncer cervical, mostrando un rápido desarrollo a cáncer cervical [Alfaro et al., 2016; Berumen et al., 2001].

En la actualidad las estrategias de prevención del CaCe se enfocan en la vacunación contra el VPH, destacando la importancia de identificar las variantes específicas del VPH 16 circulantes en las distintas regiones geográficas [Cornet et al., 2012].

2.2.3 Genoma del Virus del Papiloma Humano

El tamaño del virión es de aproximadamente 55 nm de diámetro. El genoma viral está formado por una molécula de ADN circular de doble hebra que se compone de aproximadamente 8,000 pares de bases [Ríos J, 2010]. El genoma consta de tres regiones principales: temprana, tardía y la región de control largo (LCR) o región no codificante (NCR). La región temprana ocupa el 50% del genoma desde el extremo 5' y contiene 6 marcos abiertos de lectura (E1, E2, E4, E5, E6, E7); cada uno de estos marcos cumple una función específica (Tabla 3), y es la región encargada de la replicación del ADN viral y de la transformación celular. La región tardía ocupa el 40% del genoma, tiene dos marcos abiertos de lectura (L1 y L2) y

codifica las proteínas de la cápside viral. La región LCR ocupa el 10% del genoma, no codifica proteínas, pero contiene el origen de replicación del promotor de los genes E6 y E7, potenciadores, silenciadores y múltiples sitios de unión de factores de transcripción. [Ríos J, 2010; Zur-Hausen, 1996].

Tabla 3. Funciones principales de cada uno de los genes

Gen	Función	Gen	Función
E1	Modulador de la replicación de ADN	L1	Mantenimiento de la proteína mayor de la cápside
E2	Regulación de la transcripción viral	L2	Mantenimiento de la proteína menor de la cápside
E3	Desconocida	E6	Proliferación y transformación celular, ligada a p53
E4	Disrupción de la citoqueratina en células escamosas	E7	Proliferación y transformación celular, activación de la transcripción, ligada a gen Rb
E5	Ligada a transformación celular y receptores de factores de crecimiento		

2.2.4 Proteínas claves del VPH en la carcinogénesis cervical

Los Papilomavirus de alto riesgo son potentes inductores de la proliferación celular y pueden inmortalizar un gran número de tipos celulares humanos. El mecanismo de acción del VPH de alto riesgo en el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales mencionadas anteriormente, las proteínas E6 y E7 [Pastuszak-Lewandoska et al., 2014], las cuáles se han encontrado presentes en mayor proporción en la mayoría de los carcinomas cervicales [Cruz and Diego, 2005]. E6 y E7 codifican proteínas

multifuncionales que controlan la proliferación y cuya expresión es diferente entre tipos de VPH oncogénicos y no oncogénicos [Ghittoni et al., 2010; Pastuszek-Lewandoska et al., 2014]. Por ejemplo, solo la E6 de tipos de VPH oncogénicos tiene la capacidad de unirse con el producto génico del gen supresor de tumor p53 [Pol and Klingelutz, 2013] (proteína activada por la fosforilación de proteínas sensibles al daño del ADN), formando un complejo E6-p53 que es blanco posterior para la degradación, y provoca fallos en los mecanismos de proliferación y apoptosis, siendo ésta una de las vías por medio de las que E6 genera el desarrollo de la carcinogénesis cervical [Ghittoni et al., 2010; Münger and Howley, 2002].

2.2.4.1 Proteína E7

La proteína E7 es responsable de la transformación celular y estimulación de síntesis de ADN en la célula infectada y se localiza principalmente en el núcleo. La proteína E7 de alto riesgo, es un pequeño polipéptido de aproximadamente 100 aminoácidos, conformada por tres dominios llamados CD1, CD2 y CD3. Estos dominios conservados, son críticos para las actividades transformantes para cada una de estas oncoproteínas, interactuando con una gran variedad de proteínas celulares (Figura 3), e incluyendo al producto del gen supresor de tumores del retinoblastoma pRb [Romana and Mungerc, 2013]. De acuerdo a Ghittoni y colaboradores, pRb actúa como supresor del crecimiento, al controlar factores de transcripción requeridos para la replicación del ADN; la unión de E7 a pRb favorece la progresión del ciclo celular al igual que su degradación por la vía ubiquitina-proteosoma [Ghittoni et al., 2010; Wang et al., 2001]. La proteína E7 de

los tipos virales 6 y 11 se unen a pRB con una afinidad significativamente menor que las proteínas E7 de los tipos 16 y 18 [Münger K, 2001].

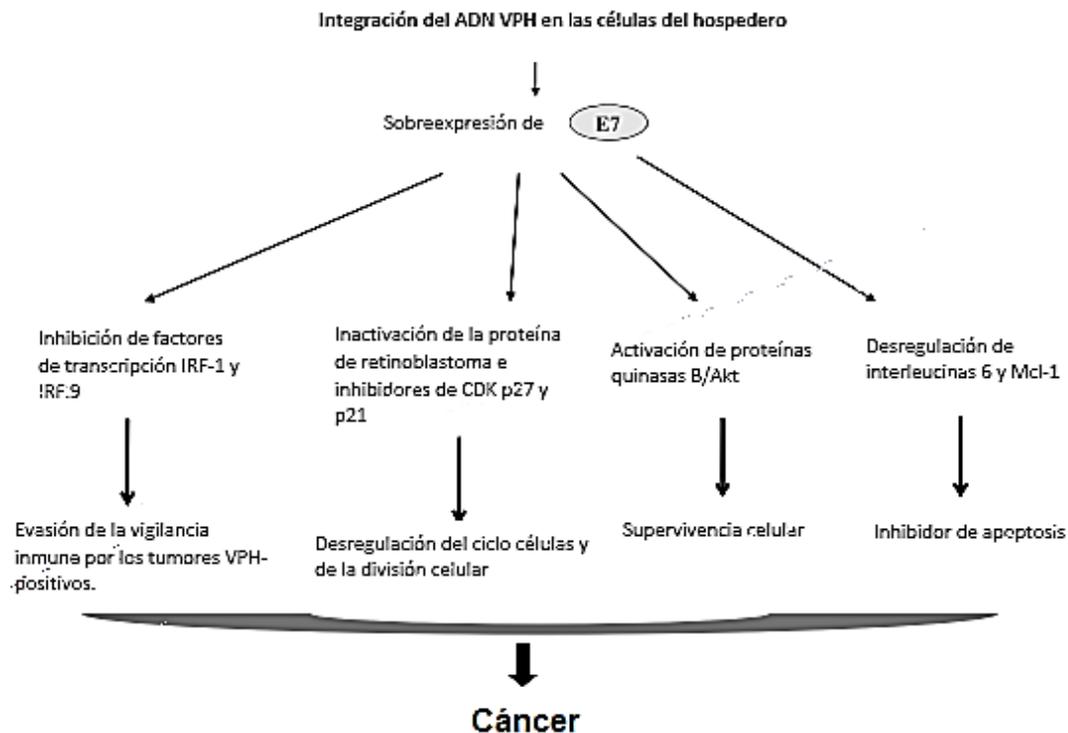


Figura 3. Diferentes vías en las que puede actuar la E7 del VPH de alto riesgo. Modificado de: Niladri, 2009.

2.2.4.2 Proteína E6

E6 es uno de los primeros genes expresados durante la infección, y tiene un rol determinante en la inmortalización celular, realizando múltiples funciones (Tabla 4). La literatura sugiere que la oncoproteína E6 de los tipos de VPH de bajo riesgo se expresa en menor proporción que la de los tipos de VPH de alto riesgo con respecto a la transformación celular y la actividad oncogénica [Ibeanu, 2011]. Por lo tanto, existe una sobreexpresión de la oncoproteína E6 en las células cervicales, precisamente cuando las células cervicales infectadas con VPH sufren

cambios precancerosos o cancerosos. Si bien en la mayoría de los casos se expresa a niveles bajos, en casos raros la expresión de E6 se presenta de forma elevada, resultando una transformación de la actividad celular [Mantovani and Banks, 2009]. La expresión elevada de E6 es resultado de un "accidente molecular", teniendo la capacidad de unirse a un sinnúmero de blancos celulares, lo que le permite bloquear la apoptosis, regular la transcripción viral, abatir la diferenciación celular y las interacciones célula-célula, e incrementar la inestabilidad cromosómica [Doorslaer and Burk, 2010].

Tabla 4. Funciones de la oncoproteína E6.

Oncoproteína	Funciones
E6	Degradación de p53 Inhibición de la apoptosis Progresión del ciclo celular Transformación celular Desregulación inmune

2.2.4.3 Efecto de E6 sobre la proliferación celular

La proteína E6 puede asociarse con el producto del gen supresor de tumores p53 y marcarlo para su degradación, lo que potencia la progresión del ciclo celular. E6 reduce drásticamente la vida media de p53 a través de la degradación por la vía de la ubiquitina, así como el nivel de proteína en las células infectadas a menos de la mitad del nivel presente en las células normales [Brown et al., 2012; Mantovani and Banks, 2009].

E6 puede inhibir la apoptosis dependiente e independiente de p53, ya que se ha observado que E6 puede interactuar con múltiples proteínas celulares (Figura 4) una de ellas es Bak, una proteína pro-apoptótica que se expresa en altos niveles durante la diferenciación en las capas superiores del epitelio [Jiang and Yue, 2014]. Por otra parte E6 también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación [Doorslaer and Burk, 2010]. Otro mecanismo por el cual la oncoproteína E6 podría estar regulando la apoptosis, es a través de su unión con la proteína pro-apoptótica c-myc, a la cual marca para su degradación induciendo un aumento en la proliferación de las células infectadas. La proteína E6, al igual que muchos oncogenes, aumenta la actividad del promotor del gen VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y por tanto, su transcripción. VEGF es uno de los inductores más importantes en la angiogénesis, un proceso esencial para el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos y un pre-requisito fundamental para la expansión progresiva de los tumores [Lizano-Soberón et al., 2009; Pol and Klingelhutz, 2013]. En contraste con los tipos virales de alto riesgo, las proteínas E6 codificadas por los tipos 6 y 11 de bajo riesgo, se unen a p53 con menor afinidad, no pudiendo mediar su degradación.

Muchas mujeres con resultados positivos de VPH tendrán un resultado normal en biopsia, debido a que presentan un tipo de VPH de alto riesgo, pero sin una transformación celular visible. En consecuencia, debido a que la oncoproteína E6 de VPH de alto riesgo se une e inactiva varias proteínas involucradas en preservar la estructura epitelial, incrementando su capacidad duplicativa y por lo tanto su transformación, su detección se ha convertido en una alternativa atractiva para la

evaluación de un marcador viral de riesgo [Doorslaer and Burk, 2010; Jiang and Yue, 2014; Saavedra A L, 2006].

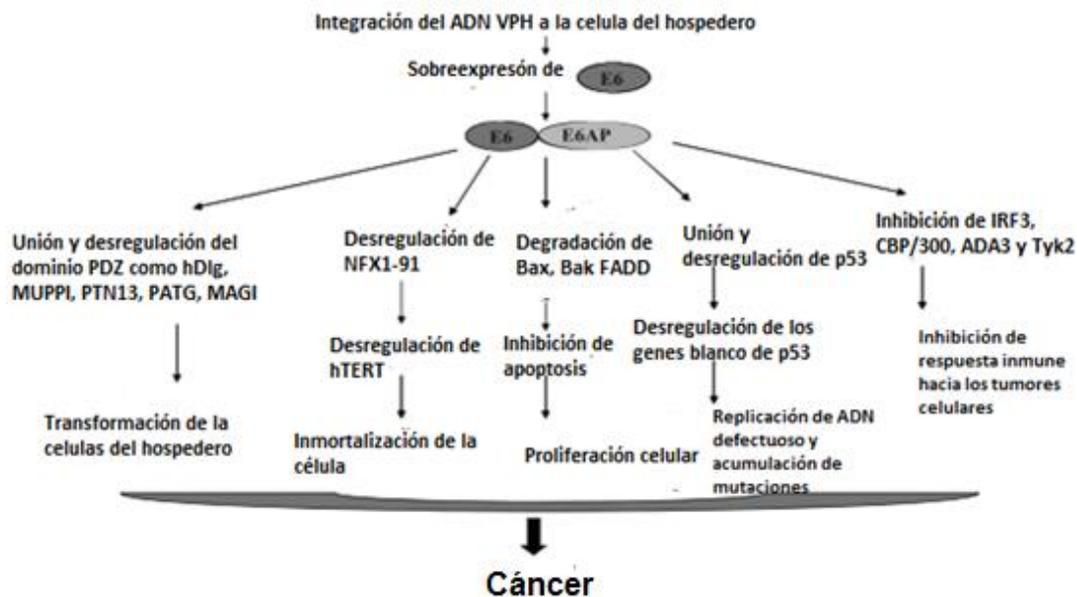


Figura 4. Diferentes mecanismos de acción de la E6 del VPH de alto riesgo. Modificado de: Niladri, 2009.

2.2.5 El ciclo biológico del VPH

Como podemos observar en la Figura 5, el ciclo biológico del Papilomavirus está estrechamente ligado al grado de diferenciación de la piel o mucosas por lo que, para lograr establecerse en el epitelio, este agente debe ganar acceso a las células basales. En el ser humano la infección por VPH se ha evidenciado durante la actividad sexual ya que la principal vía de entrada del virus es por el micro trauma del epitelio genital. Los virus infectan a los queratinocitos de la capa basal del epitelio escamoso estratificado especialmente en la zona de transformación, su genoma viral comienza a establecerse en estas células como un episoma, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la

cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi-terminal para posteriormente realizar la internalización del virus [Rivera et al., 2006]. El mecanismo de entrada del virus al núcleo no es del todo comprendido; en las vesículas endocíticas, antes de la transferencia del virus al citosol, ocurre el desnudamiento del mismo con la separación de la proteína L1 del genoma. La proteína L2 es la responsable del escape del genoma viral de la vesícula endocítica y entra con el genoma al núcleo. La expresión y replicación del virus ocurre de forma regulada por el grado de diferenciación de la célula infectada. Las proteínas E1 y E2 reclutan proteínas celulares que median la replicación del ADN viral y regulan la expresión genética viral; E2 también cumple el papel de reprimir la actividad del promotor de E6 y de E7. Esta función represora se pierde cuando el ADN viral se integra al genoma celular porque ocurre una alteración estructural del marco abierto de lectura de E2 [Ríos J, 2010; Woodman et al., 2007], generando un aumento de la replicación celular, siendo E6 y E7 las responsables de este evento.

En neoplasias cervicales intraepiteliales y aún más frecuentemente en cáncer, el VPH se encuentra integrado en los cromosomas del hospedero. Las células basales que están en constante proliferación migran a los estratos parabasal y espinoso, generando la amplificación de la expresión de genes virales tempranos a través de la región no codificante (URR), los cuales permiten producir ADN a cientos de copias por célula; esta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase vegetante, proliferante o productiva [Woodman et al., 2007].

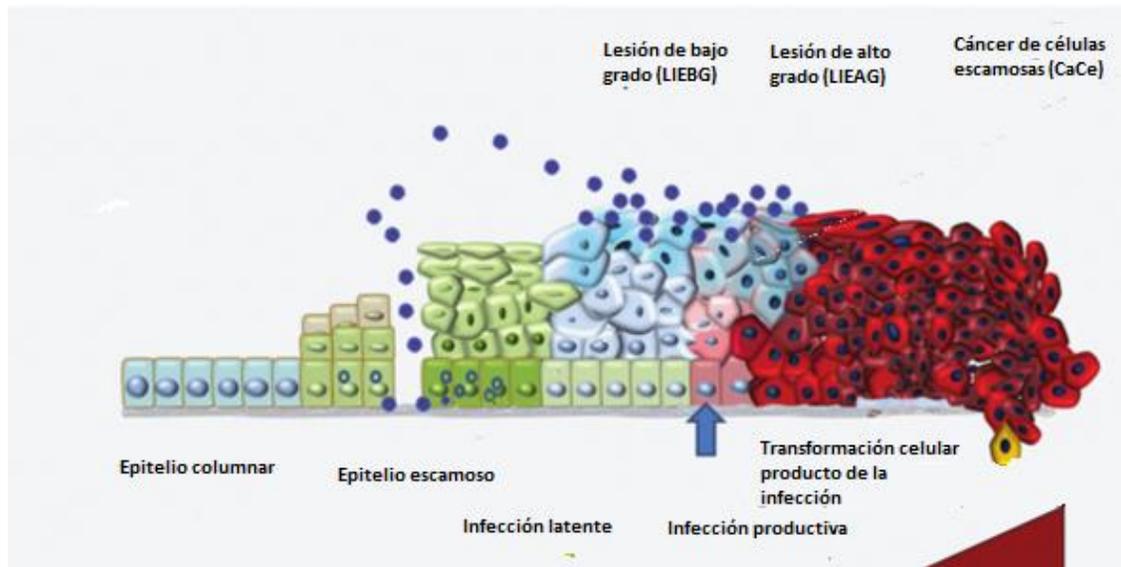


Figura 5. Biología de la infección por el VPH. Modificado de Bergeron, 2015.

2.3 Patología

Según el tipo de VPH que causa la infección, se pueden desarrollar diferentes tipos de manifestaciones clínicas incluyendo aquellas que son producidas por los tipos de bajo riesgo, las cuales se detallan en la Tabla 5. Sin embargo, la infección con el VPH es de evolución lenta generando lesiones de bajo grado, luego de alto grado y finalmente puede progresar a cáncer cervical, tal como se observa en la Figura 6. Durante la infección por el VPH, en las capas superiores del epitelio (la zona media y zona superficial) el genoma viral se replica aún más, y se expresan los genes tardíos L1 y L2. Las proteínas L1 y L2 encapsulan los genomas virales para formar viriones en el núcleo, como consecuencia el virus puede iniciar una nueva infección [Woodman et al., 2007]. Cada una de las lesiones precursoras no invasivas puede seguir cualquiera de las siguientes rutas: regresión, persistencia, progresión al siguiente paso en la secuencia de la displasia hacia el carcinoma *in situ* o desarrollo de cáncer invasivo de células escamosas. En las lesiones

intraepiteliales de bajo grado se presenta la replicación viral en fase productiva. Se desconoce el porcentaje de lesiones de alto grado que progresarán a neoplasia intraepitelial cervical (NIC). La progresión de las lesiones no tratadas y el cáncer se asocia con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del hospedero; como consecuencia, se da la transformación neoplásica gracias a que se inhibe la función normal de las proteínas antitumorales p53 y Rb [Woodman et al., 2007]. Un factor importante en la progresión parece ser que la mayoría de las células tumorales son genéticamente menos estables que las células normales.

Tabla 5. Enfermedades asociadas por el VPH.

Grupo clínico patológico	Tipos virales	Lesión producida
Grupo cutáneo	1, 4	Verrugas plantares
	2, 26, 28, 29, 38, 49, 57, 60, 63, 65.	Verrugas vulgares
	3, 10, 27	Verruga plana
	7	Condiloma de Butcher
	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 25, 36, 37, 46, 50	Lesiones maculares
Grupo mucosotrópico	13, 32	Hiperplasia epitelial focal (Enfermedad de Heck)
	6, 11	LIEBG, Condiloma acuminado, Papilomas laríngeo y conjuntival
	42, 44, 53, 55, 62, 66	Principalmente LIEBG
	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	LIEBG, LIEAG, carcinoma escamoso invasor
	18, 39, 45, 59, 68	LIEBG, LIEAG, carcinomas escamoso y glandular

Tomado de Villareal y colaboradores, 2010.

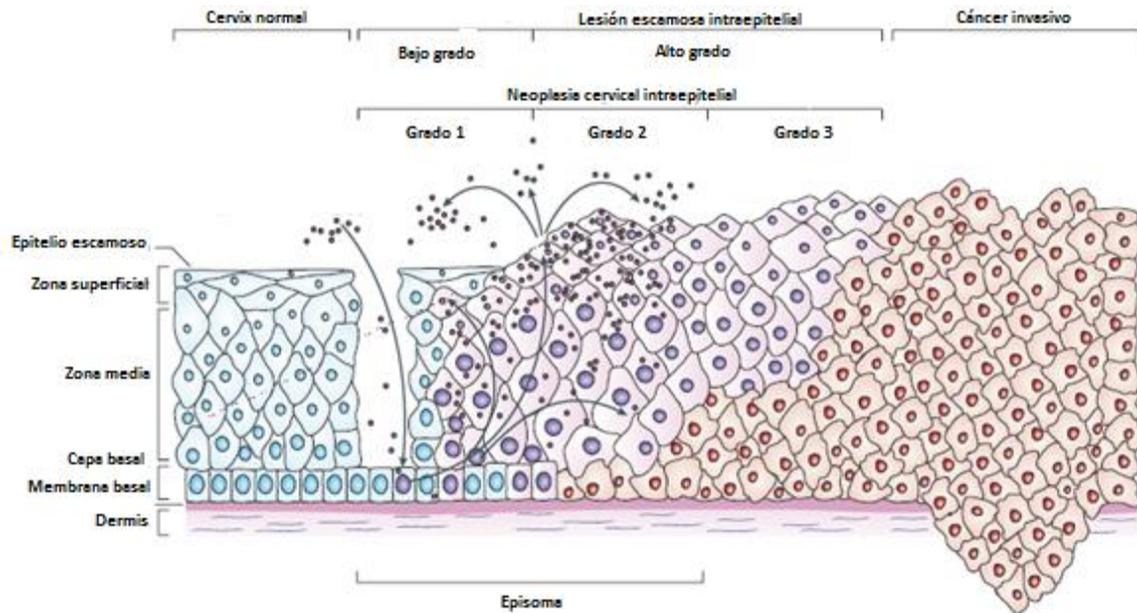


Figura 6. Progresión del cáncer cervical por el VPH. Modificado de Woodman y colaboradores, 2007.

2.4 Polimorfismos de nucleótido simple, cáncer cervical y VPH

Un Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) se define como un locus genómico (posición genética) donde existen dos o más bases nucleotídicas alternativas con frecuencias apreciables en la población ($> 1\%$) [Risch, 2000]. Desde hace unos años, los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms en inglés) han comenzado a ser intensamente estudiados con el objetivo de dilucidar las bases genéticas de enfermedades con componente multifactorial.

Considerando que los carcinomas cervicales carentes de VPH son extremadamente raros, se ha establecido que el virus es el responsable de la mayoría de los tumores cervicales [Zhao et al., 2014]. Sin embargo, también se ha demostrado que gran cantidad de infecciones por VPH son de carácter transitorio,

indicando que la mayoría de las mujeres son capaces de resolver la infección de forma satisfactoria [Bruni et al., 2015]. La habilidad de una persona para resolver una infección está ciertamente influenciada por factores externos y por factores inherentes al hospedero, lo que implica que muchas de las fases del desarrollo tumoral pueden estar afectadas por el componente genético [Risch, 2000], es decir que el genotipo de una persona determinaría directamente la probabilidad de exposición al VPH. Ciertos genotipos podrían otorgar predisposición al desarrollo de cáncer cervical independientemente de la infección, o podrían existir combinaciones genéticas que otorguen resistencia a la misma.

2.4.1 Polimorfismos de nucleótido simple y genes reguladores del ciclo celular

En la carcinogénesis, la regulación del paso a través de G1 es un evento esencial en el desarrollo de un cáncer. En el caso de una infección por los tipos VPH de alto riesgo ocurre una interrupción de este control por la degradación de p53 y la inactivación de Rb por la acción de las oncoproteínas E6 y E7 respectivamente, tal como se mencionó anteriormente [Mantovani and Banks, 2009].

El análisis de tumores humanos ha revelado que p53 es uno de los genes comúnmente mutados; el polimorfismo del gen p53 sufre variantes ya que la forma p53Arg y p53Pro poseen susceptibilidades diferenciales a la inactivación por E6 [Münger and Howley, 2002].

La proteína p21, por otra parte, es uno de los efectores directos en el bloqueo de G1 mediado por la proteína p53. Su principal característica está dada por su

habilidad de unirse e inhibir ciertos complejos quinasa dependiente de ciclina [Lizano-Soberón et al., 2009; Münger and Howley, 2002]. Por lo tanto, ciertos polimorfismos en este gen podrían ser cruciales en el desarrollo del cáncer cervical [Roh et al., 2001]. Es probable que la variabilidad genética inter-individual de las proteínas de la vía Rb también se encuentren involucradas diferencialmente en los fenómenos de transformación celular inducida por VPH.

A medida que los hallazgos científicos señalan nuevas asociaciones de proteínas virales con proteínas celulares, la incertidumbre aumenta, debido a las complicadas redes de interacciones que se demuestran. Los esfuerzos futuros deberán encaminarse a comprender la importancia de estas interacciones en el desarrollo del cáncer cérvico uterino.

2.5 Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores están agrupados en 2 familias. La primera está integrada por los proto-oncogenes, los cuales dirigen la producción de proteínas como ciclinas, factores de crecimiento, receptores, y otros que estimulan la proliferación celular. Cuando éstos mutan se transforman en oncogenes, los cuales son capaces de generar la multiplicación celular. La segunda familia está integrada por los genes supresores de tumores también conocidos como genes supresores, que en el organismo sano controlan la proliferación celular. Ellos por tanto, son reguladores negativos de crecimiento y cuando no están presentes en la célula o se encuentran inactivos a causa de mutaciones, las células dejan de crecer normalmente y adquieren propiedades proliferativas anormales, características de las células tumorales [Hernández and Menéndez, 2001].

Los diferentes genes supresores de tumores que regulan la reproducción celular pierden esta habilidad cuando están mutados, y no responden ante la activación de los oncogenes virales, al no generarse un control en la reproducción, como consecuencia se desarrolla el tumor. Entre algunos de los genes supresores de tumores podemos mencionar a p53, Rb, BRCA1, BRCA2, APC, p16^{INK4a}, etc. [Hernández and Menéndez, 2001; Münger and Howley, 2002].

2.5.1 El gen supresor de tumores p53

El gen p53 se encuentra mutado en el 50% de todos los tipos de cáncer humanos, constituyendo el blanco génico más alterado. Una de sus principales funciones radica en detectar y restaurar el control celular cuando el material genético de la célula es dañado o si el sistema que regula el control celular se altera; sin embargo, si el daño es menor, p53 detiene la división celular y activa los genes reparadores del ADN. A diferencia de cuando el daño es irreparable, por lo que, pondría en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis o muerte celular programada [Hernández and Menéndez, 2001; Münger and Howley, 2002]. No obstante, cuando sufre una mutación, su función se inactiva; como consecuencia, la célula no es eliminada mediante apoptosis y los daños no se reparan resultando en la generación del proceso tumoral [Hernández and Menéndez, 2001; Yi et al., 2013].

Estudios han demostrado que su inactivación por parte de la oncoproteína E6 del VPH podría resultar en la acumulación de lesiones en el ADN que contribuirían a la progresión tumoral [Yi et al., 2013].

2.5.2. El gen pRb

Fue el primer gen en el que se descubrió alguna relación con el cáncer y se localiza en el cromosoma 13, banda q14. Cuando ocurre daño en el ADN, la pRb detiene la replicación celular, uniéndose al factor de transcripción E2F, por lo que detiene la progresión del ciclo celular. La actividad de pRB es dependiente de fosforilación/defosforilación, de manera que quinasas y ciclinas que activen su fosforilación van a inhibir su función, mientras que los que inducen su defosforilación van a favorecer su acción de bloqueo del ciclo celular [Ghittoni et al., 2010]. Al igual que en los otros genes involucrados en el control celular, si se produce una mutación en el gen Rb se favorecerá la proliferación incontrolada de la célula. No sólo la mutación provoca este efecto, sino que en presencia de infección viral por VPH, la célula continuará proliferando de manera incontrolada con un ADN alterado produciendo el desarrollo de cáncer [Grillo-Ardila et al., 2008].

2.5.3 El gen p16^{INK4a}

La proteína p16^{INK4a}, codificada por el gen supresor CDKN2A, es una proteína de las células humanas que actúa como inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (cdk). Su mecanismo de acción consiste en la desaceleración del ciclo celular mediante la inactivación de la función de los complejos cdk4- y cdk6-ciclina D [Delgado et al., 2014]. Estos complejos regulan el punto de control de la fase G1 del ciclo celular mediante la fosforilación y la subsiguiente inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRb), lo cual libera el factor de transcripción E2F y permite a la célula entrar en la fase S. La proteína p16^{INK4a} corresponde al

elemento celular resultante del aumento en la expresión de la oncoproteína viral E7 que altera a pRb, el cual es un regulador celular clave puesto que durante la carcinogénesis la proteína pRb se mantiene inactivada al unirse a la proteína E7 del VPH. Se ha demostrado la existencia de una correlación recíproca entre pRb y p16^{INK4a}, razón por la cual existe una fuerte sobreexpresión de p16^{INK4a} tanto en los carcinomas como en las lesiones premalignas del cérvix uterino, relacionados todos ellos con la infección por VPH [Delgado et al., 2014; Grillo-Ardila et al., 2008; Münger and Howley, 2002]. La sobreexpresión y la acumulación celular de p16^{INK4a} logra ser un marcador específico de lesiones precancerosas que puede detectarse mediante técnicas de inmunohistoquímica de muestras histológicas o citológicas o mediante técnicas de inmunoensayos ELISA [Sahasrabudde et al., 2011].

2.5.4 Utilidad clínica de p16^{INK4a} en la clasificación de lesiones cervicales

En el año 2012 el Colegio de Patólogos Americanos y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical publicaron la última recomendación referente a la nomenclatura a utilizar en los reportes de lesiones cervicales: lesiones intraepiteliales escamosas de alto (LIAG) o bajo grado (LIBG) [Darragh et al., 2012]. Aquellas anomalías que no corresponden a estas categorías o que se deben a cambios reactivos benignos se clasifican como atipia de células escamosas de significado incierto o ASCUS. Simultáneamente recomiendan expandir el uso del biomarcador p16^{INK4a} para clasificar de forma inequívoca las lesiones cervicales [Darragh et al., 2012; Maniar et al., 2015].

La detección de la proteína p16^{INK4a} ha sido propuesta como un marcador biológico para utilizarlo en conjunto con la citología o con pruebas que detecten el ADN del VPH, permitiendo identificar de forma indudable las células con cambios displásicos o malignos inducido por VPH, mostrando una alta sensibilidad y moderada especificidad en la clasificación de lesiones de alto grado y bajo grado [Yu et al., 2016; Zhang et al., 2015]. Con su utilización se mejora la especificidad diagnóstica y se solucionan los problemas existentes de variabilidad entre observador, ya que usualmente al analizar los resultados emitidos por los patólogos se observa que existen discordancias al momento de reportar lesiones menores como NIC 1 y NIC 2, y una gran similitud en el diagnóstico de biopsias negativas, NIC 3 y CaCe. En la Figura 7 se visualiza la interpretación de la prueba; una coloración café fuerte y difusa se considera positivo, por el contrario coloraciones parcheadas o ausencia del color café se interpreta como negativo [Maniar et al., 2015].

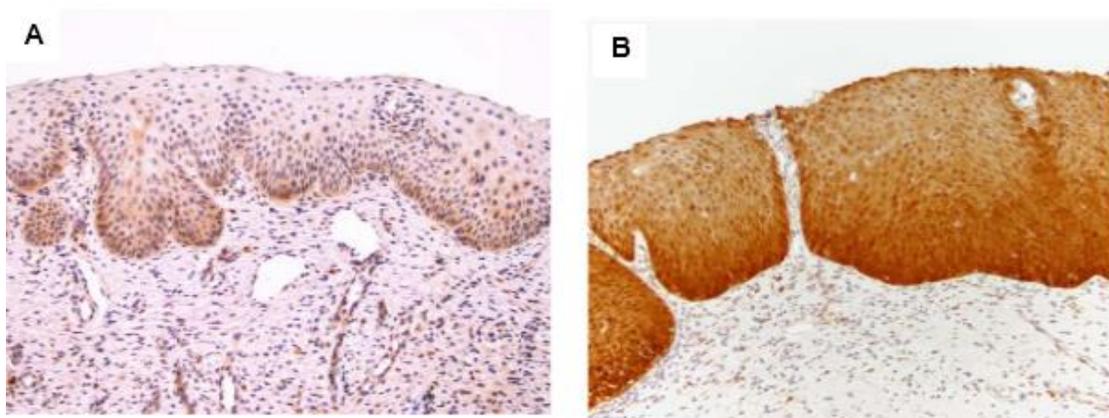


Figura 7 A. Tinción de inmunohistoquímica no difusa de p16^{INK4a} en biopsia de cuello uterino argumentando un resultado de LSIL **B.** Tinción de inmunohistoquímica fuerte y difusa para p16^{INK4a} en biopsia de cuello uterino confirmando diagnóstico HSIL. (Modificado de Kruti, 2015).

2.6 Factores de riesgo

El VPH es detectado en un amplio número de mujeres sanas y, sin embargo, sólo una pequeña fracción de las mujeres infectadas desarrollará ulteriormente un cáncer cervical. Esto indica que en el proceso carcinogénico deben intervenir otros cofactores importantes, además del VPH. Son muchos los factores de riesgo que la literatura menciona; entre ellos, agentes ambientales tales como el humo del tabaco, los anticonceptivos hormonales, el régimen alimentario y diversos microorganismos infecciosos como posibles cofactores del VPH en la carcinogénesis cervical [ACS, 2015].

Entre los factores de riesgo que se han estudiado y se han asociado al desarrollo de patología cervical tenemos:

- Conducta sexual: Aquellas mujeres con historia de múltiples parejas sexuales tienen mayor probabilidad de infectarse con VPH.
- Inicio temprano de la actividad sexual: Se ha demostrado también que en la adolescencia los tejidos cervicouterinos son más susceptibles a la acción de los carcinógenos. El riesgo de lesión intraepitelial cuando el primer coito se tiene a los 17 años o menos es 2,4 veces mayor que cuando se tiene después de los 21 años [Martínez et al., 2004].
- Partos múltiples: Se ha establecido que mujeres con dos o más hijos tienen un riesgo 80% mayor de presentar lesión intraepitelial; luego de cuatro hijos dicho riesgo se triplica, después de siete se cuadruplica y con doce aumenta en cinco veces. Algunos estudios han indicado que los cambios hormonales durante el embarazo podrían causar que las mujeres sean más susceptibles a una infección con VPH o crecimiento tumoral. También se

crea que las mujeres embarazadas podrían tener sistemas inmunológicos más débiles, lo que permite la infección con VPH y crecimiento tumoral [ACS, 2015].

- Tabaquismo: Cuando una persona fuma se expone a muchas sustancias químicas cancerígenas que afectan otros órganos, además de los pulmones. Estas sustancias dañinas son absorbidas a través de los pulmones y conducidas al torrente sanguíneo por todo el cuerpo. Estudios sugieren que las fumadoras tienen doble riesgo de lesión intraepitelial con respecto a las no fumadoras [Martínez et al., 2004]. En algunas investigaciones se ha detectado subproductos del tabaco en la mucosidad cervical de mujeres fumadoras. Los investigadores creen que estas sustancias dañan el ADN de las células en el cuello uterino y pueden contribuir al origen del cáncer de cérvix [ACS, 2015]. Se ha demostrado la presencia de nicotina, cotinina y otros mutágenos derivados del tabaco, en mujeres fumadoras con lesión intraepitelial, así como la presencia de mutágenos en el moco cervical, algunos a concentraciones muy superiores a las sanguíneas, lo que sugiere un efecto carcinogénico directo [Martínez et al., 2004]. Adicionalmente a lo anterior, está el hecho de que fumar hace que el sistema inmunológico sea menos eficaz en combatir las infecciones con VPH. Otros estudios han encontrado una relación de hasta un 62% entre la exposición del humo de la madera por más de 15 años como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cérvix [Sierra-Torres et al., 2006; Velema J, 2002].

- Uso prolongado de anticonceptivos orales: En un estudio multicéntrico realizado por la IARC, se encontró que el uso de anticonceptivos orales por menos de cinco años no se relacionaba con la presencia de cáncer de cuello uterino; sin embargo, el riesgo aumentó para aquellas mujeres que los usaban entre cinco y diez o más años [Martínez et al., 2004]. La Sociedad Americana Contra el Cáncer opina que una mujer y su médico deben considerar si los beneficios de usar píldoras anticonceptivas superan los riesgos potenciales; en su lugar, una mujer con múltiples parejas sexuales debe usar preservativos para reducir el riesgo de enfermedades de transmisión sexual [ACS, 2015].

Las mujeres que no presentan los factores mencionados, raramente padecen displasias cervicales; por lo que el conocimiento de estos factores brinda información de suma importancia en el enfoque de las medidas de prevención contra el cáncer cervical.

2.7 Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico para la infección por VPH se han ido modernizando con el paso de los años. Actualmente se cuenta con técnicas altamente sensibles dirigidas a la detección temprana de proteínas del VPH, sin dejar a un lado el método común de tamizaje como la citología o Pap. Cada método tiene sus ventajas y desventajas en relación a aspectos como sensibilidad, especificidad, disponibilidad para utilizarlo como método de tamizaje, entre otros.

2.7.1 Estrategias de tamizaje primario

- Examen físico: es un examen simple que consiste en la observación de los genitales, sencillo de realizar y fácilmente aplicable a las poblaciones grandes, es poco sensible ya que no detecta la mayoría de las lesiones cervicales por VPH.
- Citología: Para obtener buenos resultados con la citología es fundamental que la toma de la muestra sea correcta, obteniendo el material directamente de la zona de transformación. La mayoría de los resultados falsos negativos son debido a una incorrecta toma de la muestra. La citología tienen una excelente especificidad (90-95%) pero una baja sensibilidad (40-60%) [McDougall et al., 1986].
- Captura híbrida: Actualmente es el estándar de oro para la detección del VPH en muestras cervicales; presenta una alta sensibilidad (1 pg/ml) y moderada especificidad, lo que hace necesaria la aplicación de una segunda prueba de triaje para las mujeres que resulten VPH positivas. En países donde la citología no ha tenido una buena cobertura o es de difícil acceso, la elección de la segunda prueba dependerá de los recursos disponibles. La prueba de captura es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos mediante la amplificación de la señal y uso de quimioluminiscencia para la detección cualitativa de 13 tipos de alto riesgo de ADN del VPH en muestras cervicales [Almonte et al., 2010].

2.7.2 Estrategias de tamizaje secundario o triaje

- Colposcopia: El estudio colposcópico permite la identificación de características sutiles de los epitelios, inapreciables a simple vista, que son la expresión de cambios patológicos. La colposcopia se ha consolidado como parte fundamental del diagnóstico de las lesiones intraepiteliales y el cáncer inicialmente invasivo. Consiste en la aplicación de ácido acético al 5% en la zona de transformación del cuello uterino; la especificidad depende mucho del colposcopista. Una biopsia dirigida de la zona de transformación, con pinza sacabocados, está indicada en todas las colposcopias anormales con cambios anormales [Obstetricia, 2003].
- Estudio histológico: es esencial para el diagnóstico y clasificación de la displasia.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es la prueba de elección y tipificación del virus. Mediante una extracción de ADN del virus se puede determinar la presencia del VPH en las muestras a analizar, los iniciadores comúnmente van dirigidos a regiones conservadas del genoma del virus como la proteína L1. La presencia del amplímero del VPH específico puede utilizarse posteriormente en otras pruebas como el ensayo de sondas por hibridación reversa (LiPA).

2.8 Prevención

2.8.1 Vacunas

La búsqueda de nuevas estrategias en la prevención y tratamiento del cáncer cervical se ha enfocado en la utilización de terapias fotodinámicas, génicas y el desarrollo de nuevos medicamentos inmunomoduladores.

Uno de los grandes avances en la prevención de CaCe es el desarrollo de vacunas que sean eficaces y eficientes frente al VPH. Según la OMS las vacunas son cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos [OMS, 2016]. Las vacunas pueden tener dos objetivos, uno profiláctico para evitar la infección y otro terapéutico para impedir la progresión de lesiones precursoras existentes. Actualmente, las vacunas profilácticas contra VPH prometen disminuir de forma importante la incidencia del cáncer cervicouterino, provocado por genotipos virales específicos oncogénicos.

La FDA ha aprobado tres vacunas para la prevención del CaCe: Gardasil, Gardasil 9 y Cervarix. Gardasil impide la infección por los tipos 16, 18, 6 y 11, y por este motivo se menciona como una vacuna cuadrivalente; Gardasil 9 en cambio protege contra los mismos tipos y cinco tipos más de alto riesgo (31, 33, 45, 52 y 58) siendo nonavalente; Cervarix solo protege contra los tipos 16 y 18. Todas las vacunas se administran en tejido muscular por tres dosis durante seis meses [Ochoa Carrillo et al., 2015].

La vacuna bivalente protege contra los VPH causantes del 70% de los casos de cáncer de cuello uterino, por otro lado, la vacuna tetravalente, adicional al 70% de

la vacuna bivalente, muestra una eficacia de aproximadamente 90% contra los VPH causantes de las verrugas genitales externas; y finalmente la vacuna nonavalente tiene un 20% adicional de eficacia en comparación con la vacuna tetravalente [Brunia et al., 2015].

En Honduras a partir del año 2016 se incorporó al sistema de salud la vacuna bivalente contra el VPH, como estrategia de prevención debido a lo poco accesible de los sistemas de tamizaje que existen en el país, por medio de estudios costo-beneficio llevados a cabo en el país se evidenció la necesidad y ventajas de su incorporación al sistema de salud [Aguilara et al., 2015].

2.9 Tratamiento

El tratamiento es distinto según el diagnóstico de las diferentes lesiones que las mujeres presenten. Aquellas pacientes con un resultado anormal en la citología y con un diagnóstico de NIC 1 comprobado mediante biopsia por colposcopia se les da un seguimiento ya que en la mayoría de los casos estas lesiones desaparecen espontáneamente, progresando solo un 20% a 40% de estas a una lesión de alto grado [Saavedra A L, 2006]. En las lesiones de alto grado NIC 2 o NIC 3 el tratamiento recomendado es la escisión por medio del asa electro-quirúrgica, resultando muy efectivo para estas lesiones escamosas no invasivas. En los casos de cáncer invasivo se trata con histerectomía (extirpación del útero) o con radioterapia de alta energía (18 MV) [Saavedra A L, 2006]. El propósito de la radioterapia es destruir las células malignas que se encuentran presentes en el cérvix, tejidos para cervicales y nódulos linfáticos regionales. En los casos donde

el cáncer se presenta localmente avanzado es tratado únicamente con radioterapia dirigida al tumor y sitios de esparcimiento.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Objetivo general

- Estimar la eficacia de marcadores de proliferación celular y viral y la eliminación, recurrencia o persistencia del VPH como estrategias de triaje y seguimiento a las mujeres VPH positivas.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de la oncoproteína E6 del virus papiloma humano genotipo 16 y 18 en muestras cervicales de mujeres VPH positivas/negativas sin o con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) histológicamente confirmadas, y su relación con las variantes del VPH 16 presentes en los casos NIC 2+.
2. Determinar en mujeres VPH positivas/negativas la presencia de NIC 2 evaluando el desempeño de la tinción de p16^{INK4a} en biopsias cervicales.
3. Evaluar la persistencia, recurrencia o eliminación de las infecciones por VPH de alto riesgo tipo específico en las mujeres de la cohorte del estudio transversal de tamizaje después de 18 meses de la detección inicial del virus.

3.3 Hipótesis

1. La expresión de la oncoproteína E6 del virus papiloma humano genotipo 16 y 18 es útil para la clasificación (triaje) de las mujeres con lesiones de alto grado o cáncer cervical (NIC 2+).
2. La variante del VPH 16 EAS se encuentra con mayor prevalencia entre las mujeres hondureñas, respecto a la variante NA/AA.
3. La tinción de p16^{INK4a} en biopsias de tejido cervical tiene un buen desempeño para diferenciar entre lesiones de bajo grado (ASCUS/NIC 1) y aquellas de alto grado (NIC 2+).
4. Las mujeres con infecciones persistentes desarrollarían lesiones tipo NIC 2+ en el cuello uterino, a diferencia de las mujeres con infecciones recurrentes.

3.4 Diseño de Investigación

Diseño longitudinal híbrido, de corte transversal.

3.5 Período de estudio

El estudio se llevó a cabo entre los meses de octubre 2015 a septiembre 2016.

3.6 Población de estudio

La población estaba constituida por mujeres entre los 30 y 64 años de edad de dos comunidades distintas:

- Mujeres del área rural pertenecientes a los municipios de Valle de Ángeles, Cantarranas y Santa Lucía, Departamento de Francisco Morazán, Honduras:

- Valle de Ángeles, situado a 30 Km de Tegucigalpa, en dos Centros de Salud (CESAMO) dependientes de la Secretaría de Salud: CESAMO Valle de Ángeles y CESAMO Cerro Grande.
 - Cantarranas, situado a 40 Km de Tegucigalpa, en el CESAMO Cantarranas
 - Santa Lucía, situado a 13 Km de Tegucigalpa, en el CESAMO Santa Lucía.
- Una población formada por 41 mujeres referidas con diagnóstico previo de NIC 2+ y cáncer cervical que asistían al Hospital General San Felipe ubicado en Tegucigalpa, Municipio del Distrito Central, Francisco Morazán.

3.7 Muestra

Debido a las ventajas de emplear una cohorte de mujeres provenientes del estudio multicéntrico ESTAMPA que se encuentra en proceso, y por la facilidad de contar con alícuotas locales de dicho estudio, utilizamos un muestreo no probabilístico por conveniencia, conformado por 264 mujeres incluidas en el estudio. Detallamos a continuación su distribución:

- Para evaluar la expresión de la oncoproteína E6, la muestra utilizada fue de 196 mujeres: una cohorte de 55 mujeres VPH positivas y 100 mujeres VPH negativas procedentes del estudio ESTAMPA (Estudio multicéntrico de tamizaje y triaje usando la prueba del virus del papiloma humano) complementado con 41 mujeres con displasia y cáncer cervical referidas al Hospital General San Felipe.

- En la evaluación diagnóstica de la proteína p16^{INK4a} se incluyeron 20 participantes: 12 mujeres con ASCUS o NIC 1, referidas al Hospital General San Felipe y una cohorte de 8 mujeres con NIC 2, seleccionadas del estudio ESTAMPA y del grupo de mujeres referidas al Hospital General San Felipe.
- En la evaluación de la persistencia, recurrencia o eliminación del VPH después de los 18 meses de seguimiento, la población se conformó de una cohorte de 111 mujeres VPH positivas procedentes del estudio multicéntrico ESTAMPA.

3.8 Selección de los participantes

- Para el reclutamiento de las participantes referidas con NIC 2+ en el HGSF (Hospital General San Felipe) se siguieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

- Resultado anormal en la citología convencional, NIC2 o superior y/o lesiones glandulares.
- Edad entre 30 y 64 años de edad.
- No embarazada.
- Mentalmente competente para entender el consentimiento informado.
- Capaz de comunicarse con el personal del estudio.
- Estar físicamente apta para llevar a cabo la toma de la muestra y examen ginecológico.

Criterios de exclusión:

- Ninguna actividad sexual previa.
- Histerectomía.
- Tratamiento previo de las lesiones precancerosas de cuello uterino en los últimos 6 meses.

La elegibilidad de las pacientes fue evaluada por el médico del estudio, seguida de la asignación del código de identificación; a las mujeres se les dio tiempo de realizar preguntas respecto a su participación y aclarar cualquier duda que les surgiese. Posteriormente procedieron a firmar el consentimiento informado, y responder las encuestas de factores sociodemográficos, factores de riesgo, así como de datos personales.

- En cuanto a las mujeres que se les dio seguimiento a los 18 meses, el criterio de inclusión consistió en que las participantes pertenecieran a la cohorte de mujeres del estudio ESTAMPA, que fuesen VPH positivas, no presentasen lesiones NIC 2+ y sus edades oscilaran entre 30 y 64 años.

3.9 Recolección y tipos de muestras

- Recolección y tipos de muestras de los casos captados en HGSF

Una vez que la paciente proporcionó el consentimiento informado, el médico del estudio procedió a tomar tres muestras de la zona de transformación en el cuello uterino: para la prueba de OncoE6 se utilizó un hisopo dacrón que se introdujo en el criovial previamente rotulado; la segunda muestra para tipificar el VPH se obtuvo con un cepillo Cervex que se agitó en medio de transporte

(10ml de PBS 1X, con 0.05% de mertiolate); finalmente con otro cepillo Cervex se tomó la muestra para la prueba de hC2, agitando el cepillo en el medio de transporte PreservCyt cuyo componente principal es el metanol, que actúa como transporte, preservante y antibacteriano para muestras ginecológicas.

Seguidamente, el colposcopista realizó la evaluación de costumbre, aplicando ácido acético 5%, realizando la toma de biopsia de las zonas acetoblancas siguiendo los procedimientos operativos estándar ya establecidos. Posteriormente, las biopsias fueron enviadas al patólogo del estudio para la identificación de lesiones histológicas (NIC 2 o superiores).

- Recolección y tipos de muestras en visita de seguimiento

Durante la visita de seguimiento y en congruencia con lo establecido en el consentimiento informado, el médico del estudio tomó la muestra de células cervicales con el cepillo Cervex y lo agitó en el medio de transporte PreservCyt.

3.10 Transporte y almacenamiento de las muestras

Las muestras de células cervicales fueron transportadas en hieleras herméticas hacia el Laboratorio de Biología Molecular, en la Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Una vez en el laboratorio, se verificó que las muestras recibidas correspondían con lo indicado en la bitácora diaria de control de muestras y se documentó su recepción, almacenándose a temperatura ambiente, según instrucciones del fabricante.

3.11 Análisis de laboratorio

3.11.1 Extracción de ácidos nucleicos mediante kit comercial QIAGEN

Es una técnica que está diseñada para una rápida purificación de un promedio de 6 µg de ADN total (genómico, viral, mitocondrial) de 200 µl de muestra, en este caso raspado cervical. Para el procedimiento de lisis se utilizó proteinasa K seguido de los procedimientos establecidos por el fabricante; finalmente el ADN se eluyó en agua libre de nucleasas. Alternativamente, se puede almacenar a -20 °C para posterior uso.

3.11.2 Ensayo de hibridación de ácidos nucleicos (hC2 High-Risk HPV DNA Test)

El ensayo de hibridación líquida de ácidos nucleicos detecta la amplificación de la señal mediante uso de quimioluminiscencia en microplaca detectando de forma cualitativa 13 tipos de ADN de alto riesgo del VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) en muestras cervicouterinas. Las muestras que contienen el ADN diana se hibridan con una sonda de ARN específica del VPH. Los híbridos de ADN-ARN resultantes se capturan en la superficie de los pocillos de una microplaca, recubiertos con anticuerpos específicos conjugados con fosfatasa alcalina, específicos para los híbridos de ADN-ARN, y se detectan mediante sustrato quimioluminiscente. La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia del ADN diana en la muestra. La lectura se realizó en un luminómetro y la luz emitida se midió en unidades de luz relativas (RLU). Un valor de corte de 1 pg/ml equivale a 100,000 copias de VPH/ml; se considera un resultado positivo cuando RLU/CO es mayor o igual a 1.

3.11.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para β -globina

Consiste en un PCR convencional que detecta el gen de β -globina para evaluar la calidad del ADN extraído y excluir así las muestras con ADN degradado o no amplificable. El ADN amplificado se analizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

3.11.4 Genotipificación del VPH por medio de LiPA (Genotyping kit HPV GP, versión 2)

La prueba se realiza en dos pasos: inicialmente con una PCR de amplio espectro empleando iniciadores GP5+/6+ que están dirigidos contra el marco de lectura abierto L1 del VPH que amplifica un fragmento de 150 pb que se visualiza por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. Seguidamente para la genotipificación, los amplicones son desnaturalizados y se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicos, los cuáles están inmovilizados como líneas paralelas en las tiras de nitrocelulosa. Posteriormente se realizan lavados astringentes, se adiciona el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina, el cual se une a los híbridos formados previamente. La incubación con cromógeno BCIP/NBT da lugar a un precipitado púrpura que es interpretado de manera visual, lo que permite la detección cualitativa de 23 genotipos del VPH; dentro de los tipos de VPH agrupados en alto riesgo y probable alto riesgo están detectados por la prueba están: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82; y de bajo riesgo oncológico: 6,11, 30, 67 y 70.

3.11.5 Evaluación de dos marcadores de progresión oncogénica, marcador virológico (oncoproteína E6) y citológico (p16^{INK4a})

3.11.5.1 Método de detección de oncoproteína E6 (VPH 16/18 OncoE6)

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 de formato lineal con tira de nitrocelulosa (AVantage HPV E6 Test, Arbor Vita Corporation). El ensayo utiliza el principio de flujo lateral para detectar en dos líneas diferentes la oncoproteína E6, las tiras del ensayo contienen anticuerpos monoclonales de captura inmovilizados, la migración por acción capilar de los anticuerpos se realiza al sumergir las tiras en la solución muestra-conjugado. La presencia de una o más líneas indica que la oncoproteína E6 del VPH del tipo correspondiente (16 o 18), está presente en la muestra de frotis cervical.

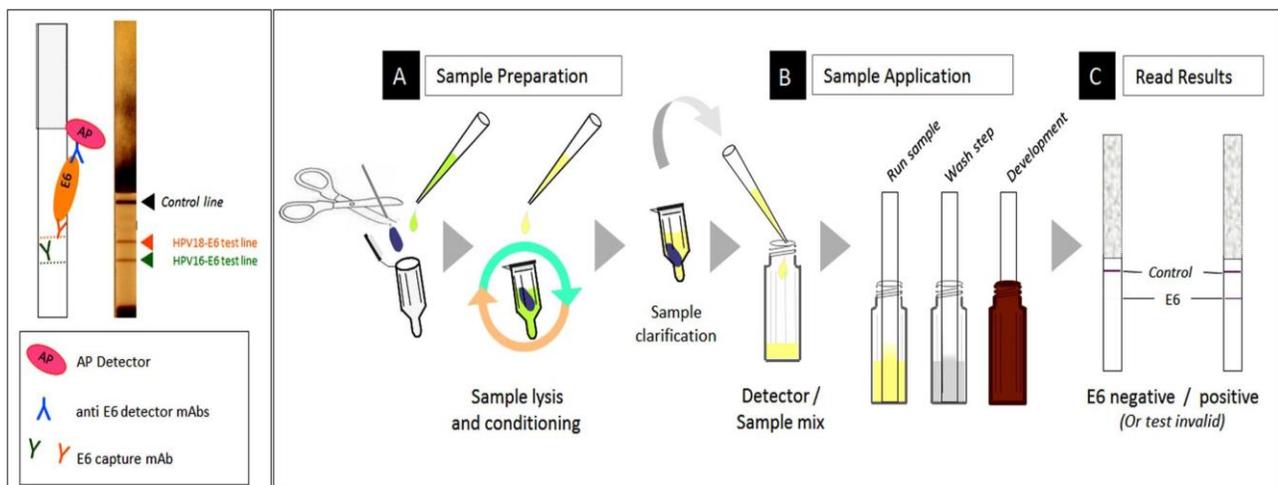


Figura 8. Principio de la prueba OncoE6 (Tomado de Schweizer y colaboradores, 2010).

3.11.5.2 Identificación de las variantes del VPH 16

3.11.5.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa para L1 (MY) y E6

Para realizar la identificación de las variantes y sublinajes del VPH 16 se amplificaron dos genes MY y E6, ambos del VPH 16. Se inició realizando una PCR convencional utilizando los iniciadores MY09/11 dirigidos a la región MY del marco de lectura abierto L1 del VPH 16, que amplifica un fragmento de 450 pb, con el fin de identificar las variantes del VPH16 presentes en las muestras. Para determinar los sublinajes se realizó una segunda PCR empleando los iniciadores E6/E7 dirigidos a la región E6 del VPH 16, que amplifica un fragmento de 610 pb. Para ambos PCRs la amplificación de los productos se visualizó por medio de electroforesis de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

3.11.5.2.2 Electroforesis capilar mediante el uso de la química BigDye (Secuenciación enzimática tipo Sanger)

Todos los productos amplificados en los PCRs anteriores (L1 (MY), E6) fueron purificados con el kit comercial *ExoSap-IT[®] PCR Product Cleanup* con el fin de eliminar el ruido de fondo y los nucleótidos sobrantes. Posteriormente se realizó la secuenciación de los amplicones ya purificados; la técnica se basa en la secuenciación automática del ADN aplicando electroforesis capilar utilizando la química BigDye Terminator v3.1[®] de Applied Biosystems. Esta técnica utiliza diferentes moléculas fluorescentes unidas a cada dideoxynucleótido (nucleótidos que en su carbono 3' no contiene el grupo hidroxilo). La incorporación de un dideoxynucleótido marcado en la síntesis de la nueva cadena de ADN impide que una nueva base pueda incorporarse y la síntesis de la nueva cadena es

interrumpida. Las distintas fluorescencias se emiten a diferentes longitudes de onda las cuáles son leídas por el equipo (Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers). Para la lectura e interpretación de los electroferogramas, se utilizó el software Sequencing Analysis 5.1.

3.11.5.3 Método de tinción p16^{INK4a} por inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica consistió en la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína p16^{INK4a} en biopsia cervicales. El anticuerpo se encuentra marcado con biotina, que al adicionar el conjugado estreptavidina-peroxidasa se une al complejo Ag-Ac formados previamente. La incubación con cromógeno HRP/DAB (*Horseadish peroxidase/diaminobenzidine*) da lugar a una coloración café, siendo el resultado interpretado de manera visual utilizando el microscopio. La interpretación positiva de la tinción p16^{INK4a} se basó en la observación de núcleos epiteliales fuertemente teñidos presentes en células basales y parabasales (tercio inferior del epitelio) en un área epitelial. Por el contrario, tanto la negatividad absoluta como la positividad parcheada o irregular para este marcador se consideran como ausencia de sobreexpresión interpretándose como negativas.

3.12. Detección de VPH en el seguimiento clínico de mujeres

3.12 Control y seguimiento de pacientes

Pasados los 18 meses desde la primera visita de reclutamiento, se procedió a citar nuevamente a cada participante VPH positiva para realizar una segunda toma de muestra cervical siguiendo los mismos procedimientos utilizados durante el reclutamiento para determinar la persistencia, recurrencia o eliminación del VPH.

3.12.1 Infección persistente

Se clasificarán como infección persistente aquellos casos en que las participantes presenten en la visita de seguimiento a los 18 meses el mismo genotipo de VPH que presentaron durante la visita de reclutamiento.

3.12.3 Infección recurrente o recidiva

Se clasificarán como infección recurrente o recidiva aquellos casos de infección/lesión que aparecen después de 18 meses de seguimiento, durante el cual habían presentado resultados citológicos normales, pruebas de VPH positivas con diferente genotipo.

3.12.4 Eliminación del VPH

Se clasificarán como eliminación del VPH aquellos casos en que las participantes presenten un resultado negativo en la detección del VPH en la visita de seguimiento a los 18 meses.

3.13 Recolección de información

Se aplicó diferentes tipos de formularios a cada participante para la recolección de datos clínicos y epidemiológicos.

Formularios utilizados en el reclutamiento de las 41 participantes en HGSF:

- Formulario de datos personales.
- Formulario de datos sociodemográficos.
- Formulario de colposcopia (llenado por el médico del estudio).
- Formulario de toma de muestras (llenado por el médico participante).
- Formulario de biopsia (llenado por el patólogo).

Formularios utilizados en la visita de seguimiento:

- Formulario de datos personales.
- Formulario de toma de muestras (llenado por el médico participante).

3.14 Análisis de datos

3.14.1 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.

3.14.2 Análisis estadístico

Se emplearon métodos estándar de tablas de contingencia y porcentajes de positividad de los tres grupos analizados. Se calculó sensibilidad y especificidad de la prueba con sus intervalos de confianza al 95% utilizando el programa estadístico XLSTAT. Para cumplir con el primer objetivo con respecto a la expresión de la oncoproteína E6 se calculó el coeficiente Kappa para determinar el nivel de concordancia entre la prueba de hC2 y PCR, necesarias para la detección y genotipificación del VPH.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

VP: Verdaderos positivos VN: Verdaderos negativos FP: Falsos positivos FN: Falsos negativos

Para cumplir con el segundo objetivo, la relevancia estadística de los datos se evaluó con la prueba de hipótesis T student a través del software IBM SPSS Statistics versión 23.0.

Con respecto al análisis del seguimiento de la cohorte en el tercer objetivo, se aplicó la estadística descriptiva para determinar persistencia, recurrencia o eliminación de infecciones de VPH tipo específico utilizando tablas de tabulación cruzada y representación gráfica de frecuencias.

3.15 Consideraciones éticas

El estudio fue presentado al Comité de Ética de Investigación de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) de la Escuela de Microbiología. Todas las mujeres que participaron en el estudio firmaron el formulario de consentimiento informado; la información proporcionada fue tratada con confidencialidad asegurándose que la participante entendiese que su participación era libre y voluntaria. El estudio se considera de riesgo mínimo y los procedimientos realizados durante la toma de muestra se asemejan a la práctica común en los programas de tamizaje del cáncer de cuello uterino. El estudio ESTAMPA cuenta con la aprobación Ética internacional y nacional por el Comité de Ética en investigación (CEIB), en donde las participantes autorizan el uso de sus muestras para ser utilizadas estrictamente en la evaluación de nuevos métodos en estudios posteriores.

3.16 Consideraciones de bioseguridad

El tipo de agente biológico estudiado representa un riesgo mínimo de infección por lo que todos los procesos de laboratorio fueron llevados a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la UNAH, el cuál es un laboratorio de bioseguridad tipo II.

Todas las muestras de raspados cervicales, así como los reactivos utilizados y demás desechos bioinfecciosos en el estudio fueron manejados siguiendo los lineamientos básicos del Oficial de Bioseguridad de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Los resultados de esta investigación comprenden la evaluación de tres diferentes técnicas de triaje; la expresión de la oncoproteína E6, la tinción de la proteína p16^{INK4a} y el seguimiento a mujeres VPH positivas a los 18 meses de la toma inicial. La recolección de muestras cervicales se realizó en los municipios de Valle de Ángeles, Cantarranas, Santa Lucía y el Distrito Central, en Francisco Morazán; la población totalizó 264 mujeres entre 30 y 64 años de edad quienes formaron parte del estudio. La toma de muestras, transporte y análisis de ellas se llevaron a cabo siguiendo los POE previamente establecidos.

4.1 Determinación de la expresión de la oncoproteína E6 del VPH 16/18.

Se analizaron 196 muestras de tres poblaciones diferentes de mujeres, 100 de ellas con resultado VPH negativo (captura híbrida hC2) del estudio ESTAMPA, 55 con resultado VPH positivo (captura híbrida hC2) del mismo estudio y 41 mujeres

referidas con NIC 2+ o cáncer cervical, reclutadas en el HGSCF. Las 196 muestras fueron analizadas por hC2 y genotipificadas por medio de LiPA, 95 dieron un resultado VPH positivo: 85 en ambas técnicas (captura híbrida hC2 y LiPA), 7 muestras únicamente por captura híbrida hC2 y 3 solo por LiPA; una de las muestras resultó positiva solo en la prueba OncoE6. Las pruebas hC2 y PCR presentan un grado de concordancia excelente con un coeficiente Kappa igual a 0.897 (IC: 0.835, 0.959). Al analizar la Tabla 6, en 3 muestras cervicales no fue detectado el ADN del VPH por hC2 y 7 muestras resultaron negativas en PCR, las cuáles no pudieron ser genotipificadas.

Tabla 6. Detección del VPH por hC2 y PCR (GP+5/+6)

hC2 (%)			
PCR (GP+5/+6)	Positiva	Negativa	Total
Positivo	85 (96.5%)	3 (3.5%)	88
Negativo	7 (6.6%)	100 (93.4%)	107
Total	92	103	195

4.1.1 Genotipificación del VPH por medio de prueba LiPA

En la Figura 9 se observa la amplificación del gen de β -globina (300 pb) por medio de PCR convencional, donde el 100% de las muestras resultaron positivas garantizando la calidad del material a genotipificar. Por medio de PCR convencional se detectó el VPH en el 96% (n = 85) de muestras para su posterior genotipificación.

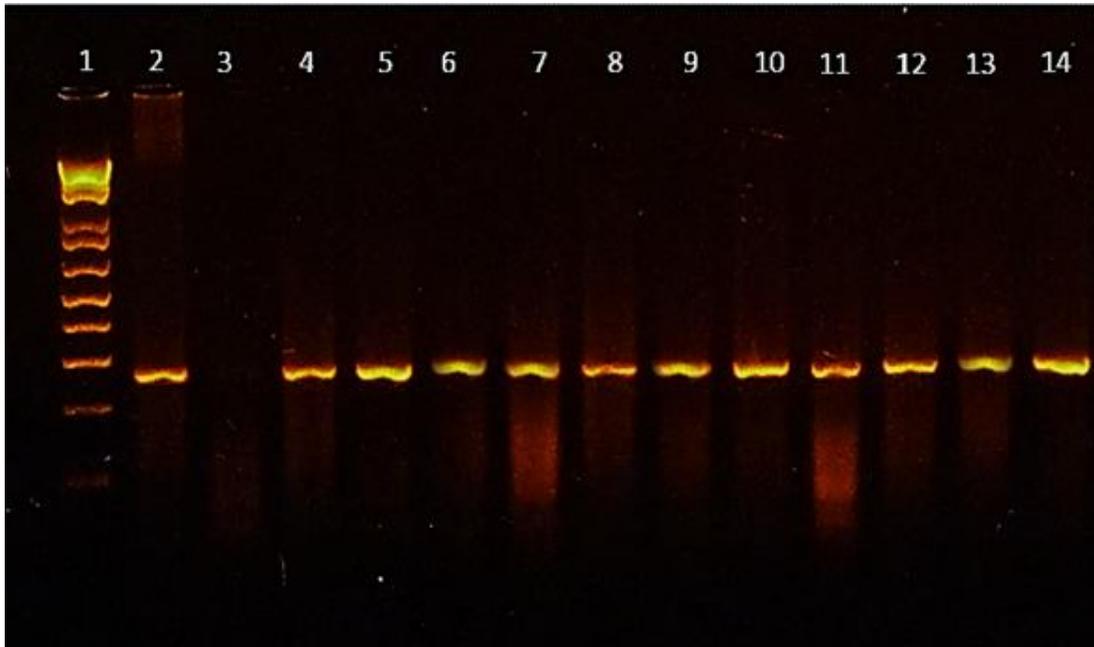


Figura 9. Detección de β -globina humana por medio de PCR. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 3 control positivo y negativo, carriles del 4 al 14 muestras positivas.

En la Figura 10 se muestra la amplificación del gen L1 del VPH (150 pb) previo a la tipificación del amplicón.

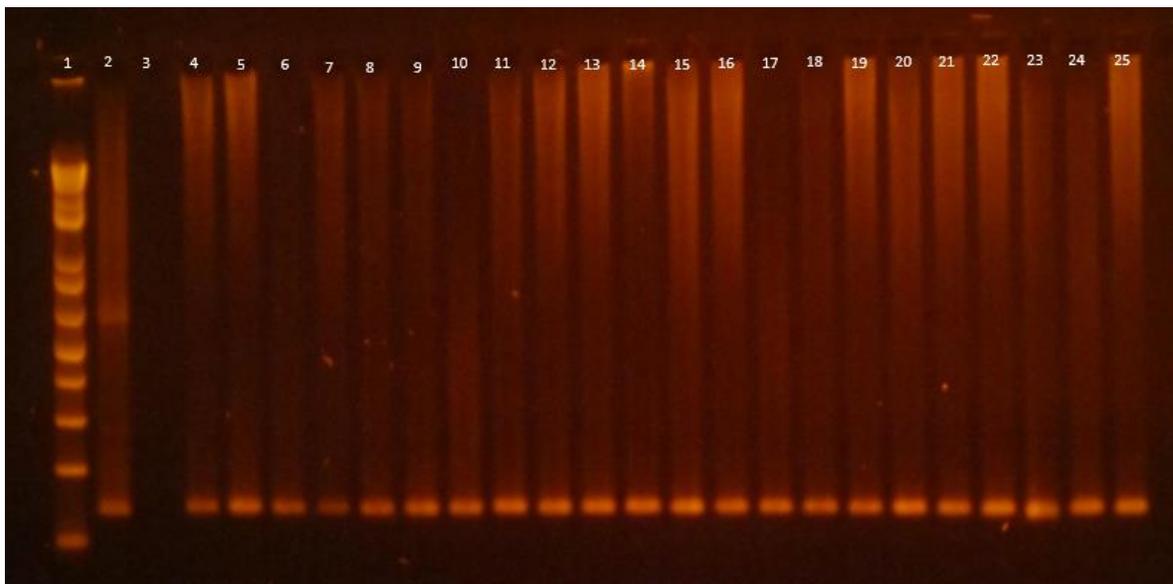


Figura 10. Detección del VPH por medio de PCR. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 3 control positivo y negativo, carriles del 4 al 25 muestras positivas.

El total de muestras amplificadas por PCR (GP+5/+6) fue de 88; los tipos de VPH fueron identificados a través de hibridación reversa (LiPA). La frecuencia del VPH 16 (28.4%) fue mayor en comparación de la encontrada en el VPH 18 (11.3%), representado gráficamente en la Figura 11.

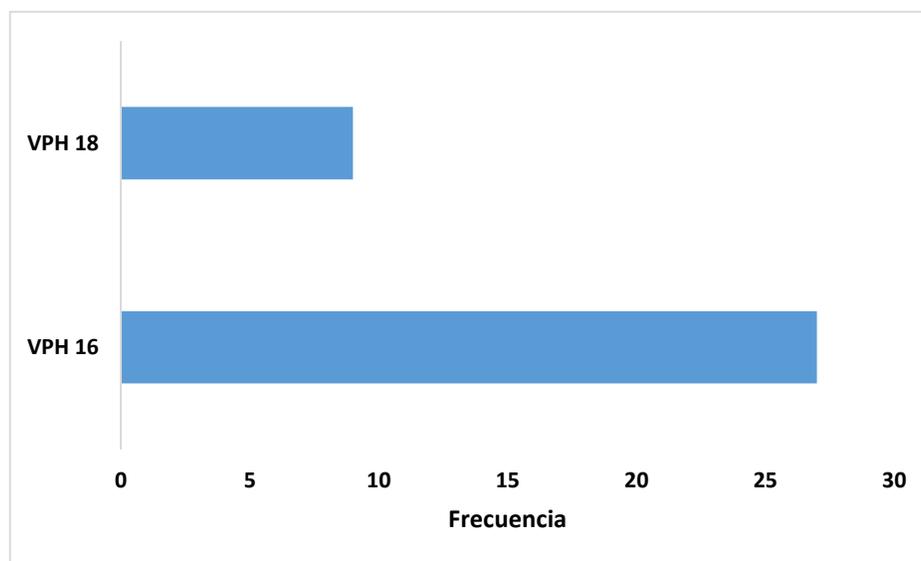


Figura 11. Frecuencia del VPH 16 y 18

4.1.2 Detección de la expresión de la oncoproteína E6 del VPH 16 y 18.

De la totalidad de las muestras analizadas, veintiuna (10.7%) expresaron la oncoproteína E6 VPH16 y nueve la oncoproteína E6 VPH18 (4.5%), detectadas por medio de la prueba OncoE6. En la Figura 12, se observa la expresión de la oncoproteína E6 mediante la formación de una banda color púrpura correspondiente a E6 VPH16 o VPH18.

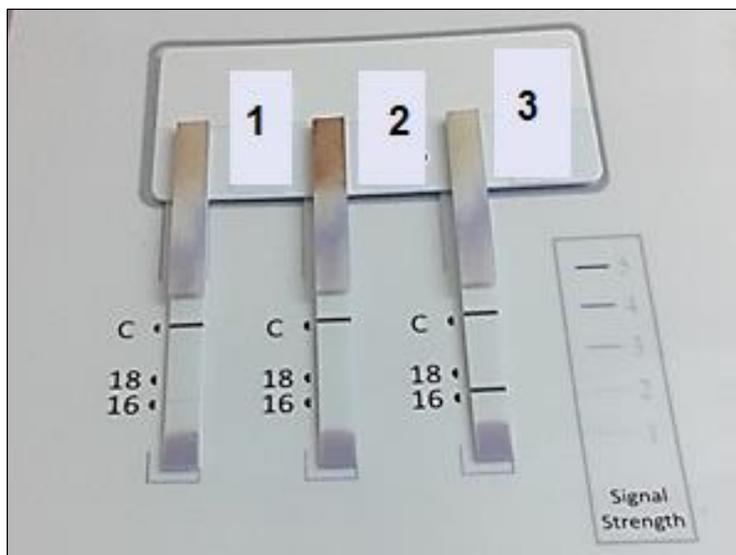


Figura 12. Interpretación de la prueba OncoE6 VPH16/18. (C) Línea de control, (16) línea VPH16-E6, (18) Línea VPH-18-E6. Tira 1 y 2: negativa; Tira 3: VPH16-E6 positivo.

Un total de 7 NIC 2, 6 NIC 3 y 31 cánceres fueron diagnosticados. Dos de los casos NIC 2 y un cáncer se detectaron en mujeres del estudio ESTAMPA; todos los otros casos (93%) fueron diagnosticados en el grupo de referencia (Tabla 7). La prueba OncoE6 fue positiva en todos los NIC 2+ (n = 26) asociados a VPH16/18 (tres NIC 2, cuatro NIC 3 y 19 cánceres), en un cáncer que resultó negativo en todas las otras pruebas y en tres mujeres sin lesiones de alto grado.

Tabla 7. Número de mujeres con NIC2+ y sin enfermedad por tipo de VPH (16/18, Otro y negativo) y resultado de E6

	NIC 2+ EN HISTOLOGÍA			SIN ENFERMEDAD (<NIC2, COLPOSCOPIA NEGATIVA)			Total
	VPH 16/18	VPH Otros	VPH NEG	VPH 16/18	VPH Otros	VPH NEG	
E6 positiva	26*	0	1**	3***	0	0	30
	100%	0%	100%	23.1%	0%	0%	15.3%
E6 negativa	0	17	0	10	39	100	166
	0%	100%	0%	76.9%	100%	100%	84.7%
Total	26	17	1	13	39	100	196
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

*Dos casos hC2 negativa, VPH 18, E6 18 con resultado histológico de cáncer invasor. ** hC2 negativa, PCR VPH (GP+5/GP+6) negativo, E6 16 positivo con cáncer. *** Un caso hC2 positivo, VPH18, VPH66, E6 18 con NIC 1; un caso hC2 positivo VPH16, E6 16 y colposcopia negativa; un caso hC2 positiva, E618 e impresión colposcópica de bajo grado (sin resultado de biopsia).

La sensibilidad del OncoE6 fue de 61.4% (95 IC: 45.5%-75.6%) para la detección de NIC 2+ y 100% (94.3-100) para NIC 2+ asociado a VPH16 o VPH18; la especificidad en la detección de lesiones menores de NIC 2+ fue de 98.0% (95% IC 94.3%-99.6%) ver Tabla 8.

Tabla 8. Desempeño de la prueba OncoE6 para la detección de NIC2 +

DetECCIÓN DE NIC 2+	ESTIMADO	(IC 95%)
Todos los casos NIC 2+ (n:48)		
Sensibilidad	61.4%	(45.5%-75.6%)
Especificidad	98.0%	(94.3%-99.6%)
NIC 2+ asociados a VPH HPV16/18 (n:28) ¹		
Sensibilidad	100.0%	(86.8%-100.0%)
Especificidad	98.0%	(94.3%-99.6%)

No enfermedad: histología <CIN2 o colposcopia negativa. Prueba de E6 positiva con presencia del HPV 16 o VPH 18 (basado en el resultado de GP5/GP6). ¹Los casos de NIC 2+ no asociados al VPH 16/18 fueron excluidos.

4.2 Identificación de las variantes y sublinajes del VPH 16

Con el propósito de identificar las variantes y sublinajes del VPH 16 se tomó una cohorte de 13 casos NIC 2+, que expresaron la oncoproteína E6 (12 cánceres, 1 NIC 2). Se utilizaron dos PCRs convencionales, la primera amplificó el gen L1 utilizado para identificar las variantes; la segunda dirigida al gen E6 para determinar los sublinajes del VPH16. El 100% de las muestras cervicales amplificaron un fragmento del gen L1 por medio de PCR (450 pb), observándose en la Figura 13.

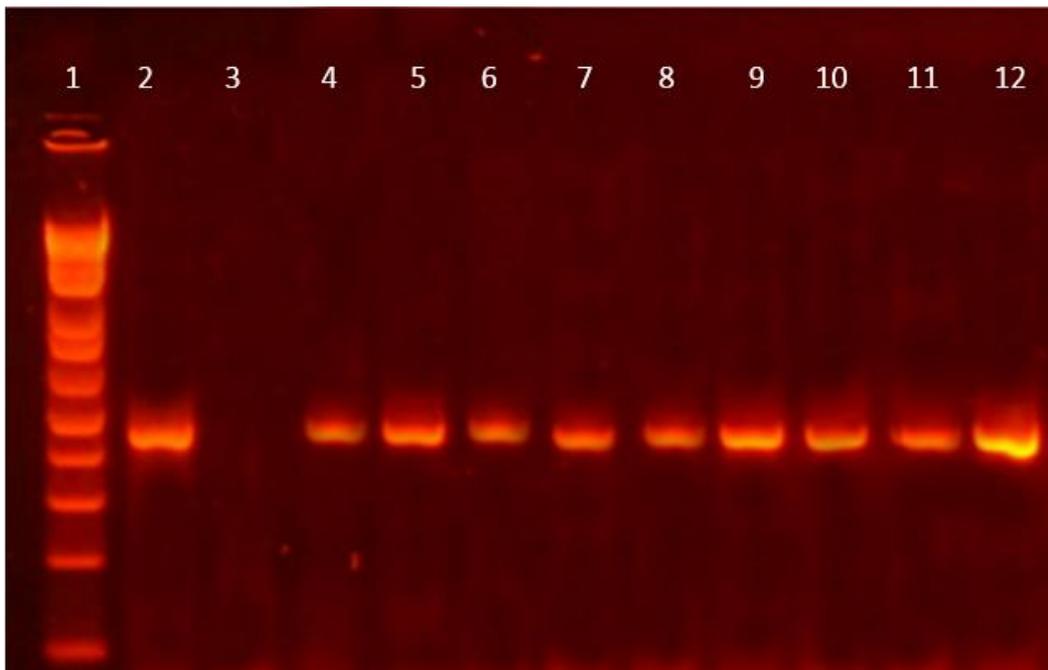


Figura 13. Detección de la región L1/MY por medio de PCR. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 3 control positivo y negativo, carriles del 4 al 12 muestras positivas.

Para la clasificación de los sublinajes, se amplificó en las 13 muestras VPH 16 un fragmento del gen E6 de 610 pb (Figura 14).

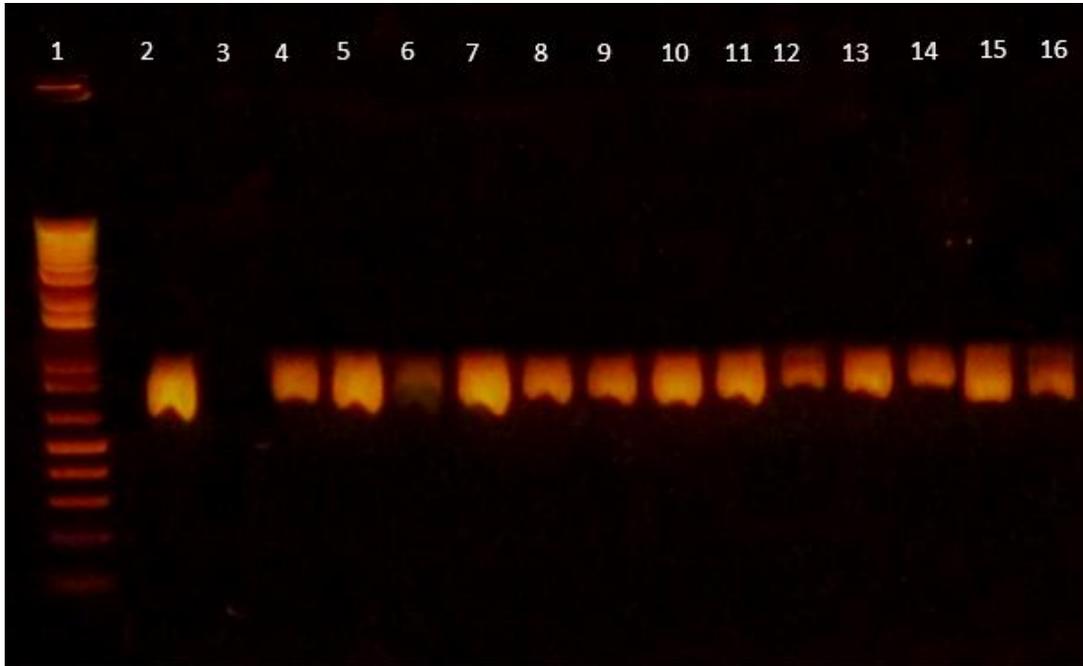


Figura 14. Amplificación de la región E6 de VPH 16. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 3 control positivo y negativo, carriles del 4 al 16 muestras positivas.

La Figura 15 muestra el electroferograma de la región L1/MY del VPH 16 sin picos inespecíficos ni ruido de fondo.

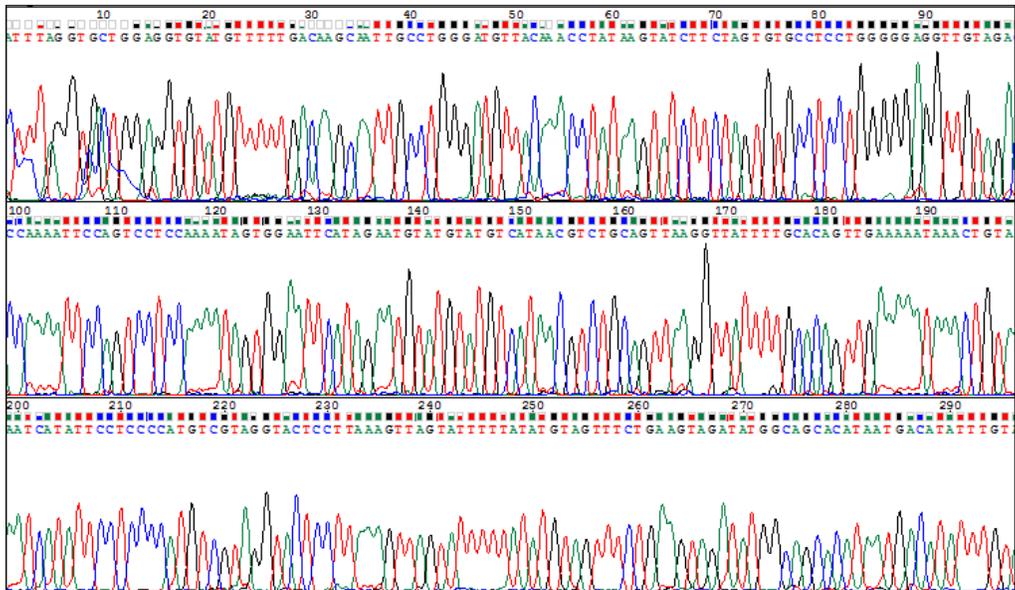


Figura 15. Electroferograma de la región L1/MY (450 nucleótidos) del VPH 16.

4.2.1 Identificación de mutaciones puntuales, en las regiones L1/MY y E6 del VPH 16

La identificación de los linajes y sublinajes del VPH 16 se basaron en la presencia de variantes de nucleótidos simples en las posiciones propuestas por Yamada y colaboradores, (1997) y Burk y colaboradores, (2013) como se demuestra en la Tabla 9. Verticalmente se colocaron las posiciones de los nucleótidos que mostraron variación, el número de casos positivos se colocó en la parte derecha.

Tabla 9. Cambios en la secuencia de nucleótidos en las regiones L1 (MY) y E6, de las variantes del VPH 16: A1/2 y D3.

A			Posición de L1/MY*														
			6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Linaje	Sublinaje	Nomenclatura	6	7	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9		
			9	2	0	2	5	6	6	6	0	3	5	6	7	9	
			5	1	3	6	4	2	5	8	4	1	8	5	0	4	
Referencia VPH 16			A	G	A	C	C	T	C	A	A	T	C	A	C	G	n
EAS	EUR	A1/2	A	G	A	C	C	_	C	A	A	T	C	A	C	G	
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
NA/AA	AA1	D3	C	A	T	C	T	T	T	A	A	T	C	A	T	A	
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Total																	13

*Se muestran las 14 posiciones de la región L1 (MY) propuestas por Yamada.

B			Posición de E6*																n
			1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	4	
Linaje	Sublinaje	Nomenclatura	0	3	3	4	4	7	8	5	6	6	8	8	9	3	5	0	3
			9	1	2	3	5	8	3	6	7	9	6	9	5	5	0	3	2
Referencia			T	A	G	C	G	T	T	C	G	G	T	A	T	C	T	A	A
VPH 16																			
EAS	EUR	A1/2	_/_C**	_/_G**	G	C	G	_/_A**	T	C	G	G	T	A	T	_/_T**	_/_G**	A	A
			T	A	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	C	G	-	-
			T	A	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-
NA/AA	AA1	D3	T	A	G	C	T	T	T	C	G	G	A	G	T	T	G	A	_/_G**
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total																			13

*Se presentan 17 variantes en la región E6, todas usadas por Yamada, y a excepción de cuatro todas son empleadas por Burk. **Alternativas de sustitución, presente en menos del 2% de las muestras.

Se identificó la variante Europea sublinaje A1/2 (69.2%) y la variante Asiático-Americana sublinaje D3 (30.7%). Representado gráficamente en la Figura 16 se observa la distribución de las variantes por rango de edad, donde NA/AA prevaleció en mujeres jóvenes, a diferencia de EAS que se encontró uniformemente distribuida.

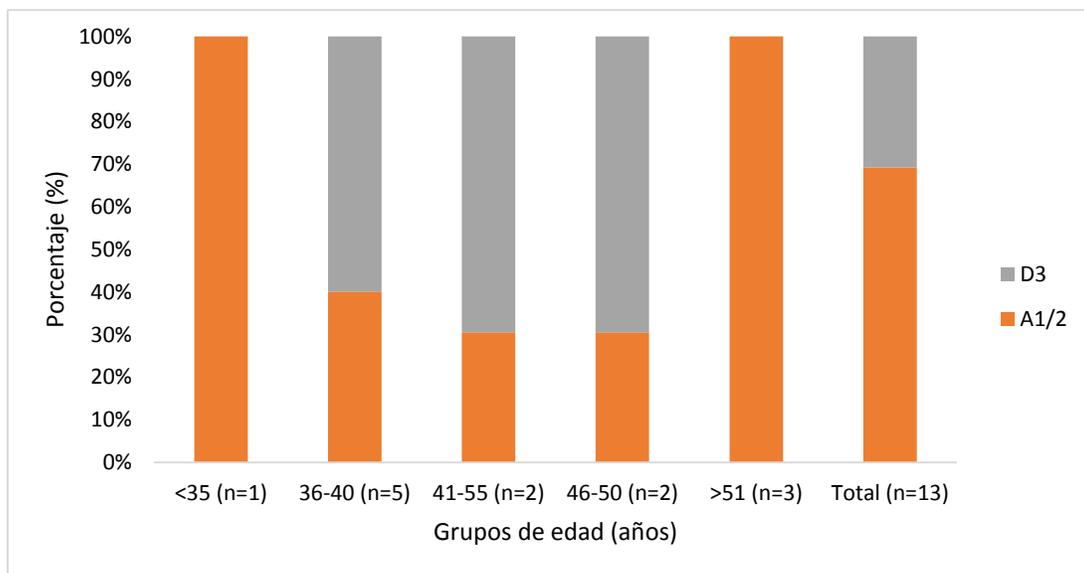


Figura 16. Porcentaje de las variantes del VPH 16 por grupos de edad.

4.2.2 Asociación de las variantes según el tipo histológico de cáncer cervical.

Las variantes del VPH 16 se detectaron en todos los tipos histológicos de cáncer cervical. Como se observa en la Tabla 10, las variantes EAS y NA/AA fueron encontradas con frecuencia similares en carcinomas epidermoides (100% y 75%, respectivamente), y solo una variante NA/AA se identificó en un adenocarcinoma (25%).

Tabla 10. Distribución de las variantes del VPH 16 en carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas.

Histología	Frecuencia del VPH 16 (%)		
	VPH 16	VPH 16 EAS*	VPH 16 NA/AA*
Carcinoma de células escamosas	11/12 (91.66%)	8/11 (72.72%)	3/11 (27.27%)
Adenocarcinoma	1/12 (8.34%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
Total	12	8	4

*NA/AA: Variante Norte americano/Asiático americano; EAS: Variante Europea asiático.

4.3 Determinación de la presencia de NIC 2 en mujeres VPH positivas/negativas, evaluando el desempeño de la tinción de p16^{INK4a} en biopsias cervicales.

Tanto las muestras negativas, NIC 1 como las NIC 2 correlacionaron de forma negativa y positiva, respectivamente, con la tinción de p16^{INK4a}. Tal como se muestra en la Figura 17, en las muestras positivas en la tinción de p16^{INK4a} se observa coloración café fuerte y difusa, a diferencia a lo observado en los casos reportados negativos para la prueba.

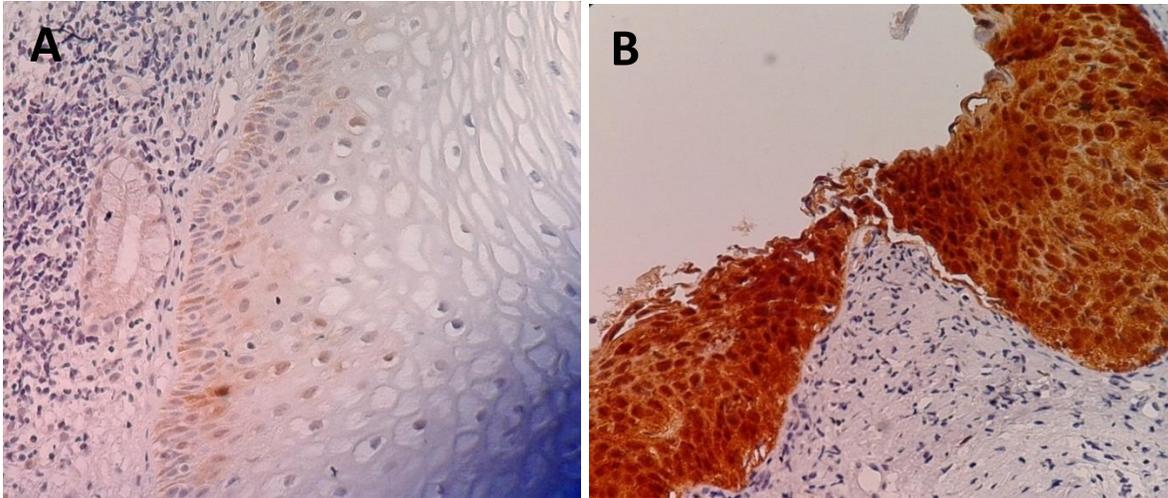


Figura 17 A. Tinción de inmunohistoquímica negativa para p16^{INK4a} biopsia de cuello uterino, con diagnóstico inicial de cervicitis crónica inespecífica. **B.** Tinción de inmunohistoquímica positiva para p16^{INK4a} en biopsia de cuello uterino con diagnóstico inicial de NIC 2.

4.3.1 Expresión de p16^{INK4a} en tejido cervical dependiente del diagnóstico histológico

De las 12 muestras con diagnóstico histológico inicial negativo de displasia y NIC 1 (3 cervicitis, 2 exocervicitis, 4 tejido cervical sin lesiones histológicas, 3 NIC 1), el 100% obtuvo un resultado negativo en la detección de la expresión de p16^{INK4a}. Por otro lado, todas las 8 muestras con diagnóstico histológico de NIC 2, obtuvieron un resultado positivo en la detección de la expresión de p16^{INK4a}, presentando coloración café fuerte y difusa en las células basales y parabasales en dos tercios del epitelio cervical (Tabla 11).

Tabla 11. Expresión de p16^{INK4a} en tejido cervical normal y NIC 2 confirmadas histológicamente.

Patrón de tinción de p16 ^{INK4a}	Diagnóstico histológico		Total
	Cervicitis/NIC 1	NIC 2	
Negativo	12	0	12
Parceado	0	0	0
Fuerte y difuso	0	8	8
Total	12	8	20

La prevalencia del VPH en los casos negativos y NIC 1 fue del 50% (NIC 1 1/3, negativo 5/9), a diferencia de los casos NIC 2 que fue del 100% (n: 8/8). Los tipos virales encontrados en los casos NIC 2 fueron: 16, 18, 35, 58, 51 y 66, siendo el VPH 16 el más común. La sensibilidad y especificidad de la proteína p16^{INK4a} fue de 100% (IC 95: 96.3%-100%) en la detección de los casos NIC 2 (P < 0.001).

4.4 Persistencia, recurrencia o eliminación de las infecciones por VPH de alto riesgo después de 18 meses de la detección inicial del virus.

Se les dio seguimiento a los 18 meses a 111 mujeres de la cohorte VPH+ en reclutamiento del estudio ESTAMPA y que no mostrasen lesiones tipo NIC 2+; las que presentaran lesiones cervicales de alto riesgo durante la colposcopia, fueron excluidas, para poder ser tratadas. De las 111 mujeres con seguimiento a los 18 meses, 42% continuaron positivas por VPH de alto riesgo en la prueba de hC2, a diferencia del 58% que logró eliminar la infección por VPH de alto riesgo, representado gráficamente en la Figura 18.

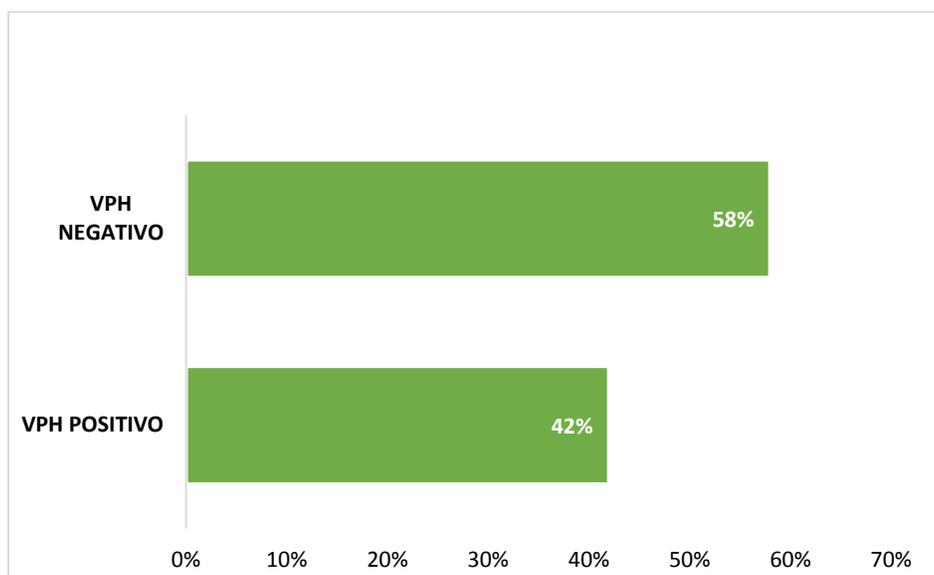


Figura 18. Mujeres VPH positivas a los 18 meses del reclutamiento.

4.4.1 Genotipificación del VPH

Todas las muestras positivas por hC2 (reclutamiento y seguimiento) se analizaron por PCR convencional con iniciadores GP+5/+6 para su posterior genotipificación. En reclutamiento, 87.23% fueron positivas, a diferencia de las muestras de seguimiento con solo el 80.85% de positividad (Tabla 12).

Tabla 12. Genotipificación del VPH en muestras de seguimiento y reclutamiento.

	Población analizada/ Detectados (%)	
	Seguimiento y Reclutamiento	Reclutamiento Seguimiento
Muestras VPH positivas	36/47 (76.59%)	41/47 (87.23%) 38/47 (80.85%)

4.4.2 Identificación de infecciones persistentes o recurrentes por VPH de alto riesgo.

Como se observa en la Figura 19, un total de 111 muestras fueron analizadas por LiPA; en 11 de las muestras cervicales no se logró la genotipificación del VPH por lo que fueron excluidas de los análisis estadísticos. Las infecciones persistentes se identificaron en el 18% (n: 20) de las mujeres con seguimiento, mientras que solo un 14% (n: 16) mostraron infecciones recurrentes.

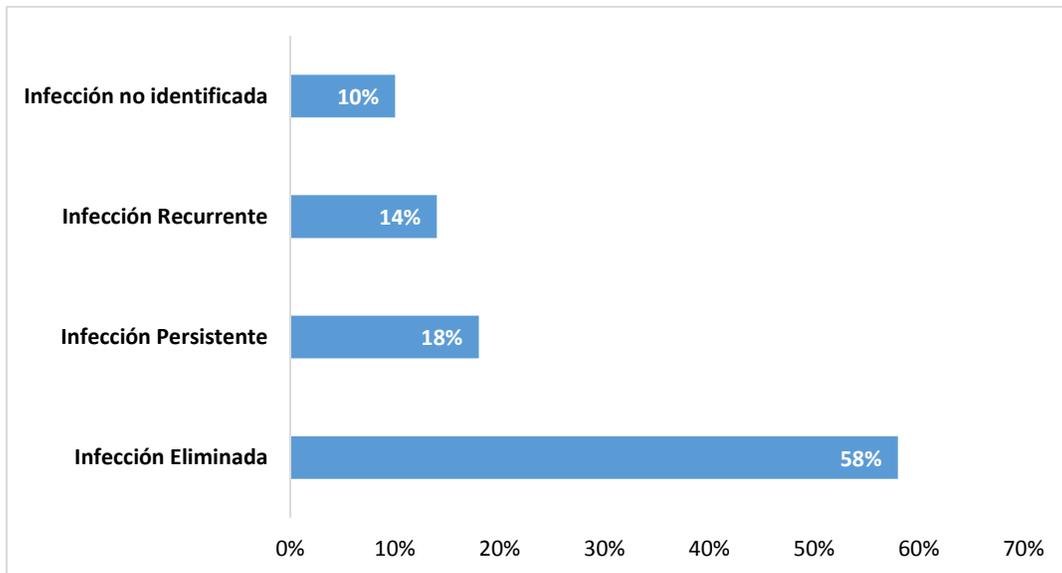


Figura 19. Clasificación de las infecciones durante el seguimiento a 18 meses.

La Figura 20 clasifica los 10 distintos tipos del VPH que persistieron después de los 18 meses; el VPH 16 fue el más prevalente con un 45% seguido del VPH 31 y el 59, respectivamente. Aleatoriamente se tomaron 28 muestras incluyendo seguimiento y reclutamiento para ser secuenciadas, y confirmar los tipos de VPH identificados previamente. Se logró comparar 20 tipos del VPH identificados en

ambos grupos por LiPA con el resultado obtenido en secuenciación, con una concordancia del 100%; en las 8 restantes muestras secuenciadas no se logró identificar el tipo viral ya que mostraban múltiples picos en el electroferograma.

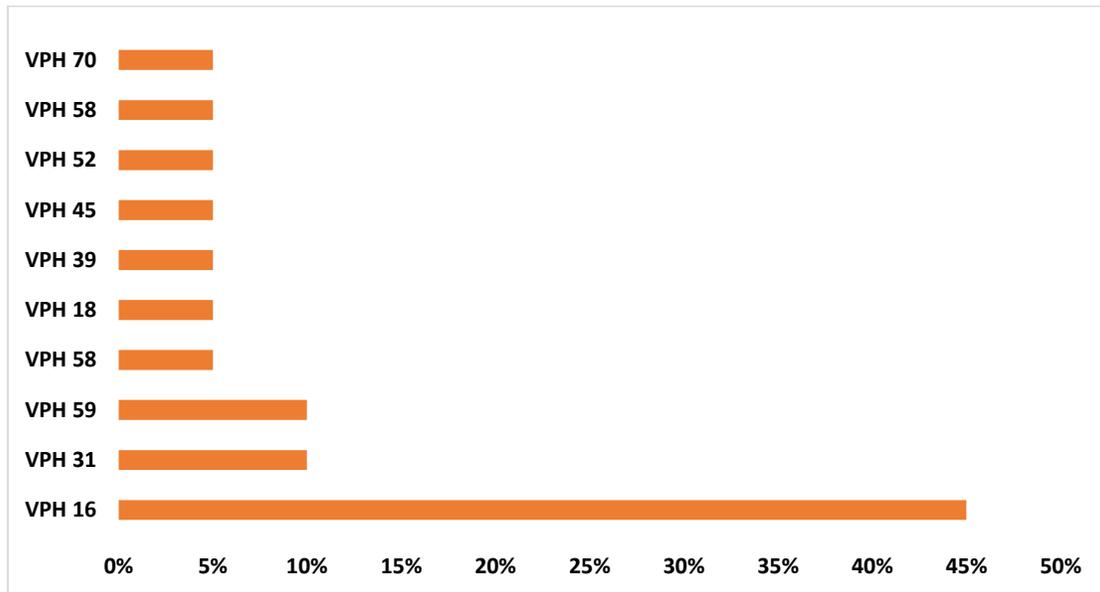


Figura 20. Tipos de VPH en infecciones persistentes

4.4.3 Clasificación de lesiones cervicales en infecciones recurrentes o persistentes.

En la Tabla 13 se muestra la relación entre el tipo de infección por el VPH con el desarrollo de lesiones cervicales. El 39% de los casos con infección por VPH de alto grado a los cuales se les dio seguimiento presentaron lesiones histológicamente confirmadas; la mayoría de lesiones NIC 2 y NIC 3 se observaron en casos de infecciones por VPH persistentes. Por el contrario, la mayoría de los casos NIC 1 diagnosticados en el seguimiento fueron producto de infecciones recurrentes. Durante el seguimiento se diagnosticó un carcinoma

endocervical en las infecciones persistentes, el cual no había sido detectado durante el reclutamiento.

Tabla 13. Patología cervical identificada.

	Clasificación histológica (%)					Total
	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Carcinoma	Negativo	
Infección por VPH						
Recurrencia	5 (67%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (45%)	16 (41%)
Infección Persistente	2 (33%)	5 (83%)	1 (100%)	1 (100%)	11 (55%)	20 (58%)
Total	7 (100%)	6 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	21 (100%)	36

La frecuencia de las infecciones persistentes por VPH de alto riesgo por grupo de edad se muestra en la Figura 21. La prevalencia fue mayor en mujeres entre los 30 y 39 años (45%, n = 9), seguido por el grupo de edad comprendido entre los 50 y 59 años de edad con un 25% (n = 5).

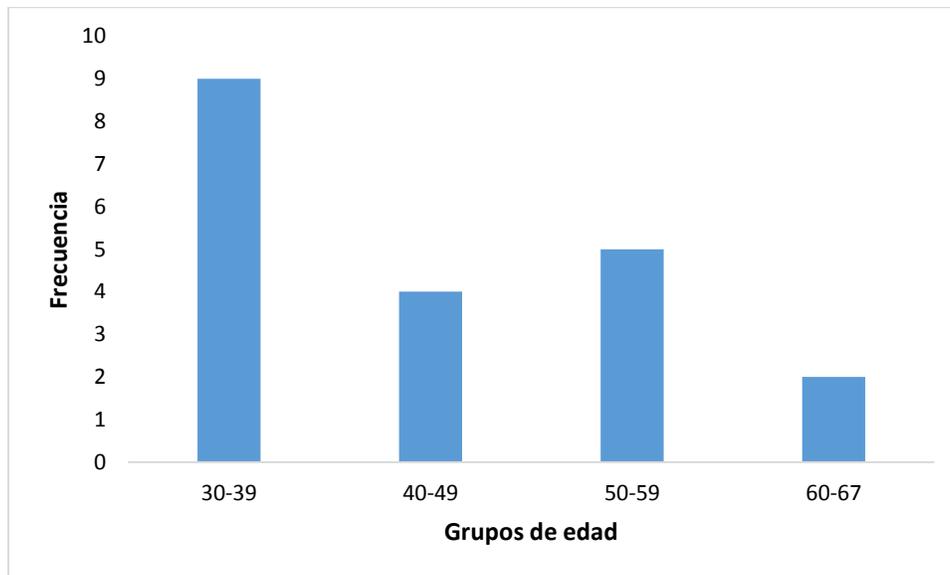


Figura 21. Frecuencia de infección persistente por grupos de edad.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

El principal objetivo de nuestro estudio fue estimar la eficacia de marcadores de proliferación celular y viral y la eliminación, recurrencia o persistencia del VPH como estrategias de triaje y seguimiento a las mujeres VPH positivas. Planteamos que las estrategias evaluadas una vez analizadas podrían ser en un futuro, una posible opción para su incorporación a un Programa Nacional como técnicas de triaje, o seguimiento de la persistencia de tipos oncogénicos a las mujeres VPH positivas detectadas en el Programa de tamizaje primario.

La evidencia científica de los últimos años recomienda firmemente la detección de VPH de alto riesgo como herramienta para el tamizaje primario del cáncer cervical. Los estudios han mostrado que la presencia de ADN de VPH de alto riesgo es más sensible que la citología estándar, detectando alrededor de 50% de casos adicionales de NIC 2+. Sin embargo, aunque casi todos los cánceres cervicales son causados por la infección por VPH, sólo un número muy pequeño de mujeres que tienen VPH de alto riesgo desarrollará cáncer de cuello uterino.

Una prueba positiva de VPH de alto riesgo por sí sola puede conducir a una ansiedad innecesaria y a un sobre tratamiento, por lo que, identificar qué infección por VPH de alto riesgo conducirá al desarrollo de un cáncer cervical ha sido un reto diagnóstico primordial. En la última década, las investigaciones se han enfocado en el estudio de biomarcadores de triaje en mujeres VPH positivas, y también en la búsqueda de estrategias de reducción rápida del peso de enfermedad, como vacunar contra VPH a mujeres adultas y dar un seguimiento más frecuente a las mujeres positivas por VPH de alto riesgo.

Las investigaciones científicas han demostrado que el VPH produce dos oncoproteínas, E6 y E7, sin las cuales no se produce cáncer [Schweizer et al., 2010]. Por lo tanto, la detección de ADN o ARN del VPH simplemente identifica la infección, mientras que la detección de las proteínas expresadas por los E6 y E7 de VPH de alto riesgo marca la transición de la infección al cáncer. La prueba cervical OncoE6 detecta el biomarcador E6, que es responsable de los efectos cancerígenos del VPH.

Con la limitante de un número reducido de muestras cervicales, el presente estudio evaluó la expresión de la oncoproteína E6 del VPH 16/18 en la detección de lesiones tipo NIC 2+ a partir de muestras cervicales, por medio de la prueba inmunocromatográfica de flujo lateral OncoE6. Nuestra experiencia mostró que, de las 155 mujeres VPH positivas, 20 expresaron la oncoproteína E6 VPH16, mientras que 7 para la oncoproteína E6 VPH18. Destacamos que la prueba fue positiva en todos los casos de NIC 2+ asociados a los tipos virales VPH 16/18.

Particularmente resaltamos un caso de cáncer cervical positivo únicamente en las pruebas OncoE6 16/18, y con resultados negativos en los otros ensayos (hC2 y PCR GP+5/+6). Este resultado es similar, al encontrado en otros estudios donde, se ha reportado que al menos el 10% de mujeres con diagnóstico confirmado de cáncer cervical han mostrado un resultado negativo del VPH, reportando la baja sensibilidad que pueden presentar las pruebas del VPH en la detección de NIC 2+, al emplearse como única técnica de tamizaje, inclusive en cánceres cervicales [Blatt et al., 2015]. Los cánceres cervicales con resultados VPH negativos en pacientes mayores de 60 años, como en este caso en específico, podrían ser a

causa de títulos virales bajos y no detectados por hC2, generando también pocas copias virales, no amplificadas por PCR [Blatt et al., 2015; Poljak et al., 2009].

Otra particularidad de los resultados, fue el encontrado en tres mujeres VPH positivas y resultado citológico negativo, que no presentaban lesiones de alto grado, pero si revelaron la expresión de la oncoproteína E6; 18 meses después de su evaluación, dos de ellas desarrollaron lesiones tipo NIC 2+, una con NIC 2 la cual fue tratada, y la segunda sorprendentemente fue diagnosticada con carcinoma cervical, mientras que la tercera no presentaba lesiones de alto grado por lo que según la literatura se recomienda un seguimiento controlado. Estos hallazgos sugieren que, posiblemente un resultado positivo por OncoE6 16/18 requiere un seguimiento más de cerca porque puede ser indicativo de desarrollar una lesión posterior.

En vista, de que no todas las lesiones cervicales son producidas por los tipos VPH16/18, las lesiones generadas por otros tipos oncogénicos no son detectadas por la prueba, es por esto que, al evaluar su rendimiento en la detección de lesiones NIC 2+ encontramos una sensibilidad del 61.4% (IC 95% 45.5-75.6) y una especificidad del 98.0% (IC 95% 94.3-99.6), en contraste, su alta especificidad radica en que detecta los tipos virales más comunes encontrados en lesiones tipo NIC 2+. En igual forma, Mariano y colaboradores, determinaron una sensibilidad de 49.6% (IC 95% 40.3–58.9) y una especificidad de 91.8% (IC 95% 88.3–94.5) en la detección de casos NIC 2 utilizando la misma prueba; el rendimiento fue parecido en los casos NIC 3 con una sensibilidad de 59.7% (IC 95% 47.6–71.1) y especificidad de 88.6% (IC 95% 84.9–91.6) [Mariano et al., 2016]. Los autores

concluyeron que la detección de la oncoproteína E6 VPH16/18 podría ser un prometedor método de triaje a utilizarse en conjunto con la citología.

Asimismo, al asociar el rendimiento de la prueba en la detección NIC 2+ asociado a los tipos VPH 16 o 18 encontramos una sensibilidad y especificidad de 100.0% (87.7%-100.0%) y 99.3% (96.3%-99.9%), respectivamente, encontrando buena correlación entre la positividad de la oncoproteína E6 y la gravedad de lesiones histopatológicas comparable a lo encontrado en un estudio realizado en China [Zhao et al., 2013]

Con respecto a lo anteriormente expuesto, la prueba OncoE6 permite identificar aquellas mujeres en necesidad de seguimiento de las que solo están infectadas; su alta especificidad y sensibilidad serán claves a futuro para la toma de decisiones. Al igual que nuestro análisis, Zhao y colaboradores, evidenciaron que un resultado positivo de E6 y VPH juntos, aumenta el valor predictivo positivo en 10-26 veces para desarrollar lesiones NIC 2+, después de un año, a diferencia de la prueba de VPH por sí sola [Zhao et al., 2013]. Adicionalmente, la prueba se caracteriza por su fácil uso, permitiendo su ejecución en laboratorios no especializados sobre todo en países en vías de desarrollo; de igual manera, no necesita equipo complejo, a diferencia del que se utiliza en la detección del ADN-VPH. Otra bondad de la prueba, es la rapidez de sus resultados (menos de 3 horas) lo que hace que su detección sea considerada como un atractivo biomarcador celular específico de enfermedad a partir de muestras cervicales [Mariano et al., 2016; Schweizer et al., 2010; Zhao et al., 2013].

Una ventaja adicional, recae en los bajos costos que generaría la implementación de la prueba OncoE6 en comparación con los utilizados en la detección del ADN-VPH; de manera semejante, la citología no representa un alto costo en su ejecución, no obstante, la infraestructura necesaria para llevarla a cabo, si lo es [Zhao et al., 2013]. Asimismo, la prueba también ha sido evaluada en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de otros tipos de cáncer distintos al cervicouterino, como el cáncer faríngeo y rectal, demostrándose alta sensibilidad y especificidad en su detección [Zhao et al., 2013].

Según se ha visto, algunas variantes de VPH16 se han asociado con diferentes riesgos de desarrollar NIC 2+, aunque todas son carcinogénicas. Conocer cuáles son las variantes circulantes en el país nos permitiría asociarlas con la alta prevalencia del cáncer cervical en Honduras. Por lo que, en el presente estudio, caracterizamos las variantes del VPH 16 y por primera vez en Honduras identificamos los sublinajes de estas variantes en muestras cervicales de mujeres hondureñas con diagnóstico histológico de NIC 2+.

Evidenciamos la presencia de dos variantes; en mayor prevalencia la variante EAS sublinaje A1/2, y en menor proporción la variante NA/AA sublinaje D3, semejante a lo reportado por Tábora y colaboradores, donde encontraron en igual frecuencia ambas variantes en 106 mujeres referidas al Hospital General San Felipe quienes presentaban citología normal, displasia o cáncer cervical [Tábora et al., 2010].

Nicolás-Párraga y colaboradores, en 2017, evaluaron la distribución de las variantes del VPH16 en carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas y

carcinomas adenoescamosos, en muestras provenientes de Europa, Asia, África, Norte, Centro y Sur América; contrario a nuestro resultado, los autores encontraron la variante europea A 1/3, y en menor proporción la variante NA/AA D3 en las muestras provenientes de países de Centro y Sur América (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, Honduras, Paraguay, Perú y Venezuela) dentro de este grupo también incluyeron las muestras provenientes de México [Nicolás-Párraga et al., 2017]. Esta discordancia podría explicarse por múltiples factores, como las características geográficas de los países que fueron agrupados, las cuales difieren unas de otras, la histología, e inclusive las características de la población que fue evaluada, ya que los autores no tuvieron acceso a los antecedentes genéticos de las participantes, ni a los datos sobre la identidad étnica, lo que podría haber ayudado a comprender la relación entre las variantes virales y las poblaciones humanas. Adicionalmente a causa de la baja cantidad de muestras que caracterizamos posiblemente no detectamos otras variantes que pudiesen estar circulando en el país.

Con frecuencias similares ambas variantes fueron identificadas en carcinomas epidermoides, y solo una variante NA/AA en un adenocarcinoma, consistente con lo reportado por Tábora y colaboradores [Tábora et al., 2010]. Otros países como China, México, Italia, Estados Unidos y Brasil concuerdan en que la variante NA/AA se asocia mayormente con los adenocarcinomas o con presentaciones más agresivas de cáncer; por el contrario la variante EAS se reporta en carcinomas de células escamosas o en lesiones de menor grado [Berumen et al., 2001; Freitas et al., 2014; Nicolás-Párraga et al., 2017; Quint et al., 2010; Sun et

al., 2013; Tornesello et al., 2011]. Esta asociación se ha explicado por algunos autores, como consecuencia de polimorfismos específicos en la región reguladora de las variantes del NA/AA D, lo que resultaría, en la expresión génica viral en forma acelerada [Chan et al., 1989].

La identificación, descripción y comprensión de las variantes del VPH16 resulta importante, ya que el conocer las variantes y sus sublinajes circulantes en los países de Centro y Sur América, podría brindar información para el desarrollo de vacunas contra variantes específicas del VPH16 en estos países. Lo anterior podría evitar una eficacia reducida al emplearse vacunas con variantes que no están presentes en alta frecuencia en la región latinoamericana. Por lo tanto, además de los tipos de VPH, la prevalencia de las variantes del VPH16 debe ser algo a considerar al momento de seleccionar e implementar las vacunas en los países de la región [Alfaro et al., 2016; Nicolás-Párraga et al., 2017].

Está comprobado que la mayoría de los cánceres y lesiones cervicales son producidas por la infección de tipo persistente del VPH de alto riesgo; sin embargo, ocurren casos donde los resultados histopatológicos no concuerdan con la detección del ADN del VPH, mostrando lesiones de alto grado con resultados VPH negativos, generando confusión en la toma de decisiones y manejo de estos casos. Por esta razón, en 2012, el Colegio de Patólogos Americanos y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical recomendaron expandir el uso del biomarcador p16^{INK4a} para clasificar de forma inequívoca las lesiones cervicales [Darragh et al., 2012]. Para tener nuestra propia experiencia nos propusimos

evaluar el desempeño de la tinción de p16^{INK4a} en biopsias cervicales de mujeres hondureñas, VPH positivas/negativas identificando lesiones tipo NIC 2.

Encontramos que el 100% de las muestras con diagnóstico histológico inicial negativo de displasia y NIC 1 resultaron negativos en la tinción, caso contrario, los casos NIC 2 obtuvieron un resultado positivo en la detección de la expresión de p16^{INK4a}. Estos resultados son comparables a los obtenidos por investigadores de muchas regiones del mundo, quienes han evaluado el rol de la proteína p16^{INK4a} como biomarcador celular, ya sea como método de tamizaje, o triaje en conjunto con la citología o con pruebas que detecten el ADN del VPH [Bergeron et al., 2015; Deschoolmeester et al., 2010; Doeberitz et al., 2012; Kim et al., 2015; Lim et al., 2016]. Asimismo, estudios llevados a cabo en el continente asiático han logrado evidenciar la utilidad clínica de la proteína p16^{INK4a} con una alta sensibilidad y moderada especificidad en la detección de lesiones cervicales precancerosas y cáncer, mostrando su potencial como método de tamizaje en esta población. Por su parte, algunas investigaciones en este continente sugieren que su utilidad es aún mayor que la genotipificación del VPH [Kim et al., 2015; Lim et al., 2016; Nishio et al., 2013; Yu et al., 2016]. De hecho, en Europa, Gustinucci y colaboradores han reflejado la pobre utilidad de esta técnica en la detección de lesiones de bajo grado ya que su principal beneficio radica en que su expresión se da en las lesiones de alto grado, indicando ser un excelente marcador en especial cuando hay discordancia patológica [Gustinucci et al., 2012; Kisser and Zechmeister-Koss, 2015]. Del mismo modo, la utilidad de la tinción en la uniformidad del diagnóstico ha sido evaluada por Reushenbach y colaboradores,

obteniendo mejores resultados al utilizar la citología en conjunto con p16^{INK4a} [Reuschenbach et al., 2014].

En Centro América, Wang y colaboradores, validaron la proteína p16^{INK4a} como biomarcador en un estudio de cohorte en Costa Rica; similar a nuestro estudio, en el que destacan el potencial diagnóstico de la prueba. Sin embargo, también señalan la necesidad de desarrollar nuevos estudios para determinar la utilidad pronóstica de este marcador [Wang et al., 2004]. En su estudio, Allia y colaboradores destacan la buena reproducibilidad y especificidad de la prueba realizada inclusive por personal no experto [Allia et al., 2015].

Sin embargo, si bien la evidencia científica indica la gran utilidad clínica que muestra la implementación de la proteína p16^{INK4a} como técnica de triaje, algunos investigadores sugieren la incorporación de otros biomarcadores para el pronóstico de la enfermedad, atribuyendo la dificultad en la interpretación de sus resultados, lo cual produciría efectos contrarios a su implementación [Zheng et al., 2014]. Por ende, los errores en el establecimiento de la técnica podrían generar un sobre-diagnóstico; por lo tanto, es necesario una interpretación estandarizada así como guías suplementarias que ayuden a clarificar la interpretación y ejecución de este biomarcador [Clark et al., 2016].

Investigaciones a nivel mundial, han demostrado que el VPH es un factor de riesgo necesario, pero no el único para el desarrollo de lesiones cervicales, no obstante alrededor del 80% de estas infecciones son de tipo transitorias, logrando ser eliminadas a causa de la respuesta inmunológica. Las mujeres con infecciones

persistentes por los tipos oncogénicos, presentan mayor riesgo de desarrollar lesiones NIC 2+ [Manawapat et al., 2012], como consecuencia, la OPS/OMS ha desarrollado directrices sobre tamizaje y tratamiento de las lesiones precancerosas para la prevención del cáncer cervicouterino, en las que sugieren repetir el tamizaje al cabo de tres años, a las mujeres VPH positivas con resultados colposcópicos negativos.

Al ser nuestro estudio el primero en dar seguimiento a mujeres VPH positivas, 18 meses después del tamizaje; nos propusimos identificar la persistencia, recurrencia o eliminación de las infecciones por VPH de alto riesgo, considerando únicamente la infección del virus para la clasificación.

Nuestro análisis revela una persistencia de virus oncogénicos en el 18% de las mujeres en seguimiento; en cambio, las infecciones recurrentes se presentaron en menor porcentaje con un 14%, y la eliminación se detectó en el 58% de las mujeres. Nuestros hallazgos son congruentes con la historia natural del VPH, donde se ha demostrado que generalmente las infecciones se resuelven a los pocos meses después de su adquisición [Woodman et al., 2007].

En la presente investigación, 10% de muestras VPH positivas por hC2 no se lograron tipificar al no lograr su amplificación. Según nuestro análisis de causalidad, esta discordancia radica en el hecho del largo tiempo de almacenamiento de las muestras (2.5 años) en el medio de transporte PreservCyt, lo cual podría generar la degradación del ADN. Otro estudio que comparte esta observación es el de Castle y colaboradores, donde al evaluar la estabilidad del

ADN del VPH en el medio PreserCyt tanto por PCR y captura de híbridos en muestras almacenadas por más de 5 años encontraron que el 15% de los especímenes no se lograron amplificar por PCR [Philip E. Castle et al., 2003]. El estudio de Negri y colaboradores, estudió los efectos del almacenamiento de los especímenes preservados en PreservCyt, conservados a temperatura ambiente por un periodo de 2 años y medio, a través de hC2, encontrando una reducción de casi 5 veces en unidades relativas de luz [Negri et al., 2004]. La principal hipótesis del porqué el ADN se degrada en este medio de transporte recae en el largo periodo de almacenamiento de las muestras; la exposición de las células al alcohol por periodos largos de tiempo probablemente genera una deshidratación progresiva de las mismas, lo que conlleva a la reducción de la solubilidad de las proteínas, haciendo más difícil su lisis durante la extracción del ADN [Agreda et al., 2013].

Por otra parte, y en discrepancia con nuestra investigación, el estudio realizado por Agreda y colaboradores, encontraron estabilidad en el ADN del VPH almacenado en PreservCyt por más de 2.5 años. Sugerimos como posible causa de dicha estabilidad en la muestra el hecho de que los investigadores almacenaron inmediatamente las muestras entre 2 °C y 8 °C, evitando exponerlas a temperatura ambiente tal y como sugiere el fabricante [Agreda et al., 2013].

Al igual que en otros estudios, en nuestro trabajo el VPH 16 fue el más prevalente, seguido del 31 y 59 en infecciones persistentes [Banura et al., 2010; Miranda et al., 2013; Nielsen et al., 2010]. Este hallazgo reitera al VPH16 como el principal tipo oncogénico presente en el país, enfatizando su participación en el desarrollo

de lesiones cervicales entre las mujeres hondureñas. Opuesta a nuestra observación, León y colaboradores reportaron los tipos virales 18 y 31 en infecciones persistentes en mujeres colombianas seguidas durante 2 años [León et al., 2014]; dicha incongruencia podría explicarse por la variabilidad de los tipos virales presentes en cada país. Otro punto a considerar sería que la población estudiada por León y colaboradores incluyó a mujeres menores de 30 años, quienes suelen presentar mayor variabilidad en las infecciones por VPH.

El análisis de nuestro estudio muestra que el 87.5% de las infecciones persistentes desarrollaron lesiones tipo NIC 2+, incluyendo un carcinoma con infiltración del cuello uterino, el cual no fue detectado en la visita de reclutamiento. En consonancia con nuestro análisis, Rodríguez y colaboradores, demuestran que el riesgo de desarrollar lesiones tipo NIC 2+ aumenta en mujeres con infecciones por el VPH 16 que han persistido por al menos 12 meses [Rodríguez et al., 2008]. Manawapat y colaboradores, demuestran que cargas virales bajas, en conjunto con la integración del genoma viral, son factores predictivos para la persistencia del ADN de VPH 16 [Manawapat et al., 2012].

Adicionalmente, nuestro análisis mostró que el 45% de las infecciones persistentes se encontraron en mujeres jóvenes (30- 39 años), esta relación podría deberse a la mejor respuesta de la memoria inmunológica en las mujeres mayores, como consecuencia de la exposición a más tipos virales, logrando eliminar las infecciones. Igualmente Sammarco y colaboradores, demostraron que las mujeres jóvenes mantienen infecciones persistentes, a diferencia de las mujeres mayores, quienes si logran eliminar las infecciones [Sammarco et al.,

2013]. En contraste, Castle y colaboradores, reportan que la persistencia incrementa con la edad [Castle et al., 2011].

Por el contrario, se encontró que el 66.6% de las lesiones de bajo grado (NIC 1), provino del grupo de mujeres clasificadas con infección recurrente. Estas infecciones son causadas por distintos tipos virales oncogénicos; las reinfecciones por el VPH se relacionan con el comportamiento sexual de las mujeres [Woodman et al., 2007].

En conclusión, el cáncer cervicouterino es una de las amenazas más serias para la vida de las mujeres hondureñas; muchas de ellas no han sido diagnosticadas y mucho menos tienen acceso a un tratamiento que podría curarlas o prolongarles la vida. Como resultado, nuestros hallazgos sugieren enfoques prometedores como triaje y seguimiento de la persistencia de virus oncogénicos a las mujeres VPH positivas al tamizaje primario. Estos planteamientos podrían en un futuro aportar opciones a las autoridades del Sistema de Salud Nacional para convertir en realidad la esperanza de que toda mujer se someta a pruebas de detección de cáncer cervical al menos una vez en la vida y lograr reducir considerablemente la morbilidad y mortalidad por esta patología en el país.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que:

1. Se evalúa por primera vez en el país en un estudio piloto, una prueba de triaje que detecta la oncoproteína E6 del VPH 16/18, la cual evidenció la asociación entre la expresión de la oncoproteína E6 del VPH y el desarrollo de NIC 2+. Destacamos, que la detección de esta proteína por medio de la prueba OncoE6, podría ser una metodología de triaje para evaluar a mujeres VPH positivas que presentan mayor riesgo de desarrollar lesiones cervicales, de las que solo están infectadas con el virus; poniendo de manifiesto su posible utilidad clínica en estos casos.
2. Identificamos las variantes del VPH16, y por primera vez en el país se conoció los sublinajes circulantes entre las mujeres hondureñas. Encontramos que las variantes Europea sublinaje A1/2 y Asiático-Americana sublinaje D3 continúan circulando en el país. Adicionalmente, confirmamos una marcada prevalencia de la variante EAS con respecto a NA/AA, lo que podría ser un punto de partida en el apoyo en el desarrollo de vacunas utilizando variantes específicas.
3. Mostramos una posible utilidad clínica de la proteína p16^{INK4a} como método de triaje, como adjunto a pruebas que detectan el ADN del VPH de alto riesgo. Presentamos evidencia de su capacidad de diferenciación entre lesiones negativas/NIC 1 de las lesiones NIC 2, lo que lograría evitar el

sobretratamiento en mujeres con resultados falsos positivos en colposcopia e histología.

4. Los resultados presentados muestran que las mujeres con infecciones persistentes por más de 18 meses por VPH de alto riesgo, podrían tener una mayor probabilidad de desarrollar lesiones tipo NIC 2+; por consiguiente, el seguimiento debería ser más frecuente entre este grupo de mujeres.

CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

- Se recomienda implementar la detección de la oncoproteína E6 como método de triaje en los Sistemas de Tamizaje Nacional. Su elevada sensibilidad y especificidad en la detección de lesiones precancerosas y cáncer de cuello uterino, causadas por los tipos VPH 16/18, la convierte en un biomarcador ideal. Además, su bajo costo en comparación con la citología o pruebas que detecten el VPH, hacen de la prueba un candidato idóneo sobre todo en países como Honduras, donde se busca la implementación de nuevas estrategias a corto plazo.
- Recomendamos la socialización de la utilidad diagnóstica de los métodos de triaje existentes en el país como la tinción de p16^{INK4a}, a los médicos y personal de salud en general; así como la capacitación continua de los profesionales en salud, ya que el éxito de su implementación radicará en la correcta interpretación mediante el uso de guías suplementarias.
- Ya que la detección del ADN-VPH presenta una mayor sensibilidad en comparación a la citología, recomendamos su utilización como estrategia de seguimiento a las mujeres VPH positivas en tamizaje. El seguimiento a las mujeres con tipos oncogénicos permitiría detectar en la colposcopia mayor cantidad de lesiones cervicales; se pretende que en el futuro estas estrategias puedan ser incorporadas como métodos de prevención y seguimiento a las mujeres VPH positivas en el país.

- Una de las principales limitaciones con la que nos encontramos en el estudio, fue la dificultad en el seguimiento de las participantes. Lo anterior, como resultado del cambio de domicilio o teléfono celular; adicionalmente, algunas de ellas se mostraron renuentes al seguimiento. Por lo tanto, fue necesario la implementación de búsquedas activas mediante trabajo de campo, a través de la dirección que fue proporcionada por las participantes en los formularios de datos personales.
- Otro de los inconvenientes radicó en la genotipificación del VPH. Según se ha visto, el alcohol presente en el medio de transporte PreservCyt interfiere con la extracción del ADN del VPH, si no se refrigera inmediatamente entre 2 °C y 8 °C. No obstante, es importante mencionar que la adecuada toma y manejo de las muestras cervicales son aspectos cruciales al momento de ejecutar pruebas moleculares, puesto que existen muchos inhibidores que podrían afectar el resultado y la interpretación de las mismas.
- Un factor importante es la comprensión del porqué algunas mujeres logran eliminar el VPH y otras no, lo cual aún es punto de discusión. Por lo tanto, identificar qué factores de riesgo presentan las mujeres con infecciones persistentes y su asociación con la carga viral, podría ser un nuevo punto a investigar.

CAPÍTULO 8. Referencias

- American Cancer Society. 2014. ¿Qué es cáncer de cuello uterino (cervical)? Obtenido de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/prevencion-y-deteccion-temprana/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>.
- American Cancer Society. 2015. ¿Cuáles son los factores de riesgo del cáncer de cuello uterino? Obtenido de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>.
- Agreda PM, Beitman GH, Gutierrez EC, Harris JM, Koch KR, LaViers WD, Leitch SV, Maus CE, McMillian RA, Nussbaumer WA, Palmer MLR, Porter MJ, Richart GA, Schwab RJ, Vaughan LM. 2013. Long-term stability of human genomic and human papillomavirus DNA stored in BD SurePath and Hologic PreservCyt liquid-based cytology media. *Journal of clinical microbiology* 51(8):2702-2706.
- Aguilara IBM, Mendozaa LO, Garcíab O, Díaza I, Figueroac J, Duarte RM, Perdomod G, Garciae AGF, Janusze CB. 2015. Analyse coût-efficacité de l'introduction du vaccin contre le virus du papillome humain au Honduras. *Vaccine* 17021:1-8.
- Alfaro A, Juárez-Torres E, Medina-Martínez I, Mateos-Guerrero N, Bautista-Huerta M, Román-Bassaure E, Villegas-Sepúlveda N, Berumen J. 2016. Different Association of Human Papillomavirus 16 Variants with Early and Late Presentation of Cervical Cancer. *PLoS One* 11(12):1-13.
- Almonte M, Murillo R, Sánchez GI, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, Lazcano-Ponce E, Herrero R. 2010. Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Salud Publica Mex* 52(6): 544-559.
- Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, Macr L, Fiorito C, Maletta F, Deambrogio C, Tunesi S, Marco LD, Gillio-Tos A, Sapino A, Ghiringhello B. 2015. Interpretation of p16(INK4a) /Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer cytopathology* 123(4):212-218.
- Banura C, Sandin S, Doorn L-Jv, Quint W, Kleter B, Wabwire-Mangen F, Mbiddeand EK, Weidpass E. 2010. Type-specific incidence, clearance and predictors of cervical human papillomavirus infections (HPV) among young women: a prospective study in Uganda. *Infectious agents and cancer* 7(1):1-12. doi: 10.1186/1750-9378-5-7.
- Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, Doeberitz MvK. 2015. The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer* 136(12):2741-2751.
- Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, Doorslaer Kv, Hausen Hz, Villiers E-Md. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401(1):70-79.
- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Carranca AG, Gonzalez-Lira G, Campa AM-dl. 2001. Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case–Control Study. *J Natl Cancer Inst* 93(17):1325-1330.

- Blatt AJ, Kennedy R, Luff RD, Austin RM, Rabin DS. 2015. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices. *Cancer Cytopathology* 123(5):282-288.
- Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, Prins F, P.Malinowski D. 2012. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. *J Oncol* 289315:1-11. doi: 10.1155/2012/289315.
- Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, Brotons M, Mena M, Cosano R, Muñoz J, Bosch F. 2015. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Obtenido de <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.
- Brunia L, Serranoa B, Boscha X, Castellsagué X. 2015. Human papillomavirus vaccine. Efficacy and safety. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 33(5):342-354.
- Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Morales J, Ryzak G, Schiffman M. 2011. Longterm persistence of prevalently detected human papillomavirus infections in the absence of detectable cervical precancer and cancer. *J Infect Dis* 203(6):814-822.
- Clark JL, Lu D, Kalir T, Liu Y. 2016. Overdiagnosis of HSIL on cervical biopsy: errors in p16 immunohistochemistry implementation. *Hum Pathol* 55:51-56. doi: 10.1016/j.humpath.2016.04.010.
- Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, Tommasino M, Clifford GM. 2012. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 86(12):6855-6861.
- Cruz GL, Diego OdJB. 2005. Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. *Rev Cubana Obstet Ginecol* 31(1):1-8.
- Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. 2006. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int. J. Cancer* 119(5):1095-1101.
- Chan WK, Klock G, Bernard HU. 1989. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol* 63:3261-3269.
- Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Ronald D. Luff, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Mark H. Stoler, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC. 2012. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 136: 1266-1297.
- Delgado RC, Aguado JJH, Río ÁSD, Majà JO. 2014. Valor de p16 en el cribado y diagnóstico de las lesiones del cérvix uterino. Asociación española de patología cervical y colposcopia. Obtenido de https://www.seap.es/documents/10157/287128/p16_cribado.pdf.

- Deschoolmeester V, Marck VV, Baay M, Weyn C, Vermeulen P, Marck EV, Lardon F, Fontaine V, Vermorken JB. 2010. Detection of HPV and the role of p16INK4A overexpression as a surrogate marker for the presence of functional HPV oncoprotein E7 in colorectal cancer. *BMC Cancer* 10(117):1-10
- Doeberitz MvK, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C. 2012. Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16INK4a to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics* 9(2): 149-163.
- Doorslaer KV, Burk RD. 2010. Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res* 77:41-62. doi: 10.1016/B978-0-12-385034-8.00002-8.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136(5):359-386.
- Ferrera A, Tábora N, Flores Y, Zelaya A, LeonMassuger, WillemJ.G.Melchers. 2011. Assessment of HPV infection among female university students in Honduras via Roche linear array. *Int J Gynaecol Obstet* 113(2):96-99.
- Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA, Claros JM, Barahona OD, J.G.Melchers W. 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 JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA, Claros JM, Barahonad Od, Melcherse WJ. 2000. Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol* 29:817-825.
- Freitas LB, Chen Z, Muqui EF, Boldrini NAT, Miranda AE, Spano LC, Burk RD. 2014. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One* 9(7):1-7.
- Ghittoni R, Gheit T, Accardi R, Sylla B, Hasan U, Tommasino M. 2010. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40(1):1-13.
- GLOBOCAN. 2012. Estimated Cancer incidence, mortality and prevalence Worldwide in 2012. 2015(Noviembre). Obtenido de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- Grillo-Ardila CF, Martínez-Vélazques MY, Morales-López B. 2008. Virus del papiloma humano: aspectos moleculares y cáncer de cérvix. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol* 59(4):1-6.
- Guardado-Estrada M, Juárez-Torres E, Román-Bassaure E, Medina-Martinez I, Alfaro A, Benuto RE, Dean M, Villegas-Sepulveda N, Berumen J. 2014. The distribution of high-risk human papillomaviruses is different in young and old patients with cervical cancer. *PLoS One* 9(10):1-12.
- Gustinucci D, Passamonti B, Palmieri EA, D'Amico MR, Malaspina M, Spita N, Bulletti S, D'Angelo V, Butera ECaD, Carlanì A, Dato ED, Tintori B, Fulciniti F. 2012. Role of p16(INK4a) cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women within an organized cervical cancer screening program. *Acta Cytol* 56(5):506-514.

- Hernández MdAR, Menéndez MH. 2001. Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Onco* 17(1):65-71.
- IARC. 2003. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical. Manual para principantes. Obtenido de <http://screening.iarc.fr/colpo.php?lang=3>.
- IARC. 2015. Introducción a neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Obtenido de <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=2>.
- Ibeanu OA. 2011. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther*. 11(3):295-306.
- Jiang P, Yue Y. 2014. Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). *Exp Ther Med* 7(1):3-7.
- Kim TH, Han JH, Shin E, Noh JH, Kim HS, Song YS. 2015. Clinical Implication of p16, Ki-67, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Cervical Neoplasia: Improvement of Diagnostic Accuracy for High-grade Squamous Intraepithelial Lesion and Prediction of Resection Margin Involvement on Conization Specimen. *J Cancer Prev* 20(1):70-77.
- Kisser A, Zechmeister-Koss I. 2015. A systematic review of p16/Ki-67 immuno-testing for triage of low grade cervical cytology. *BJOG* 122(1):64-70.
- Klug SJ, Molijn A, Schopp B, Holz B, Iftner A, Quint W, Snijders PJF, Petry K-U, Kjær SK, Munk C, Iftner T. 2008. Comparison of the performance of different HPV genotyping methods for detecting genital HPV types. *J Med Virol* 80(7):1264-1274.
- León SCS-D, Río-Ospina LD, Camargo M, Sánchez R, Moreno-Pérez DA, Pérez-Prados A, Patarroyo ME, Patarroyo MA. 2014. Persistence, clearance and reinfection regarding six high risk human papillomavirus types in Colombian women: a follow-up study. *BMC Infectious Diseases* 14(395):1.12.
- Lim S, Lee MJ, Cho I, Hong R, Lim SC. 2016. Efficacy of p16 and Ki-67 immunostaining in the detection of squamous intraepithelial lesions in a high-risk HPV group. *Oncology letters* 11(2):1447-1452.
- Lizano-Soberón M, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A. 2009. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología* 4:205-216.
- Longworth MS, Laimins LA. 2014. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol* 68(2):362-372.
- Manawapat A, Stubenrauch F, Russ R, Munk C, Kjær SK, Iftner T. 2012. Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *Am J Cancer Res* 2(2):192-203.
- Maniar KP, Sanchez B, Paintal A, Gursel DB, Nayar R. 2015. Role of the Biomarker p16 in Downgrading -IN 2 Diagnoses and Predicting Higher-grade Lesions. *Am J Surg Pathol* 39(12):1708-1718. doi: 10.1097/PAS.0000000000000494.
- Mantovani F, Banks L. 2009. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant carcinogenesis. *J Med Res* 13:286-295.
- Mariano VS, Lorenzi AT, Scapulatempo-Neto C, Stein MD, Resende JCP, Antoniazzi M, Villa LL, Levi JE, Longatto-Filho A, Fregnani JHTG. 2016. A Low-Cost HPV

- Immunochromatographic Assay to Detect High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *PLoS One* 11(10):1-12.
- Martínez ROS, Romero YRD, Pérez CJU, Díaz LA. 2004. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol* 55(2):146-160.
- McDougall JK, Beckmann AM, Kiviat NB. 1986. Methods for diagnosing papillomavirus infection. *Ciba Found Symp*:120-186. doi: 10.1002/9780470513309.ch7.
- Miranda PM, Silva NNT, Pitol BCV, Silva IDCG, Lima-Filho JL, Carvalho RF, Stocco RC, Beçak W, Lima AA. 2013. Persistence or clearance of human papillomavirus infections in women in Ouro Preto, Brazil. *Biomed Res Int*:1-6. doi: 10.1155/2013/578276.
- Münger K, Howley PM. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89(2):213-228.
- Münger K YCL, Phelps W C, Pietenpol J A, Moses H L, Howley P M. . 2001. Biochemical and Biological Differences between E7 Oncoproteins of the High- and Low-Risk Human Papillomavirus Types Are Determined by Amino-Terminal Sequences. *J Virol* 65(7):3943-3948.
- Negri G, Rigo B, Vittadello F, Egarter-Vigl E, Mian C. 2004. Human papillomavirus typing with hybrid capture II on archived liquid-based cytologic specimens: is HPV typing always reproducible?. *Am J Clin Pathol* 122:90-93.
- Nicolás-Párraga S, Alemany L, Sanjosé Sd, Bosch FX, Bravo IG. 2017. Differential HPV16 variant distribution in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 140(9):2092-2100.
- Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Osler M, Iftner T. 2010. Persistence of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women. *J Med Virol* 82(4):616-623.
- Nishio S, Takuma Fujii, Kubushiro K, Nishio H, Aoki D, Kameyama K, Saito M, Iwata T. 2013. p16(INK4a) immunohistochemistry is a promising biomarker to predict the outcome of low grade cervical intraepithelial neoplasia: comparison study with HPV genotyping. *J Gynecol Oncol* 24(3):215-221.
- Obstetricia SEdGy. 2003. Documento de Consenso, La infección por VPH.
- Ochoa Carrillo FJ, Guarneros de Regil DB, Velasco Jiménez MT. 2015. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gaceta Mexicana de Oncología* 14(3):157-163.
- OMS. 2016. Vacunas definición. Obtenido de <http://www.who.int/topics/vaccines/es/>.
- Ovalle L, Palma S, Rosales P, Haeussler R, Lavidalie J, Rodas EJÁ. 2015. Manual para tamizaje del cancer cervicouterino Campus Virtual de Salud Pública: Organización Panamericana de la Salud. p 1-46.
- Pastuszek-Lewandoska D, Bartosinska-Dyc A, Migdalska-Sek M, Czarnecka KH, Nawrot E, Domanska D, Szylo K, Brzezianska E. 2014. HPV16 E6*II gene expression in intraepithelial cervical lesions as an indicator of neoplastic grade: a pilot study. *Medical oncology Med Oncol* 31(842):835-842.
- Pelea CL. 2003. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Rev Esp Patol* 36(1):5-10.

- Philip E. Castle, Diane Solomon M, Allan Hildesheim, Herrero R, Bratti C, Sherman ME, Rodriguez AC, Alfaro M, Hutchinson ML, Dunn T, Kuypers J, Mark Schiffman. 2003. Stability of archived liquid-based cytologic specimens. *Cancer* 99(2):89-96.
- Pol SBV, Klingelhutz AJ. 2013. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445(1-2):115-137.
- Poljak M, Kovanda A, Kocjan BJ, Seme K, Jančar N, Vrtačnik-Bokal E. 2009. The Abbott RealTime High Risk HPV test: comparative evaluation of analytic specificity and clinical sensitivity for cervical carcinoma and CIN 3 lesions with the Hybrid Capture 2 HPV DNA test. *Acta Dermatoven Alp Pannonica Adriat* 18:94-103.
- Qmichou Z, Khyatti M, Berraho M, Ennaji MM, Nejari LBC, Benjaafar N, Benider A, Attaleb M, Mzibri ME. 2013. Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women. *BMC Infectious Diseases* 13:368-378.
- Quint KD, Koning MNCd, Doorn L-Jv, Quint WGV, Pirog EC. 2010. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 117(2):297-301.
- Regenmortel V, Fauquet C, Bishop D, Carstens E, Estes M, SLeomon, Maniloff J, Mayo A, McGeoch D, Pringle C. 2000. Classification and Nomenclature of Viruses Seventh Report of the International Committee on Taxonomy Viruses. Academic Press, Inc, San Diego, California. *Virus Taxonomy*. ISBN-13: 978-0123702005.
- Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, Doeberitz MvK, Arbyn M. 2014. p16INK4a immunohistochemistry in cervical biopsy specimens: A systematic review and meta-analysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol* 142(6):767-772.
- Ríos J RM. 2010. El virus del papiloma humano y su relación con el cáncer cutáneo no melanoma. *Rev méd cient* 23(2):33-44.
- Risch NJ. 2000. Searching for genetic determinants in the new millennium. *NATURE* 405:847-856.
- Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R, H. AL. 2006. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol* 71(2):135-140.
- Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, Solomon D, Burk R. 2008. Rapid Clearance of Human Papillomavirus and Implications for Clinical Focus on Persistent Infections. *J Natl Cancer Inst* 100(7):513-517.
- Roh J-W, Kim M-H, Kim J-W, Park N-H, Song Y-S, Kang S-B, Lee H-P. 2001. Polymorphisms in codon 31 of p21 and cervical cancer susceptibility in Korean women. *Cancer Lett* 165(1):59-62.
- Romana A, Mungerc K. 2013. The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445:138-168.
- Saavedra A L SML. 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*:31-55.
- Sahasrabudde VV, Luhn P, Wentzensen N. 2011. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. *Future Microbiol* 6(9):1-25.
- Sammarco ML, Riccio ID, Tamburro M, Grasso GM, Ripabelli G. 2013. Type-specific persistence and associated risk factors of human papillomavirus infections in women living in central Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 168(2):222-226.

- Schweizer J, Lu PS, Mahoney CW, Berard-Bergery M, Ho M, Ramasamy V, Silver JE, Bisht A, Labiad Y, Peck RB, Lim J, Jeronimo J, Howard R, Gravitt PE, Castle PE. 2010. Feasibility study of a human papillomavirus E6 oncoprotein test for diagnosis of cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol* 48(12):4646–4648.
- Sierra-Torres CH, Arboleda-Moreno YY, Orejuela-Aristizabal L. 2006. Exposure to wood smoke, HPV infection, and genetic susceptibility for cervical neoplasia among women in Colombia. *Environ Mol Mutagen* 47(7):553-561.
- Sun Z, Lu Z, Liu J, Wang G, Zhou W, Yang L, Liu C, Wang B, Ruan Q. 2013. Genetic variations of E6 and long control region of human papillomavirus type 16 from patients with cervical lesion in Liaoning, China. *BMC Cancer* 13:1-8.
- Tábora N, Ferrera A, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG. 2008. High HPV 16 Viral Load is Associated with Increased Cervical Dysplasia in Honduran Women. *Am J Trop Med Hyg* 78(5):843-846.
- Tábora N, J.G W, Melchers, Doorn L-Jv, Quint W, Ferrera A. 2010. Molecular Variants of HPV Type 16 E6 Among Honduran Women. *Int J Gynecol Cancer* 20(3):323-328.
- Takashi Y, Wheeler; CM, Halpern; AL, Stewart; A-CM, Hildesheim; A, Jenison SA. 1995. Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages in United States Populations Characterized by Nucleotide Sequence Analysis of the E6, L2, and L1 Coding Segments. *J Virol* 69(12):7743–7753.
- Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, Buonaguro L, Buonaguro FM. 2011. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic oncology* 121(1):32-42.
- Velema J FA, Figueroa M, Bulnes R, Toro L A de Barahona, O Claros J M, Melchers W J. 2002. Burning wood in the kitchen increases the risk of cervical neoplasia in HPV-infected women in Honduras. *Int J Cancer* 97(4):536-541.
- Velema JP, Ferrera A, Claros JM, Figueroa M, Melchers WJG. 2002. Burning wood in the kitchen increases the risk of cervical neoplasia in HPV-infected women in Honduras. *Int. J. Cancer* 97(4):536-541.
- Villiers E-Md, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, Hausen Hz. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S. 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 20:4740-4749.
- Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Bratti MC, Wright T, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, Christina von Knebel Doeberitz, Ridder R, Doeberitz MvK. 2004. Validation of p16INK4a as a Marker of Oncogenic Human Papillomavirus Infection in Cervical Biopsies from a Population-Based Cohort in Costa Rica. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 13(8):1355–1360.
- Wechslera EI, Wanga Q, Roberts I, Pagliaruloa E, Jacksona D, Unterspergera C, Colemanb N, Griffina H, Doorbar J. 2012. Reconstruction of human papillomavirus type 16-mediated early-stage neoplasia implicates E6/E7

- deregulation and the loss of contact inhibition in neoplastic progression. *J. Virol* 86(11):6358-6364.
- Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7(1):11-22.
- Yi JW, Jang M, Kim SJ, Kim SS, Rhee JE. 2013. Degradation of p53 by natural variants of the E6 protein of human papillomavirus type 16. *Oncol Rep* 29(4):1617-1622.
- Yu L-L, Chen W, Lei X-Q, Qin Y, Wu Z-N, Pan Q-J, Zhang X, Chang B-F, Zhang S-K, Guo H-Q, Qiao Y-L. 2016. Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China. *Oncotarget* 7(16):21181-21189.
- Zhang G, Yang B, Abdul-Karim FW. 2015. p16 Immunohistochemistry is useful in confirming high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. *Int J Gynecol Pathol* 34(2):180-186.
- Zhao C, Yang H, Li Z. 2014. Cytopathology and More | Evidence emerging for HPV-negative cervical cancer. *Captodayonline*. Obtenido de <http://www.captodayonline.com/cytopathology-and-more-evidence-emerging-for-hpv-negative-cervical-cancer/>.
- Zhao F-H, Jeronimo J, Qiao Y-L, Schweizer J, Chen W, Valdez M, Lu P, Zhang X, Kang L-N, Bansil P, Paul P, Mahoney C, Berard-Bergery M, Bai P, Peck R, Li J, Chen F, Stoler MH, Castle PE. 2013. An evaluation of novel, lower-cost molecular screening tests for human papillomavirus in rural China. *Cancer Prev Res* 6(9):938-948.
- Zheng Z-M, Lin J, Albers AE, Qin J, Kaufmann AM. 2014. Prognostic Significance of Overexpressed p16INK4a in Patients with Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9(9):1-7.
- Zur-Hausen. 1996. Papillomavirus infeccions, a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*(2):55-78.

ANEXOS

Anexo 1. Solicitud de ética aprobada por el Comité de Ética de la IARC.

International Agency for Research on Cancer



150 cours Albert Thomas
69372 Lyon cedex 08, France
IARC Ethics Committee (IEC)
Tel.: +33 4 72 73 83 41
E-mail: iec-secretariat@iarc.fr
<http://ethics.iarc.fr/>

Dr Rolando Herrero
Prevention and Implementation Group (PRI)
IARC

Date: 18 February 2016

Ref.: IEC Expedite Approval

Dear Dr Herrero,

Please note that the amended version of the protocol (v3.1) on project **12-27**:

**Multicentric study of cervi Multicentric study of cervical cancer screening and triage
with human papilloma virus testing (ESTAMPA)**

was reviewed by the IEC Chair and Vice-Chair through the expedite review procedure.

As there are no ethical issues to consider, the decision of the IEC is as follows:

This project is approved.

Yours sincerely,

Dr B. Fervers
Chair, IARC Ethics Committee

Anexo 2. Solicitud de ética aprobada por el Comité de Ética en investigación (CEIB).



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIDAD DE INVESTIGACION CIENTÍFICA
COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION BIOMEDICA



CONFIDENCIAL

CONSTANCIA

Por este medio El Comité de Etica en Investigación Biomédica (CEIB), de la Unidad de Investigación Científica (UIC), con **Registro N° IRB 00003070** hace **CONSTAR** que el proyecto de investigación:

“Estudio de tamizaje y triage de cáncer de cuello uterino con pruebas del virus del papiloma humano” (ESTAMPA). Estudio- Honduras

Presentado por: Dra. Annabelle Ferrera.

Institución (es): Escuela de Microbiología UNAH, Programa de Enfermedades Crónicas y Cáncer Secretaria de salud. Grupo de Prevención e Implementación Sección de Detención Temprana y Prevención (PRI/EDP)

Fue sometido a un proceso de análisis la solicitud de prórroga por un año más, aprobándose la **segunda** prórroga a partir del **30 de octubre 2015**.

Conforme a las Normas Éticas Nacionales e Internacionales Vigentes.

Para los fines que al interesado (a) convenga se extiende la presente a los **29** días del mes de **enero 2016**.


Dra. Eleonora Espinoza
Secretaría CEIB-FCM



Anexo 3. Solicitud de ética aprobada por el Comité de Ética en investigación CEI-MEIZ.



UNAH

FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

**CONSTANCIA DE RESOLUCIÓN
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN No. 09-2014**

Por este medio el Comité de Ética de Investigación de la Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

Título del proyecto: "Evaluación de proteína E6 de VPH 16/18 como un biomarcador para la detección del cáncer de cuello uterino en Honduras"

Equipo de Investigación: Anabelle Ferrera (Investigadora principal), Elmer Turcios y Brenda Salgado (Co-Investigadores), Wendy Valladares y Yessy Gabriela Cabrera (Estudiantes Co-Investigadoras).

Institución (es): Escuela de Microbiología – UNAH, Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (CEI-MEIZ) – UNAH, Hospital General San Felipe y Ministerio de Salud Pública de Honduras.

Fecha de presentación al comité: 13 / 10 / 2014

Fue sometido a un proceso de revisión y análisis y en consecuencia fue **APROBADO**

Duración de la aprobación: **17 / 12 / 2014** al **17 / 12 / 2015**

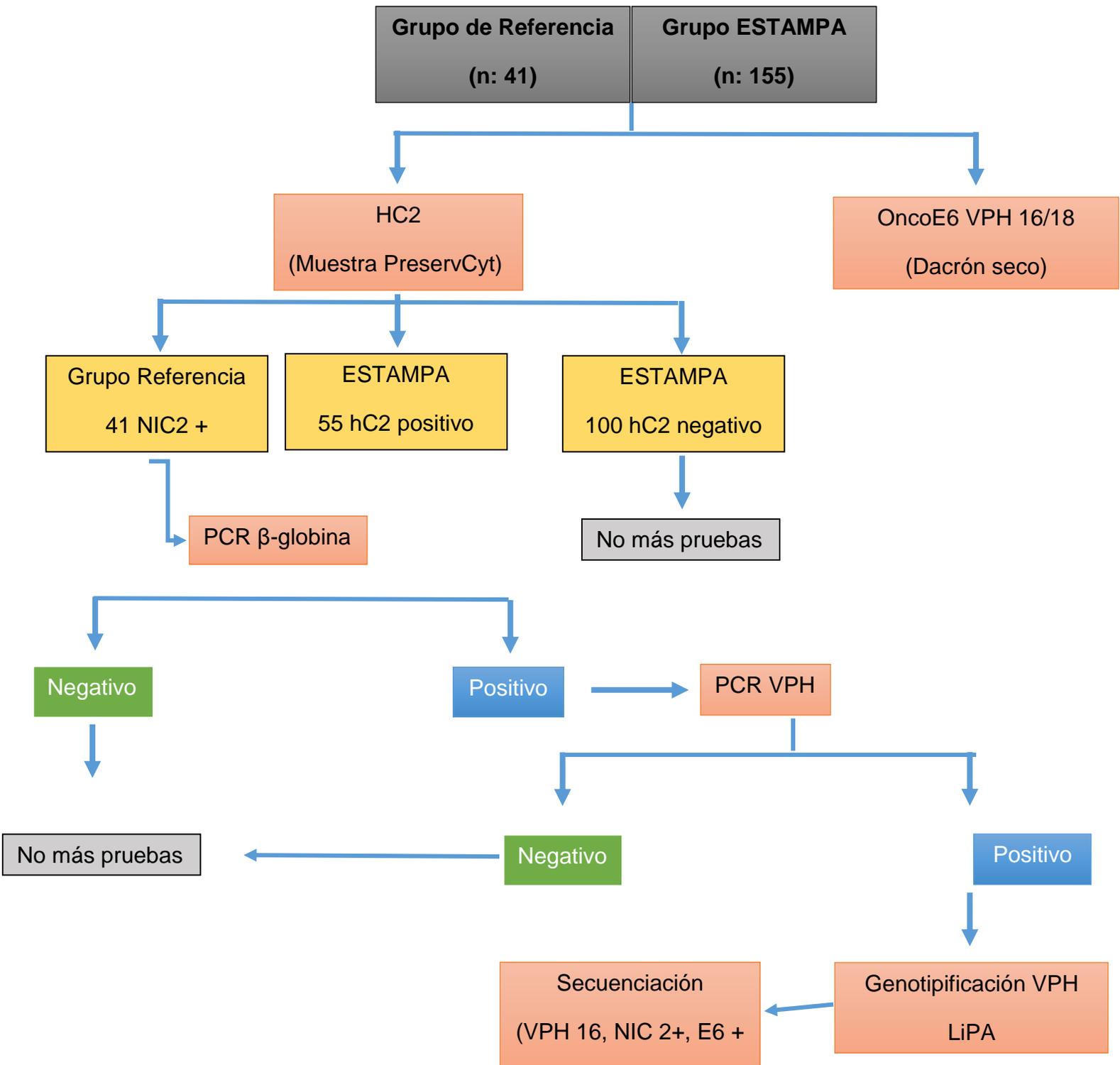
Para los fines de los interesados se les extiende la presenta a los diecisiete días del mes de diciembre de 2014.


Dra. Wendy Murillo
Presidente CEI-MEIZ

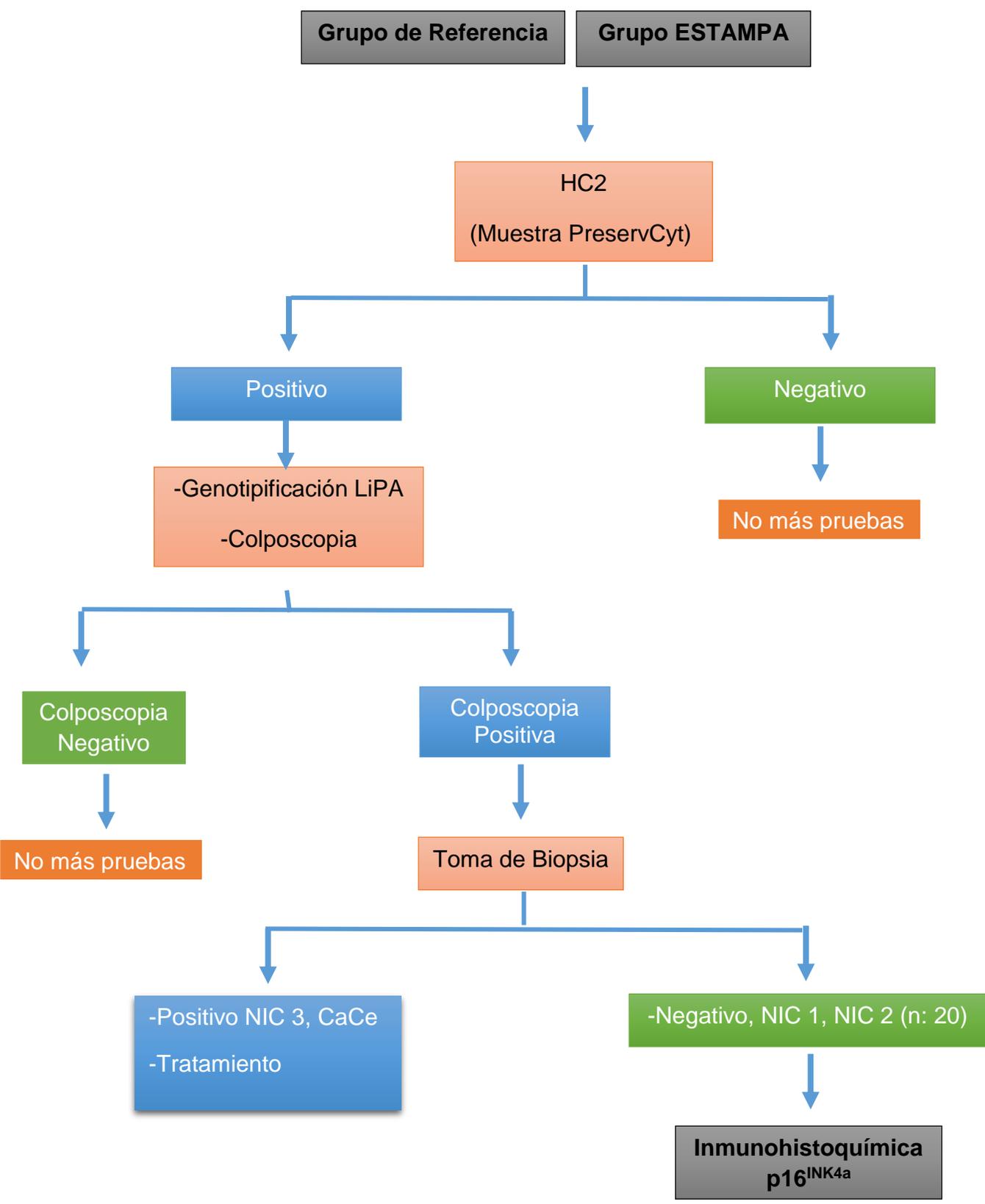



Lic. Judith Bulnes Borjas
Secretaría CEI-MEIZ

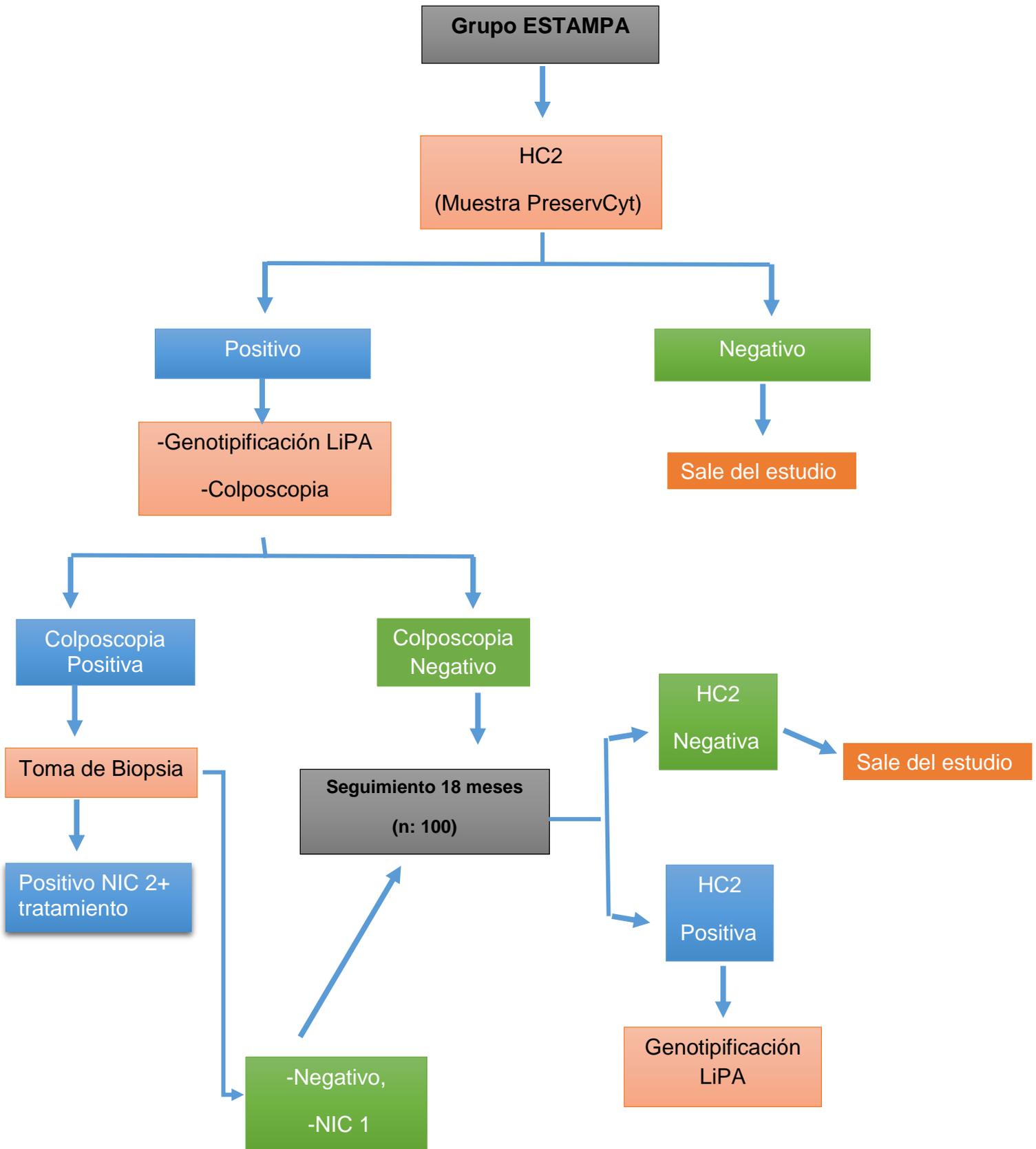
Anexo 4. Flujo de trabajo para la detección de la Oncoproteína E6.



Anexo 5. Flujo de trabajo de detección de p16^{INK4a}



Anexo 6. Flujograma de trabajo visita de seguimiento 18 meses.





Anexo 7. Consentimiento informado

Rol de marcadores de proliferación celular y viral y la eliminación o persistencia del VPH como estrategias de triaje y seguimiento a las mujeres VPH positivas en cuatro municipios de Francisco Morazán.

Realizado por: Escuela de Microbiología, UNAH; Ministerio de Salud, Honduras.

Patrocinado por: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer [IARC], Organización Mundial de la Salud (OMS). Corporación Arbor Vita.

Investigador principal: Annabelle Ferrera, Ph.D. –Escuela de Microbiología, UNAH

Colaboradores: Elmer Turcios, MD

Brenda Salgado, MD

Wendy Valladares, MQC In fieri

Yessy Cabrera, M.Sc In fieri

Identificación: _____

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 (Pap). 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 alternas que podrían ser ventajosas frente a la citología 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 el porcentaje de mujeres con un diagnóstico de lesiones precáncerosas o cáncer de cuello uterino que presentan la oncoproteína E6, esta es una proteína que se encuentra en gran cantidad cuando existe una infección por VPH. Invitaremos a participar 41 mujeres entre los 30 y 64 años de edad que acudan en busca de atención médica al Hospital General San Felipe.

¿Quiénes pueden participar?

Mujeres entre los 30 y 64 años que tengan un diagnóstico anormal durante la colposcopia, 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 dos muestras de células de su cuello del útero para detectar la presencia del virus (VPH) y la oncoproteína E6. La toma de las muestras es similar a la que se realiza para la citología.

Usando una de las muestras recolectadas, realizaremos la detección de una de las proteínas del virus (oncoproteína E6). La segunda muestra será utilizada para realizar la prueba de VPH; estas técnicas ayudarán a mejorar la calidad de la citología.

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 afectara 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 dos muestras de células de su cuello del útero durante su visita.

Una muestra de células cervicales mediante un hisopo de Dacrón para detectar una de las proteínas del virus (E6); la segunda muestra se tomará con un cepillo y se agitará en un medio especial llamado PBS 1X y luego en un segundo medio llamado PreservCyt, con esta muestra realizaremos la prueba de VPH. Las muestras de su cuello del útero se utilizarán 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. Durante la visita a colposcopia en algunos casos si el médico observase algunas áreas anormales, puede decidir tomar una pequeña muestra de tejido de cuello del útero (Biopsia).

Las muestras recolectadas serán transportadas desde el Hospital General San Felipe al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (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, celular 99902713, quien se los entregará 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 sin ningún costo, para la detección de lesiones que podrían convertirse en cáncer de cuello del útero, así como el tratamiento y el seguimiento en caso de que usted obtenga un resultado positivo en las pruebas realizadas.

¿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, si en cualquier momento presentase este signo puede acudir al médico del estudio quien le atenderá gustosamente para su evaluación.

¿La información que voy a brindar es confidencial?

Toda la información que brinde, incluyendo los resultados de sus pruebas, será confidenciales. 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. Este estudio es financiado por la IARC, y por la Corporación Arbor Vita.

El protocolo del estudio y el consentimiento informado han sido revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología, Universidad Nacional de Honduras.

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 celular 99902713 o con la Dra. Jackeline Figueroa, del área de Regulación el Ministerio de Salud Pública,

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 investigará la presencia de la proteína E6 del VPH 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 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 9. Formulario datos socio-demográficos

Rol de marcadores de proliferación celular y viral y la eliminación o persistencia del VPH como estrategias de triaje y seguimiento a las mujeres VPH positivas en cuatro municipios de Francisco Morazán.

Fecha de visita: __ _ / __ _ / __ _ _ _ _ <div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> Día Mes Año </div>	
Deseo tomar algunos minutos para hacerle algunas preguntas acerca de su educación y trabajo.	
1. ¿Sabe leer?	1. <input type="checkbox"/> Sí 2. <input type="checkbox"/> No 3. <input type="checkbox"/> NR
2. ¿Sabe escribir?	1. <input type="checkbox"/> Sí 2. <input type="checkbox"/> No 3. <input type="checkbox"/> NR
3. ¿Ha asistido alguna vez a la escuela?	1. <input type="checkbox"/> Sí 2. <input type="checkbox"/> No (pase a 5) 3. <input type="checkbox"/> NR (pase a 5)
4. ¿Cuál fue el grado o nivel de escolaridad más alto que completó?	
1. <input type="checkbox"/> primaria incompleta	5. <input type="checkbox"/> pregrado/ universidad incompleta
2. <input type="checkbox"/> primaria completa	6. <input type="checkbox"/> pregrado/ universidad completa
3. <input type="checkbox"/> secundaria incompleta	7. <input type="checkbox"/> vocacional/ técnica
4. <input type="checkbox"/> secundaria completa	8. <input type="checkbox"/> NR/ NS
5. ¿Cuáles de las siguientes descripciones expresa mejor la situación actual del jefe de hogar (jefe de hogar es el que lleva más dinero a la casa)	
1. <input type="checkbox"/> trabaja	5. <input type="checkbox"/> retirado
2. <input type="checkbox"/> desempleado buscando trabajo	6. <input type="checkbox"/> Hace tareas del hogar, cuida a los niños o a otras personas.
3. <input type="checkbox"/> estudia	7. <input type="checkbox"/> otro
4. <input type="checkbox"/> enfermo permanente/ discapacitado	8. <input type="checkbox"/> no responde

6. ¿Cuál es la ocupación del jefe del hogar?

- | | |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> empleado | 8. <input type="checkbox"/> trabajo temporal |
| 2. <input type="checkbox"/> empleado en oficios domésticos | 9. <input type="checkbox"/> Trabajo de campo: pastoreo, agricultura, etc. |
| 3. <input type="checkbox"/> trabaja en un programa de empleo social | 10. <input type="checkbox"/> trabajador sin salario: trabaja en una empresa familiar sin Salario. |
| 4. <input type="checkbox"/> empleador (con 5 empleados o menos) | 11. <input type="checkbox"/> otro |
| 5. <input type="checkbox"/> empleador (con más de 5 empleados) | 12. <input type="checkbox"/> no responde |
| 6. <input type="checkbox"/> profesional o técnico trabajando independiente. | |
| 7. <input type="checkbox"/> trabajador independiente pero no profesional (en la casa, comerciante, trabajador de la construcción sin contrato formal de trabajo) | |

7. El agua en su casa:

- | | |
|---|--|
| 1. <input type="checkbox"/> llega por tuberías a la casa | 3. <input type="checkbox"/> esta fuera del terreno |
| 2. <input type="checkbox"/> esta dentro del terreno pero fuera de la casa | 4. <input type="checkbox"/> no responde |

8. ¿Tiene baño?

- | | | |
|--------------------------------|--|--------------------------------|
| 1. <input type="checkbox"/> Sí | 2. No <input type="checkbox"/> (pase a 10) | 3. <input type="checkbox"/> NR |
|--------------------------------|--|--------------------------------|

9. El baño tiene:

1. sanitario o cadena y arrastre de agua.
2. sanitario sin botón ni cadena pero con arrastre de agua (usa un balde para hacer correr el agua)
3. letrina (sin arrastre de agua)
4. no responde.

10. En su casa usted tiene: (marque todas las que apliquen)

- | | |
|---|---|
| 1. <input type="checkbox"/> automóvil | 5. <input type="checkbox"/> computadora portátil |
| 2. <input type="checkbox"/> horno microondas | 6. <input type="checkbox"/> lavadora |
| 3. <input type="checkbox"/> televisión por cable | 7. <input type="checkbox"/> ninguna de las anteriores |
| 4. <input type="checkbox"/> computadora de escritorio | |

11. Finalmente, quiero preguntarle si usted ¿Alguna vez se ha hecho un Papanicolaou o citología?

1. Sí
2. No
3. NS/ NR [Wechslera et al.]

12. ¿Cuándo se realizó su último Papanicolaou o citología?

1. hace menos de 2 años.
2. entre 2 a 5 años atrás.
3. hace más de 5 años

FIN

Agosto 2014

Page 3 of 3

Anexo 10. POE Toma de muestras cervicales

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Toma de muestras de células cervicales	
Elaborado por: Yessy Cabrera Supervisado por: Dra Annabelle Ferrera Fecha: __/__/__ Firma _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____
Versión: Numero 2 Revisado por: Wendy Valladares Firma: _____	Páginas: 2 Fecha: 5 de febrero del 2015
Objetivo: Establecer el método de toma de muestras cervicales de participantes	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Especulo plástico descartable nuevo o metálico estéril2. Viales de PreservCyt (PC) de 20 ml3. Criovial para Dacrón seco4. Aplicador de Dacrón5. Cepillo cervical <i>Cervex Brush</i> nuevo6. Etiquetas de identificación7. Laminas portaobjetos8. Fijador para citología convencional	
Procedimiento: <ol style="list-style-type: none">1. Coloque a la paciente en posición de litotomía2. Etiquete los vial es de PC y el criovial con la identificación correspondiente3. Identifique la lámina de citología convencional en la parte esmerilada, anotando con lápiz el número de identificación de la participante y las iniciales de su nombre4. Coloque el especulo del tamaño apropiado según las características de la participante5. Identifique el cérvix claramente y observe la localización de la zona de transformación6. Introduzca la punta del aplicador de Dacrón aproximadamente 0.5 cm en el orificio cervical y gírelo 360° tres veces completas y barra el ectocérvix con el Dacrón cubriendo con un giro toda la superficie expuesta	

7. Retire el aplicador y colóquelo en el criovial pre-etiquetado
 - i. Tome el mango por encima de la cabeza del aplicador
 - ii. Cierre parcialmente la tapa del tubo, doble el mango del aplicador hacia abajo hasta que se rompa, liberando de esta forma la cabeza del hisopo dentro del tubo
 - iii. Descarte el mango del aplicador
 - iv. Cierre por completo la tapa del tubo
8. Tome el cepillo cervical nuevo introdúzcalo en el orificio cervical y gírelo 360° cinco veces completas en un mismo sentido
9. Retire el cepillo del orificio cervical
 - i. Para preparar la lámina de citología convencional, deslice una cara del cepillo con la muestra sobre un portaobjetos nuevo pre-identificado
 - ii. Coloque el cepillo en el vial de PC 1
 - iii. Proceda a fijar la lámina de citología con la solución fijadora y deje que se seque
 - iv. Lave el cepillo vigorosamente en el medio preservante mediante agitación circular en ambos sentidos y golpeándolo contra las paredes del vial.
 - v. Tape el vial
10. Tome el segundo cepillo cervical nuevo y repita el procedimiento de toma de muestra
 - i. Enjuague el cepillo en el segundo vial de PC de igual forma y tape el vial
11. Retire el espejo y descártelo en un recipiente para material bioinfeccioso e indique a la participante que puede vestirse
12. Coloque los viales de PC con muestras, el criovial con el Dacrón seco y la lámina en el área designada para su posterior transporte a temperatura ambiente.

Anexo 11. POE Envío, transporte y recepción de especímenes del sitio de campo al laboratorio.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Envío, transporte y recepción de especímenes del sitio de campo al laboratorio	
Elaborado por: Yessy Cabrera Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: __/__/__ Firma _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____
Versión: Numero 2 Revisado por: Wendy Valladares Firma: _____	Páginas: 2 Fecha: 5 de febrero del 2015
Objetivo: Establecer el procedimiento de manejo y transporte de bioespecímenes recolectados desde el sitio de campo al laboratorio de procesamiento	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Bioespecímenes tomados en visitas del estudio2. Bitácora de control de muestras	
Procedimiento: <ol style="list-style-type: none">1. Al final de cada día de consulta, verifique todas las muestras tomadas están documentadas en la bitácora diaria de control de muestras<ol style="list-style-type: none">i. Si es necesario, complete la bitácora con las muestras faltantesii. Documente el número total para cada tipo de muestra y confírmelo con el recuento físico2. Traslade las muestras con la bitácora diaria de control al lugar designado para el almacenamiento hasta su traslado al laboratorio de procesamiento3. Cada vez que deba enviar muestras al laboratorio de procesamiento, localice todas las muestras<ol style="list-style-type: none">i. Localice las bitácoras diarias de control correspondientes a todas las muestras a trasladarii. Localice todas las muestras documentadas en las bitácoras diarias de control por trasladariii. Documente los totales por tipo de muestra en la hoja resumen para	

- traslado y verifique con el recuento físico
4. Traslade el lote de muestras al laboratorio de procesamiento
 - i. En el vehículo de transporte asegúrese de usar aire acondicionado si la temperatura del lugar lo requiere y mantenga las muestras en el vehículo solo el tiempo necesario
 5. Una vez en el laboratorio de procesamiento la persona encargada debe verificar que las muestras recibidas correspondan con lo indicado en la bitácora diaria de control de muestras y documentar su recepción.

Anexo 12. POE Desnaturalización de muestras recolectadas en solución PreservCyt para realización posterior de pruebas de captura de híbridos.

<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR</p> <p>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Desnaturalización de muestras recolectadas en solución PreservCyt para realización posterior de prueba de Captura de Híbridos</p>	
Elaborado por: Yessy Cabrera Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: __/__/__ Firma: _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma: _____
Versión: Numero 2 Revisado por: Wendy Valladares Firma: _____	Páginas: 4 Fecha: 5 de febrero del 2015
<p>Objetivo: Establecer el procedimiento de conversión y desnaturalización de muestras recolectadas en solución PreservCyt para realización posterior de prueba de Captura de Híbridos</p>	
<p>Materiales:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Viales de PreservCyt (PC) con muestra de células cervicales 2. Micropipeta de 1 ml 3. Puntas descartables con filtro de 1 ml 4. Cámara con luz ultravioleta 5. Toallas de papel desechables 6. Gabacha 7. Guantes desechables 	

8. Etanol 70%
9. Tubo cónico estéril de 15 ml
10. Pipeta repetidora
11. Finntips Stepper estériles de 2.5 ml
12. Finntips Stepper estériles de 5 ml
13. Tapas para los tubos de los controles y calibradores del kit de Captura de Híbridos
14. Vortex
15. Baño maría 65°C

Materiales incluidos en el kit de conversión:

1. Tampón convertidor de muestra (Sample Conversion Buffer)
2. Colorante indicador (Indicator Dye)
3. Agente desnaturizante (DNR)
4. Medio de transporte de espécimen (Especimen Transport Medium, STM)

Materiales incluidos en el kit de Captura de Híbridos:

1. Colorante indicador (Indicator Dye)
2. Agente desnaturizante (DNR)
3. Control de calidad Low-Risk
4. Control de calidad High-Risk
5. Calibrador negativo
6. Calibrador High-Risk

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo:

1. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras, limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma la superficie de la pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
3. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras
4. Cierre la cámara

B. Desnaturización de muestras recolectadas en solución PC

1. Encienda el baño maría a 65°C asegurándose de tener suficiente agua para cubrir las muestras que contendrán los tubos
2. Genere su lista de trabajo o bitácora de procesamiento
3. Utilizando la lista de trabajo obtenga todas las muestras (viales de PC) que deben ser procesados
4. Verifique y ordene sus muestras con su lista de trabajo
5. Coloque guantes
6. Limpie con etanol al 70% todos los viales de PC a procesar
7. Cámbiese los guantes
8. Rotule con números consecutivos todos los viales de PC que va a procesar, siguiendo su lista de trabajo
9. Por cada PC rotule un tubo cónico estéril de 15 ml y su tapa con los mismos

- números consecutivos que uso para los viales PC
10. Transfiera los PC con muestras y los tubos de 15 ml dentro de la cámara
 11. Tome la primera muestra de su lista de trabajo y el tubo cónico correspondiente. Verifique que la numeración de la muestra y el tubo coincidan.
 12. Agite el vial PC con la muestra, al menos 7 veces por inversión, ábralo y pipetee 4 ml en el tubo cónico correspondiente. Cierre tanto el vial como el tubo.
 13. Atomice las manos con etanol al 70% para proceder con el siguiente vial de PC
 14. Repite los pasos 11, 12 y 13 para todas las muestras.
 15. Destape todos los tubos cónicos con muestras colocando las tapas en el orden de procesamiento y boca arriba.
 16. Con una pipeta repetidora agregue 400 μ l de Sample Conversion Buffer a cada uno de los tubos de 15 ml. Evite tocar con la punta las paredes de los tubos. Si esto sucede cambie la finntip.
 17. Tape los tubos con sus tapas correspondientes y mezcle en el vortex durante 5 segundos, cada una de las muestras.
 18. Centrifugue a 2900 g durante 15 minutos y a temperatura ambiente.
 19. Durante el tiempo de centrifugación prepare la mezcla desnaturalizante (STM/DNR) en proporción 2:1. Esta mezcla ha de ser preparada fresca en el momento de utilización.
 20. Añada 3 gotas del Indicator Dye a la botella de Denaturation Reagent (DNR)
 21. En un tubo estéril de 10-15 ml mezcle 120 μ l de STM y 60 μ l de DNR para cada muestra.
 22. Mezcle la preparación en el vortex.
 23. Con cuidado saque los tubos de la centrifuga y colóquelos en una gradilla verificado que se halla formado el pellet de color rosa/anaranjado
 24. Transfiera los tubos a la cámara y destape el primer tubo dejando la tapa boca arriba.
 25. Decante el sobrenadante con una inversión rápida y manteniendo el tubo en posición invertida, elimine el exceso de líquido tocando seis veces la boca del mismo, sobre un papel absorbente.
 26. Tape el tubo y vuelva a colocarlo en la gradilla
 27. Proceda de la misma manera para decantar el sobrenadante de los otros tubos. Utilice un área diferente del papel absorbente para no secar dos tubos diferentes en el mismo lugar y cambie el papel absorbente cuando lo considere necesario.
 28. Abra e nuevo todos los tubos manteniendo las tapas boca arriba y en el orden de procesamiento.
 29. Con la pipeta repetidora, agregue 150 μ l de la mezcla desnaturalizante que previamente ha preparado (mezcla STM/DNR)
 30. Tape nuevamente los tubos, asegurándose de que quedaron bien cerrados.
 31. Mezcle los tubos en el vortex, a velocidad máxima, hasta que el pellet se disuelva completamente, por un máximo de 2 minutos. Si alguno de los pellets permanece insoluble tras ese tiempo, anótelos en su hoja de trabajo.
 32. Prepare los controles y calibradores del kit de captura de híbridos:

33. Añada 5 gotas del Indicator Dye a la botella de Denaturation Reagent (DNR) del kit de captura de híbridos. Marque en el frasco la fecha en la que prepara la mezcla por primera vez. Esta solución tiene una duración de hasta 3 meses a 2-8°C. Si el color se atenúa con el tiempo, añada nuevamente 3 gotas del Indicator Dye.
34. Agregue el volumen indicado de DNR para cada control y calibrador. Cambie la punta para evitar contaminación cruzada entre los calibradores y controles:

Calibrador o Control	Volumen DNR
Calibrador negativo	1000 µl
Calibrador High Risk	500 µl
Control de calidad Low Risk	500 µl
Control de calidad High Risk	500 µl

35. Reemplace las tapas de los tubos originales de los controles y calibradores por tapas nuevas.
36. Agite cada tubo control y calibrador en el vortex, a velocidad máxima, durante al menos 5 segundos.
37. Invierta el tubo una vez para lavar el interior del tubo y la tapa
38. Asegúrese de que el baño maría ha alcanzado los 65°C y coloque dentro los controles, los calibradores y las muestras. Asegúrese de que el volumen del agua cubre el volumen de la mezcla.
39. Realice una incubación de 15 minutos.
40. Trascurridos los 15 minutos, saque los tubos y agítelos de uno en uno en el vortex. Asegúrese de que el pellet esta resuspendido.
41. Coloque los tubos nuevamente en el baño y déjelos en incubación durante 30 minutos más.
42. Saque los tubos del baño maría y espere unos minutos a que alcancen la temperatura ambiente.
43. Proceda con la prueba de captura de híbridos o bien almacene sus tubos entre 2-8°C si los va a procesar el siguiente día. Para almacenamientos más prolongados guarde los tubos a -20°C por un máximo de 3 meses.

Anexo 13. POE Determinación cualitativa de ADN de VPH de alto riesgo por captura de híbridos 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Determinación cualitativa de ADN de VPH de alto riesgo por Captura de Híbridos 2	
Elaborado por: Yessy Cabrera Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: __/__/__ Firma _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____
Versión: Numero 2 Revisado por: Wendy Valladares Firma: _____	Páginas: 4 Fecha: 5 de febrero del 2015
Objetivo: Establecer el procedimiento para la determinación cualitativa de ADN de VPH de alto riesgo, mediante la prueba de Captura de Híbridos 2.	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Cámara con luz ultravioleta2. Toallas de papel desechables3. Gabacha4. Guantes desechables5. Etanol al 70%6. Muestras, controles y calibradores desnaturalizados7. Micropipeta de 1 ml8. Micropipeta de 200 µl9. Pipeta multicanal (8 canales) de 25-200 µl10. Puntas descartables estériles y con filtro de 1 ml11. Puntas descartables estériles y con filtro de 200 µl12. Puntas descartables estériles y sin filtro de 200 µl13. Puntas descartables extra largas, estériles y sin filtro de 300 µl14. Placa de 96 pocillos15. Tubo cónico estéril de 15 ml16. Reservorio estéril de 25 ml	

Materiales incluidos en el kit de Captura de Híbridos:

1. Microplaca de Captura de 96 pocillos con cobertura de anticuerpos anti-híbridos RNA:DNA
2. Colorante indicador (Indicator Dye)
3. Agente desnaturalizante (DNR)
4. Diluyente para la sonda (DIL/PROBE)
5. Sonda para VPH High Risk (PROBE/HPV/HIGH-RISK)
6. Reactivo de detección 1
7. Reactivo de detección 2
8. Tampón de lavado concentrado (BUF/WASH X30)

Procedimiento:**A. Preparación del área de trabajo**

1. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras, limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma las superficies de las pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
3. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras
4. Cierre la cámara

B. Determinación cualitativa de ADN de alto riesgo por Captura de Híbridos**B1. Hibridación**

1. Colóquese la gabacha y los guantes
2. Prepara y marque la microplaca de 96 pocillos en la que va a realizar la hibridación
3. Mezcle cada muestra, control y calibrador en el vortex, durante 10 segundos, antes de transferir a la placa
4. Pipetee 75 µl de cada calibrador, control y muestra en el fondo del pocillo de la microplaca siguiendo el orden creado en su plantilla de trabajo. Evite tocar las paredes de los tubos que contienen las muestras desnaturalizadas. Utilice puntas nuevas extra-largas para cada pipeteo.
5. Una vez transferida la última muestra, cubra la microplaca de hibridación con su tapa e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente
6. Durante la incubación prepare la sonda en un tubo estéril:
 - a) Centrifugue el vial de High-Risk HPV Probe para bajar todo el líquido al fondo del vial. Golpee suavemente para mezclar
 - b) Determine la cantidad de mix que requiere para su ensayo (25 µl por pocillo) (manteniendo la dilución 1:25 de la sonda VPH High-Risk: diluyente) y considerando un volumen extra para compensar la pérdida por pipeteo.
 - c) Pipetee primero el diluyente y transfíeralo a un tubo estéril
 - d) Cambie de guantes antes de manipular la sonda
 - e) Pipetee en segundo lugar la sonda, utilizando una punta con filtro estéril y transfíerala al tubo con el diluyente sin sumergir la punta en el diluyente, sino depositando la sonda justo encima del menisco.

- f) Mezcle utilizando el vortex durante al menos 5 segundos, a velocidad máxima. Marque el tubo como Mix Sonda.
7. Tras la incubación de 10 minutos, mezcle mediante vortex y vierta el mix de la sonda en un reservorio estéril nuevo
 8. Pipetee 25 μ l del Mix sonda en cada pocillo utilizando la pipeta multicanal y puntas con filtro estéril, utilice puntas nuevas para cada pocillo, deposite la sonda cerca de la pared del pocillo pero sin tocarlo y evite producir salpicado.
 9. Cubra la placa con su tapa y agítela en el Rotary Shaker System a 1100 \pm 100 rpm durante 3 minutos. Los calibradores, controles y muestras deben virar el color hacia el rosa tras la agitación. Los pocillos que permanecen con color púrpura quizá no recibieron suficiente cantidad de sonda, por lo que puede añadir 25 μ l más de mix de sonda y volver a agitar, si esas muestras siguen con color púrpura debe volverlas a correr en otro ensayo.
 10. Incube la microplaca de hibridación durante 60 minutos en la placa calentadora previamente calentada y equilibrada a 65 \pm 2 °C

B2. Detección de Híbridos:

11. Coloque en la placa de captura el número de pocillo que va a utilizar, sino los utiliza todos guarde el resto en su bolsa original y ciérrela. Enumere las columnas que va a utilizar con un marcador.
12. Con mucho cuidado retire la placa de hibridación de la placa calentadora, pase a la cámara, quite la tapa y colóquela en una superficie limpia.
13. Con la pipeta multicanal en 125 μ l, transfiera todo el contenido de todos los pocillos de la placa de hibridación: calibradores, controles y muestras (aproximadamente 100 μ l) a los pocillos de la placa de captura, manteniendo el mismo orden y cambiando las puntas para cada columna. Asegúrese de que las puntas se vacían completamente para que la transferencia del espécimen sea correcta.
14. Cubra la placa de captura con su tapa y agite en el Rotary Shaker a 1100 \pm 100 rpm a temperatura ambiente durante 60 minutos.
15. Durante la incubación prepare el wash buffer
16. Una vez completada la incubación, retire la placa del rotary shaker, retire la tapa de la placa y elimine el líquido de los pocillos en el lavabo, invirtiendo la placa y con un golpe seco, con cuidado de no acercarse demasiado a la placa al lavabo para evitar que le salten las salpicaduras. No vuelva a invertir la placa, sino que seque mediante golpes firmes en toallitas absorbentes. Asegúrese de que no queda líquido en los pocillos y de que la placa está seca.
17. Alicuote el volumen apropiado de Reactivo de Detección 1 en un reservorio
18. Dispense 75 μ l del reactivo de Detección 1 en cada pocillo de la microplaca de captura, utilice la pipeta multicanal y mediante la técnica de pipeteo inverso
19. Realice una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente.
20. Lave la placa de forma manual o siguiendo el procedimiento del lavador de placas automático.

C. Preparación del tampón de lavado

- I. Mezcle bien a solución de tampón de lavado concentrada
- II. Diluya 100 ml de wash buffer concentrado con 2.9 L de agua destilada o desionizada en la botella de lavado (el volumen final será de 3 L)
- III. Cierre la botella para evitar contaminación o evaporación. Esta solución es estable durante 3 meses a 2-25°C. Marque la botella con la fecha de expiración.
- IV. Para el mantenimiento lave la botella y el tubo con cloro y enjuague con agua destilada una vez cada 3 meses para evitar que contaminación con fosfatasa alcalina procedente de bacterias y hongos.

D. Lavado de placa por método manual

- I. Atempere la solución si esta estaba refrigerada
 - II. Elimine el reactivo de Detección 1 colocando papel absorbente sin pelusa sobre la placa e invirtiendo cuidadosamente. Antes de invertir asegúrese de que el papel toca la superficie de la placa. Deje la placa drenarse completamente por 1-2 minutos. Golpee suavemente la placa invertida sobre papel absorbente limpio. Elimine el papel utilizado para evitar contaminación con fosfatasa alcalina en los pasos posteriores
 - III. Utilizando el lavador manual llene los pocillos completamente comenzando por el pocillo A1 hacia abajo y en movimiento serpentino hacia la derecha, hasta el pocillo H12, decante el líquido en el lavabo con un movimiento seco y enérgico. El segundo lavado se inicia desde el pocillo H12 hacia arriba y en movimiento serpentino hacia la izquierda, hasta el pocillo A1
 - IV. Repita esta secuencia de 2 lavados dos veces más, hasta completar 6 lavados por pocillo
 - V. Tras el lavado, seque la placa invirtiéndola sobre papel absorbente limpio y golpee firmemente de 3-4 veces. Cambie el papel y seque nuevamente. Deje la placa invertida durante 5 minutos y seque una vez más.
 - VI. La placa debe quedar blanca y sin restos de líquido rosado residual en los pocillos
21. Cambie sus guantes por un par de guantes limpio para manejar el reactivo de Detección 2.
22. Alicuote el volumen apropiado de reactivo de Detección 2 en un reservorio. No recupere el volumen excedente, si lo hubiera, en la botella original.
23. Dispense 75 µl del reactivo de Detección 2 en cada pocillo de la microplaca de captura, utilizando la pipeta multicanal y mediante la técnica de pipeteo inverso. El color de los pocillos ha de virar al amarillo
24. Cubra la microplaca de captura e incube a temperatura ambiente durante 15 minutos, en oscuridad
25. Lea la placa en el luminómetro tras los 15 minutos de incubación y nuca después de transcurridos 30 minutos.

Anexo 14. POE Extracción de ADN de muestras cervicales QIAGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Extracción de ADN de muestras cervicales QIAGEN	
Elaborado por: Yessy Cabrera Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: __/__/__ Firma: _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma: _____
Versión: Numero 2 Revisado por: Wendy Valladares Firma: _____	Páginas: 3 Fecha: 5 de febrero del 2015
Objetivo: Establecer el procedimiento para la extracción de ADN a partir de muestras cervicales	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Viales con muestras de células cervicales2. Etanol 96%3. Agua libre de nucleasas4. Micropipeta de 100 µl5. Micropipeta de 1 ml6. Puntas descartables de 100 µl7. Puntas descartables de 1 ml8. Cámara con luz ultravioleta9. Toallas de papel desechables10. Gabacha11. Guantes desechables12. Tubos microcentrífuga 1.5 ml13. Microcentrífuga14. Vortex15. Bloque térmico 56°C	
Materiales incluidos en el kit de extracción <ol style="list-style-type: none">1. Proteínasa K	

2. Buffer AL
3. Buffer AW1
4. Buffer AW2
5. Buffer AE
6. Minicolumnas QIAamp
7. Tubos colectores 2 ml

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo

1. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras, limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma la superficie de la pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
3. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras
4. Cierre la cámara

B. Extracción de ADN

1. Encienda el bloque térmico a 65°C
2. Genere su lista de trabajo o bitácora de procesamiento
3. Utilizando la lista de trabajo obtenga todas las muestras que deben ser procesados
4. Verifique y ordene sus muestras con su lista de trabajo
5. Coloque guantes
6. Rotule con números consecutivos todos los viales de 1.5 ml que va a procesar, siguiendo su lista de trabajo
7. Pipetee 20 µl de Proteínasa K en el fondo del tubo.
8. Adicione 200 µl de muestra
9. Adicione 200 µl de Buffer AL a la muestra
10. Incube a 56°C durante 10 minutos
11. Adicione 200 µl de Etanol (96-100%) a la muestra, a continuación mezcle en Vortex durante 15 segundos. Después de mezclar, centrifugue los tubos.
12. Cuidadosamente transfiera la mezcla a una minicolumna (en un tubo colector 2 ml) sin mojar el borde. Cierre la tapa, y centrifugue a 8000 rpm durante 1 minuto. Coloque la minicolumna en un tubo colector limpio, y descarte el tubo que contiene el filtrado.
13. Cuidadosamente abra la minicolumna y adicione 500 µl de Buffer AW1 sin mojar el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 8000 rpm durante 1 minuto. Coloque la minicolumna en un tubo colector limpio, y descarte el tubo que contiene el filtrado.
14. Cuidadosamente abra la minicolumna y adicione 500 µl de Buffer AW2 sin mojar el borde. Cierre la tapa y centrifugue a máxima velocidad (14000 rpm) durante 3 minutos.
15. Recomendable: coloque la minicolumna en un tubo colector limpio y descarte el tubo que contiene el filtrado. Centrifugue a máxima velocidad durante 1 minuto.

16. Coloque la minicolumna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, descarte el tubo colector que contiene el filtrado. De manera cuidadosa abra la minicolumna y adicione 200 µl de agua libre de nucleasas. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto, y centrifugue a 8000 rpm durante 1 minuto.
17. Descarte la minicolumna y conserve el eluido a -20°C

Anexo 15. POE Amplificación de ADN (Genotyping kit HPV GP)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Amplificación de ADN (Genotyping kit HPV GP)	
Elaborado por: Yessy Cabrera Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: __/__/__ Firma: _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma: _____
Versión: Numero 2 Revisado por: Wendy Valladares Firma: _____	Páginas: 4 Fecha: 5 de febrero del 2015
Objetivo: Establecer el procedimiento para la amplificación de ADN para posterior realización de genotipificación de VPH	
Materiales: <ol style="list-style-type: none"> 1. Cámara con luz ultravioleta 2. Toallas de papel desechables 3. Etanol 70% 4. Viales para PCR 0.2 ml 5. Termociclador 6. Agua libre de nucleasas 7. Guantes desechables 	

8. Puntas descartables esteriles con filtro
9. Micropipetas de 10 μ l, 100 μ l y 1 ml
10. Vortex
11. Microcentrifuga
12. ADN polimerasa Ampli Taq Gold
13. Buffer PCR 10x GeneAmp
14. $MgCl_2$ 25 mM
15. dNTP
16. Muestras y controles

Materiales incluidos en el kit de amplificación

1. Mix HPV GP
2. Mix β -globina
3. Control positivo

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo

5. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras, limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
6. Limpie de igual forma la superficies de las pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
7. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras. Cierre la cámara

Para el PCR 10 μ l de ADN de las muestras y controles son analizados en un volumen final de 50 μ l.

El control positivo contiene ADN específico de VPH tipo 18 y DNA específico de β -globina. El control de β -globina está destinado a ser utilizado para comprobar el muestreo adecuado del paciente o la ausencia de factores inhibidores.

Nota. Se recomienda preparar la Mezcla maestra para las 22 reacciones de PCR de una vez. Alícuotar la Mezcla maestra en cantidades de 40 μ l en viales de PCR. Guardar los viales en el área blanca a $-20^{\circ}C$.

B. Área Blanca

1. Utilice la siguiente Tabla para calcular el volumen de reactivo necesario para preparar la cantidad de mezcla maestra:

Paso	Mezcla maestra PCR	Volumen 1 reacción	
		VPH GP (µl)	β-globina (µl)
1	Buffer PCR10x Gene Amp	5	5
2	MgCl ₂ 25 mM	7	4
3	dNTP 1 mM	10	10
4	Mix Primer VPH GP/ Mix Primer β-globina	2	2
5	Agua libre de nucleasas	15.7	18.7
6	ADN polimerasa Ampli Taq Gold 5 U/µl	0.3	0.3
7	Volumen final	40	40

2. Descongele por completo los reactivos a utilizar.
3. Pipetee cada uno de los componentes en un tubo de microcentrifuga estéril.
4. Agite la mezcla durante 10 segundos y centrifugue.
5. Dispense 40 µl de mezcla maestra en cada tubo de reacción de PCR.

C. Área Gris

1. Adicione 10 µl de ADN a los viales de PCR que contienen la mezcla maestra, homogenice por pipeteo.
2. Controles: adicione 10 µl de control positivo al vial de PCR que contiene la mezcla maestra y homogenice por pipeteo. Como control negativo utilice 10 µl de agua libre de nucleasas.

D. Área Negra

1. Coloque los viales de PCR en el termociclador y ejecute el programa de PCR descrito a continuación:

	programa PCR VPH GP		Programa PCR B-globina	
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
Activación de AmpliTaq Gold	94°C	9 min	94°C	9 min
40 ciclos de PCR	94°C	20 seg	94°C	30 seg
	38°C	30 seg	52°C	45 seg
	71°C	80 seg	72°C	45 seg
Extensión final	71°C	4 min	72°C	5 min
Mantenimiento	10°C	10 seg	10°C	10 seg

2. Guarde los productos de PCR a -20°C hasta realizar el proceso de genotipificación.

Anexo 16. POE Genotipificación VPH (Genotyping kit HPV GP)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR
Genotipificación VPH (Genotyping kit HPV GP)**

Elaborado por: Yessy Cabrera Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: __/__/__ Firma _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____
Versión: Numero 2 Revisado por: Wendy Valladares Firma: _____	Páginas: 4 Fecha: 5 de febrero del 2015
Objetivo: Establecer el procedimiento para la genotipificación de VPH	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Toallas de papel desechables2. Gabacha3. Guantes desechables4. Etanol al 70%5. Muestras y controles6. Micropipeta de 10 µl, 100 µl y 1 ml7. Puntas descartables estériles de 1 ml8. Puntas descartables estériles 100 µl9. Pinzas10. Probetas graduadas 50 y 100 ml11. Tubos cónicos estériles de 15 ml12. Vortex13. Microcentrífuga14. Horno de Hibridación15. Termómetro calibrado16. Agitador orbital17. Agua Destilada18. Lápiz carbón	
Materiales incluidos en el kit de genotipificación:	

1. Tiras de reacción
2. Solución de Desnaturalización
3. Solución de Hibridación
4. Solución de lavado astringente
5. Conjugado 100x
6. Diluyente de conjugado
7. Sustrato 100x (BCIP/NBT)
8. Diluyente de sustrato
9. Solución de lavado 5x

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo:

1. Limpie todas las superficies con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma las superficies de las pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de utilizarlos.

B. Preparación de soluciones de trabajo:

1. Conjugado: diluir 1:100 con diluyente de conjugado. La solución es estable por 8 horas a temperatura ambiente, protegido de la luz.
2. Sustrato: diluir 1:100 con diluyente de sustrato. La solución es estable por 8 horas a temperatura ambiente, protegido de la luz.
3. Solución de lavado: diluir 1:5 con agua destilada.

C. Desnaturalización e Hibridación:

Nota. Utilizar guantes desechables y pinzas

1. Precaliente el horno de hibridación a $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Verifique la temperatura con un termómetro calibrado y ajuste si es necesario. Precalentar la solución de hibridación y la solución de lavado astringente a 37°C . Mezclar antes de utilizar
2. Utilizando pinzas, retire la cantidad necesaria de tiras (1 tira por muestra) y colocar el número de identificación por encima de la línea de marcación.
3. Tome el número necesario de canales de prueba (1 canal por muestra) y colóquelos en la bandeja.
4. Pipetee 10 μl de solución de desnaturalización en la esquina superior de cada canal.

Nota. Cierre el envase inmediatamente después de su uso.

5. Adicione 10 μl de los productos de amplificación a la solución de desnaturalización y cuidadosamente mezcle por pipeteo. Incube a temperatura ambiente ($20- 25^{\circ}$) durante 5 minutos.
6. Agite la solución de hibridación precalentada y agregue suavemente

2 ml al producto amplificado desnaturalizado en cada canal. Tener cuidado de no contaminar el canal adyacente durante el pipeteo.

7. Inmediatamente coloque la tira en el canal. Las tiras deben ser completamente sumergidas en la solución.
8. Coloque la bandeja en el horno de hibridación con agitación (aproximadamente 80 rpm) e incube durante 60 minutos.

D. Lavado astringente

1. Después de la hibridación retire la bandeja del horno
2. Mantenga los canales inclinados y aspire el líquido del canal con una micropipeta. Añadir 2 ml de solución de lavado astringente precalentada a cada canal y enjuague inclinando la bandeja de 10 a 20 segundos a temperatura ambiente. Aspire la solución de cada canal.
3. Repita este paso de lavado una vez. (2 lavados)
4. Por último, aspire la solución e incube cada tira en 2 ml de solución de lavado astringente precalentada en el horno de hibridación durante 30 minutos.

Nota. Prepare la solución de lavado y conjugado durante esta incubación.

E. Desarrollo de color

Todas las incubaciones posteriores se llevan a cabo en rotación a temperatura ambiente.

1. Lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 2 ml de solución de lavado diluida. Aspire.
2. Añada 2 ml de conjugado a cada cubeta e incube durante 30 minutos con agitación. Aspirar.

Nota. Prepare el sustrato 10 minutos antes del final de este periodo de incubación.

3. Lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 2 ml de solución de lavado diluida y lave una vez más con 2 ml de diluyente de sustrato. Aspire.
4. Añada 2 ml de sustrato a cada canal e incube durante 30 minutos con agitación. Aspire.
5. Detenga la reacción mediante el lavado de las tiras dos veces con 2 ml agua destilada mientras esta en rotación durante al menos 3 minutos.
6. Utilizando pinzas, retire las tiras de los canales y colóquelos en papel absorbente. Deje que las tiras se sequen completamente y fíjelos a la hoja de presentación de los datos. La línea superior es la línea de

marcado. La línea de control de conjugado ayuda a la alineación correcta de las tiras a la hoja de presentación de los datos.

F. Resultados

Una línea se considera positivo cuando aparece una banda púrpura/marrón al final del procedimiento.

Anexo 17. POE Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para L1 (MY)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para L1 (MY)	
Elaborado por: Wendy Valladares Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: <u>23 /03 /2017</u> Firma _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____
Versión: 1	Páginas: 3
Objetivo: Establecer el procedimiento para la amplificación de ADN para la región L1 (MY) del VPH 16.	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Cámara con luz ultravioleta2. Toallas de papel desechables3. Etanol 70%4. Viales para PCR 0.2 ml5. Termociclador6. Agua libre de nucleasas7. Guantes desechables8. Puntas descartables esteriles con filtro9. Micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1 ml10. Vortex	

11. Microcentrifuga
12. ADN polimerasa Ampli Taq Gold
13. Buffer PCR 10x
14. MgCl₂ 50 mM
15. dNTP 200 mM
16. Muestras y controles
17. Iniciadores MY9/MY11
18. Agarosa
19. Buffer TAE 0.05%
20. Cámara electroforética
21. Transluminador
22. Buffer de carga
23. Bromuro de etidio
24. Beaker
25. Balanza analítica
26. Marcador de peso molecular de 100 pb

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo

1. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras, limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma la superficies de las pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
3. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras. Cierre la cámara

Para el PCR 13 µl de ADN de las muestras y controles son analizados en un volumen final de 25 µl.

El control positivo contiene ADN específico de VPH tipo 16

Nota. Se recomienda preparar la Mezcla maestra para las 22 reacciones de PCR de una vez. Alícuotar la Mezcla maestra en cantidades de 12 µl en viales de PCR. Guardar los viales en el área blanca a -20°C.

B. Área Blanca

1. Utilice la siguiente Tabla para calcular el volumen de reactivo necesario para preparar la cantidad de mezcla maestra:

--	--	--

Paso	Mezcla maestra PCR	Cantidades (µl)
1	Buffer PCR10x	2.5
2	MgCl ₂ 2.0 Mm	1.25
3	dNTP 200 mM	2.5
4	Primer MY09	2.5
5	Primer MY11	2.5
6	Agua libre de nucleasas	0.55
7	ADN polimerasa Ampli Taq 1 U/µl	0.2
8	Volumen final	12

2. Descongele por completo los reactivos a utilizar.
3. Pipetee cada uno de los componentes en un tubo de microcentrífuga estéril.
4. Agite la mezcla durante 10 segundos y centrifugue.
5. Dispense 12 µl de mezcla maestra en cada tubo de reacción de PCR.

C. Área Gris

1. Adicione 12 µl de ADN a los viales de PCR que contienen la mezcla maestra, homogenice por pipeteo.
2. Controles: adicione 12 µl de control positivo al vial de PCR que contiene la mezcla maestra y homogenice por pipeteo. Como control negativo utilice 12 µl de agua libre de nucleasas.

D. Área Negra

1. Coloque los viales de PCR en el termociclador y ejecute el programa de PCR descrito a continuación:

	Programa PCR (MY L1) VPH 16	
	Temperatura	Tiempo

Activación de AmpliTaq	94°C	2.30 min
40 ciclos de PCR	94°C	30 seg
	45°C	30 seg
	72°C	30 seg
Extensión final	72°C	4 min

2. Guarde los productos de PCR a -20°C hasta realizar la electroforesis.

E. Área Negra

1. Preparar el área de trabajo y desinfecte con alcohol al 70%.
2. Dejar lista la cámara de electroforesis con el buffer TAE 0.05% y con el peine según los pocillos a utilizar.
3. Realizar el gel adicionando a un beaker 1.4 g de agarosa y 70 ml del buffer al 0,05%
4. Calentar la mezcla hasta que la agarosa se disuelva completamente.
5. Dejar atemperar la mezcla
6. Luego adicionar 2 ul de bromuro de etidio y vierta en la cámara electroforética.
7. Dejar solidificar
8. Una vez solidificado retirar el peine y prepare sus amplicones
9. Adicione una mezcla de 5 ul del amplicon y 3 ul de buffer de carga a cada uno de los pocillos.
10. Adicione 2 ul del marcador de peso molecular de 100 pb
11. Una vez colocadas todas las muestras cerrar la cámara electroforética y conecte a la fuente de poder.
12. Asegurarse de conectar correctamente los cables a la fuente de poder.
13. Encender la fuente y dejar correr las muestras por 40 minutos a 100 voltios.
14. Al finalizar retirar el gel de la cámara y llevarlo al transluminador.
15. Encender el transluminador y realizar la lectura.
16. Se debe ver una banda de 450 pb.

**Anexo 18. POE Electroforesis capilar mediante el uso de la química BigDye
(Secuenciación enzimática tipo Sanger)**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Electroforesis capilar mediante el uso de la química BigDye (Secuenciación enzimática tipo Sanger)	
Elaborado por: Wendy Valladares Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: <u>23/03/2017</u> Firma _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____
Versión: 1	Páginas: 3
Objetivo: Establecer el procedimiento para realizar la secuenciación del VPH.	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Cámara con luz ultravioleta2. Toallas de papel desechables3. Etanol 70%4. Viales para PCR 0.2 ml5. Termociclador6. Agua libre de nucleasas7. Guantes desechables8. Puntas descartables esteriles con filtro9. Micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1 ml10. Vortex11. Microcentrifuga12. ADN polimerasa Ampli Taq Gold13. Buffer PCR 10x14. MgCl₂ 50 mM15. dNTP 200 mM16. Iniciadores MY9/MY1117. Beaker18. Balanza analítica19. Enzima EXO-SAP	

- 20. Big Dye terminador
- 21. Primer L1(MY)-fw
- 22. Buffer 5x de secuenciación
- 23. Columnas con sefades
- 24. Formamida
- 25. Placa 96 pocillos para secuenciación

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo

1. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras, limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma la superficies de las pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
3. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras. Cierre la cámara
4. Para el PCR 13 µl de ADN de las muestras y controles son analizados en un volumen final de 25 µl.

Nota. Alícuotar la Mezcla maestra en cantidades de 12 µl en viales de PCR. Guardar los viales en el área blanca a -20°C.

B. Área Blanca (Purificación de producto de PCR por EXO-SAP)

1. Agregar 2 µL de la enzima EXO-SAP a un tubo eppendorf más 5 µL de producto de PCR = 7 µL totales.
2. Incubar a las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	37°C	15 min
1	80°C	15 min
	4°C	∞

C. Área Gris

1. Descongelar reactivos en hielo.
2. Preparar la mezcla de reacción en hielo.
3. Agregar 1.5 µL (o la cantidad establecida) de producto de PCR tratado con EXO-SAP a los 4 µL de la mezcla de reacción de secuencia = 5.5 µL totales.
4. Incubar a las siguientes condiciones:

Reactivos secuencia	1x (μL)	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Big Dye terminador	2		96°C	1 MIN
Buffer 5x de secuenciación	1	25	96°C	30 SEG
Primer L1(MY)-fw	1		54°C	15 SEG
Volumen total	4		60°C	1:30 MIN
			4°C	∞

D. Área Negra (Purificación en columnas)

1. Preparar las columnas con 800 μL de sefades un día antes evitando la formación de burbujas.
2. Colocar la columna en un tubo de recolecta, retirar el exceso de líquido con la perilla y centrifugar a 2800r por 2 minutos.
3. Transferir la columna a un tubo de recolecta nuevo (tubo eppendorf de 1.5 μL).
4. Agregar a los productos de secuencia 14.5 μL de agua inyectable para obtener un volumen final de 20 μL .
5. Colocar los 20 μL de la mezcla en el centro de la columna y centrifugar a 2800r por 2 minutos.
6. Retirar el tubo de recolecta el cual contiene nuestra muestra y mantener en hielo. A las columnas se les retira el sefades y se lavan.
7. Secar la muestra purificada al vacío.

E. Área Negra (Electroforesis capilar)

1. Diluir la muestra con 20 μL de formamida y mezclar con la pipeta (o vórtex y centrifugación). incubar a 95 °C durante 5 minutos (o cargar las muestras en placa de lectura y después incubar a 95°C durante 5 minutos en termociclador sin bajar la tapa).
2. Cargar en la placa de 96 pozos.
3. Colocar la placa en el equipo ABI PRISM 3130 y correr.

Anexo 19. POE Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para E6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para E6	
Elaborado por: Wendy Valladares Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: <u>23/03/2017</u> Firma _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____
Versión: 1	Páginas: 3
Objetivo: Establecer el procedimiento para la amplificación de ADN para la región E6 VPH 16.	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Cámara con luz ultravioleta2. Toallas de papel desechables3. Etanol 70%4. Viales para PCR 0.2 ml5. Termociclador6. Agua libre de nucleasas7. Guantes desechables8. Puntas descartables esteriles con filtro9. Micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1 ml10. Vortex11. Microcentrifuga12. ADN polimerasa Ampli Taq Gold13. Buffer PCR 10x14. MgCl₂ 50 mM15. dNTP 200 mM16. Muestras y controles17. Iniciadores MY9/MY1118. Agarosa19. Buffer TAE 0.05%20. Cámara electroforética21. Transluminador	

- 22. Buffer de carga
- 23. Bromuro de etidio
- 24. Beaker
- 25. Balanza analítica
- 26. Marcador de peso molecular 100 pb

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo

1. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras, limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma la superficies de las pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
3. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras. Cierre la cámara
4. Para el PCR 5 µl de ADN de las muestras y controles son analizados en un volumen final de 25 µl.
5. El control positivo contiene ADN específico de VPH tipo 16

Nota. Se recomienda preparar la Mezcla maestra para las 22 reacciones de PCR de una vez. Alícuotar la Mezcla maestra en cantidades de 20 µl en viales de PCR. Guardar los viales en el área blanca a -20°C.

B. Área Blanca

1. Utilice la siguiente Tabla para calcular el volumen de reactivo necesario para preparar la cantidad de mezcla maestra:

Paso	Mezcla maestra PCR	Cantidades (µl)
1	Buffer PCR1x	2.5
2	MgCl ₂ 2.0 Mm	1
3	dNTP 200 mM	2.5
4	Primer E6	2.5
5	Primer E7	2.5
6	Agua libre de nucleasas	8.8

7	ADN polimerasa Ampli Taq 1 U/ μ l	0.2
8	Volumen final	20

2. Descongele por completo los reactivos a utilizar.
3. Pipetee cada uno de los componentes en un tubo de microcentrífuga estéril.
4. Agite la mezcla durante 10 segundos y centrifugue.
5. Dispense 5 μ l de mezcla maestra en cada tubo de reacción de PCR.

C. Área Gris

1. Adicione 12 μ l de ADN a los viales de PCR que contienen la mezcla maestra, homogenice por pipeteo.
2. Controles: adicione 12 μ l de control positivo al vial de PCR que contiene la mezcla maestra y homogenice por pipeteo. Como control negativo utilice 12 μ l de agua libre de nucleasas.

D. Área Negra

1. Coloque los viales de PCR en el termociclador y ejecute el programa de PCR descrito a continuación:

Programa PCR (MY L1)\VPH 16		
	Temperatura	Tiempo
Activación de AmpliTaq	94°C	5 min
40 ciclos de PCR	94°C	30 seg
	55°C	30 seg
	72°C	30 seg
Extensión final	72°C	7 min

2. Guarde los productos de PCR a -20°C hasta realizar la electroforesis.

E. Área Negra

1. Preparar el área de trabajo y desinfecte con alcohol al 70%.
2. Dejar lista la cámara de electroforesis con el buffer TAE 0.05% y con el peine según los pocillos a utilizar.
3. Realizar el gel adicionando a un beaker 1.4 g de agarosa y 70 ml del buffer al 0,05%
4. Calentar la mezcla hasta que la agarosa se disuelva completamente.
5. Dejar atemperar la mezcla
6. Luego adicionar 2 ul de bromuro de etidio y vierta en la cámara electroforética.
7. Dejar solidificar
8. Una vez solidificado retirar el peine y prepare sus amplicones
9. Adicione una mezcla de 5 ul del amplicon y 3 ul de buffer de carga a cada uno de los pocillos.
10. Adicione 2 ul del marcador de peso molecular de 100 pb
11. Una vez colocadas todas las muestras cerrar la cámara electroforética y conecte a la fuente de poder.
12. Asegurarse de conectar correctamente los cables a la fuente de poder.
13. Encender la fuente y dejar correr las muestras por 40 minutos a 100 voltios.
14. Al finalizar retirar el gel de la cámara y llevarlo al transluminador.
15. Encender el transluminador y realizar la lectura.
16. Se visualizara una banda de 610 pb

Anexo 20. POE Detección de oncoproteína E6 de subtipos 16 y 18 de VPH (OncoE6 Cervical Test)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Detección de oncoproteína E6 de subtipos 16 y 18 de VPH (OncoE6 Cervical Test)	
Elaborado por: Yessy Cabrera Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: __/__/__ Firma _____	Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____
Versión: Numero 2 Revisado por: Wendy Valladares Firma: _____	Páginas: 3 Fecha: 5 de febrero del 2015
Objetivo: Establecer el procedimiento para la determinación cualitativa de la oncoproteína E6 de los subtipos 16 y 18 de VPH.	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Cámara con luz ultravioleta2. Toallas de papel desechables3. Gabacha4. Guantes desechables5. Etanol al 70%6. Muestras y controles7. Micropipeta de 1 ml8. Micropipeta de 100 µl9. Puntas descartables estériles y con filtro de 1 ml10. Puntas descartables estériles y con filtro de 100 µl11. Rotador12. Microcentrífuga13. Timer14. Termómetro calibrado	
Materiales incluidos en el kit de OncoE6: <ol style="list-style-type: none">1. Solución de lisis (Solución A)2. Solución de acondicionamiento (Solución B)3. Reactivo de detección (Solución C)	

4. Solución de lavado (Solución D)
5. Solución de desarrollo (Solución E)
6. Tubos de lisis
7. Viales de lavado
8. Unidades de reacción

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo

1. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras, limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma la superficies de las pipetas, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
3. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras
4. Cierre la cámara

B. Extracción de proteínas

Colóquese la gabacha y los guantes

26. Pipetee 930 μ l de solución de lisis A y adicione al tubo de lisis que contiene el aplicador, evite la formación de burbujas y cierre cuidadosamente el tubo.
27. Mezcle cada muestra por agitación vigorosa durante 3 segundos
28. Coloque los tubos en el rotador y mezcle por rotación a 8 rpm durante 15 minutos.
29. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 segundos

C. Acondicionamiento y purificación de muestras

1. Pipetee 87 μ l de solución de acondicionamiento B y adicione al tubo de lisis. Cuidadosamente cierre la tapa del tubo
2. Mezcle cada muestra por agitación vigorosa durante 3 segundos
3. Coloque los tubos en el rotador y mezcle por rotación a 8 rpm durante 15 minutos
4. Centrifugar los tubos a 10000 rpm durante 10 minutos

D. Detección

1. Prepare un frasco de reactivo de detección C para cada muestra
2. De manera cuidadosa retire la tapa metálica que protege la tapa de cada frasco de reactivo
3. Coloque los frascos de reactivo de detección en la plataforma indicada
4. Transcurrida la centrifugación traslade de manera cuidadosa los viales a la plataforma de trabajo
5. Pipetee 200 μ l del sobrenadante, manteniendo la punta cerca de la superficie del líquido, de manera que se evite aspirar parte del sedimento y tocar el hisopo
6. Mezcle de manera circular (5 a 10 segundos) hasta disolver el contenido
7. Incube de 5 a 15 minutos
8. Rotule las tiras de detección con el código que identifica a la muestra correspondiente

9. Cuidadosamente coloque las tiras de detección en su respectivo frasco de reactivo de detección C

10. Incube durante 55 minutos para permitir la migración de la solución por la tira de detección

Nota. Durante los últimos 15 minutos, prepare las soluciones de los pasos de lavado y desarrollo de color

- Coloque los viales de lavado en la plataforma y coloque 200 µl de solución de lavado D
- Coloque los tubos de desarrollo de color en la plataforma y coloque 650 µl de solución de desarrollo E

E. Lavado

1. Traslade las tiras de detección a su respectivo frasco de lavado
2. Incube 12 minutos

Nota: una vez en la solución de lavado evite mover la tira

F. Desarrollo de color

1. Traslade las tiras de detección al tubo con la solución de desarrollo E
2. Incube durante 15 minutos
3. Proceda a realizar la lectura de la tira

G. Interpretación

1. Coloque la tira en la Tabla de lectura provista por el fabricante para la lectura de los resultados
2. Alinear la línea del control con la marca indicada en la Tabla de lectura
 - Resultado negativo: solo es visible la línea del control
 - Resultado positivo E6 18: son visibles las líneas del control y la línea del genotipo 18
 - Resultado positivo E6 16: son visibles las líneas del control y la línea del genotipo 16
 - Resultado no valido: no es visible la línea del control

Anexo 21. POE Amplificación de ADN (INNO-LIPA HPV Genotyping Extra)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURA ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Amplificación de ADN (INNO-LIPA HPV Genotyping Extra)	
Elaborado por: Wendy Valladares Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: <u>5 /Febrero / 2016</u> Firma _____	Aprobado por: Fecha: <u> / / </u> Firma _____
Versión: Numero 1	Páginas: 3
Objetivo: Establecer el procedimiento para la amplificación de ADN para posterior realización de genotipificación de VPH mediante el método de INNO-LIPA	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Cámara con luz ultravioleta2. Toallas de papel desechables3. Etanol 70%4. Viales para PCR 0.2 ml5. Termociclador6. Guantes desechables7. Puntas descartables esteriles con filtro8. Micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1 ml9. Vortex10. Microcentrifuga11. Muestras y controles	
Materiales incluidos en el kit de amplificación <ol style="list-style-type: none">1. AMP Mix2. ENZ Mix3. Control positivo	
Procedimiento: <ol style="list-style-type: none">A. Preparación del área de trabajo<ol style="list-style-type: none">1. Al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras,	

- limpie todas las superficies internas de la cámara con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma la superficies de las pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de introducirlos a la cámara
 3. Encienda la luz ultravioleta de la cámara al menos 20 minutos antes de iniciar el procesamiento de las muestras. Cierre la cámara

Para el PCR 10 µl de ADN de las muestras y controles son analizados en un volumen final de 50 µl.

El control positivo contiene ADN específico de VPH tipo 18. **Nota.** Se recomienda preparar la Mezcla maestra para las 22 reacciones de PCR de una vez. Alícuotar la Mezcla maestra en cantidades de 40 µl en viales de PCR. Guardar los viales en el área blanca a -20°C.

B. Área Blanca

1. Utilice la siguiente Tabla para calcular el volumen de reactivo necesario para preparar la cantidad de mezcla maestra:

Paso	Mezcla maestra PCR	Volumen 1 Reacción
		VPH GP (µl)
1	AMP Mix	37.7
2	ENZ Mix	2.3
7	Volumen final	40

2. Descongele por completo los reactivos a utilizar.
3. Pipetee cada uno de los componentes en un tubo de microcentrífuga estéril.
4. Agite la mezcla durante 10 segundos y centrifugue.
5. Dispense 40 µl de mezcla maestra en cada tubo de reacción de PCR.

C. Área Gris

1. Adicione 10 µl de ADN a los viales de PCR que contienen la mezcla maestra, homogenice por pipeteo.
2. Controles: adicione 10 µl de control positivo al vial de PCR que contiene la mezcla maestra y homogenice por pipeteo. Como control negativo

utilice 10 µl de agua libre de nucleasas.

D. Área Negra

1. Coloque los viales de PCR en el termociclador y ejecute el programa de PCR descrito a continuación:

programa PCR VPH GP			
	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización	94°C	9 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	40
Hibridación	52°C	45 seg	
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	45 seg	1
Temperatura final	4°C	10 eg	

2. Guarde los productos de PCR a -20°C hasta realizar el proceso de genotipificación.

Anexo 22. POE Genotyping VPH (INNO-LIPA HPV Genotyping Extra)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR Genotipificación VPH (INNO-LIPA HPV Genotyping Extra)	
Elaborado por: Wendy Valladares Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: <u>5 /Febrero / 2016</u> Firma _____	Aprobado por: Fecha: <u> / / </u> Firma _____
Versión: Numero 1	Páginas: 4
Objetivo: Establecer el procedimiento para la genotipificación de VPH mediante la método de INNO-LIPA	
Materiales: <ol style="list-style-type: none">1. Toallas de papel desechables2. Gabacha3. Guantes desechables4. Etanol al 70%5. Muestras y controles6. Micropipeta de 10 µl, 100 µl y 1 ml7. Puntas descartables estériles de 1 ml8. Puntas descartables estériles 100 µl9. Pinzas10. Probetas graduadas 50 y 100 ml11. Tubos cónicos estériles de 15 ml12. Vortex13. Microcentrífuga14. Horno de Hibridación15. Termómetro calibrado16. Agitador orbital17. Agua Destilada18. Lápiz carbón	
Materiales incluidos en el kit de genotipificación: <ol style="list-style-type: none">1. Tiras de reacción2. Solución de Desnaturación	

3. Solución de Hibridación
4. Solución de lavado astringente
5. Conjugado 100x
6. Diluyente de conjugado
7. Sustrato 100x (BCIP/NBT)
8. Diluyente de sustrato
9. Solución de lavado 5x

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo:

1. Limpie todas las superficies con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma las superficies de las pipetas, vortex, gradillas, etc. antes de utilizarlos.

B. Preparación de soluciones de trabajo:

1. Conjugado: diluir 1:100 con diluyente de conjugado. La solución es estable por 8 horas a temperatura ambiente, protegido de la luz.
2. Sustrato: diluir 1:100 con diluyente de sustrato. La solución es estable por 8 horas a temperatura ambiente, protegido de la luz.
3. Solución de lavado: diluir 1:5 con agua destilada.

C. Desnaturalización e Hibridación:

Nota. Utilizar guantes desechables y pinzas

1. Precaliente el horno de hibridación a $49^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Verifique la temperatura con un termómetro calibrado y ajuste si es necesario. Precalentar la solución de hibridación y la solución de lavado astringente a 37°C . Mezclar antes de utilizar
2. Utilizando pinzas, retire la cantidad necesaria de tiras (1 tira por muestra) y colocar el número de identificación por encima de la línea de marcación.
3. Tome el número necesario de canales de prueba (1 canal por muestra) y colóquelos en la bandeja.
4. Pipetee 10 μl de solución de desnaturalización en la esquina superior de cada canal.

Nota. Cierre el envase inmediatamente después de su uso.

5. Adicione 10 μl de los productos de amplificación a la solución de desnaturalización y cuidadosamente mezcle por pipeteo. Incube a temperatura ambiente ($20- 25^{\circ}$) durante 5 minutos.
6. Agite la solución de hibridación precalentada y agregue suavemente 2 ml al producto amplificado desnaturalizado en cada

canal. Tener cuidado de no contaminar el canal adyacente durante el pipeteo.

7. Inmediatamente coloque la tira en el canal. Las tiras deben ser completamente sumergidas en la solución.
8. Coloque la bandeja en el horno de hibridación con agitación (aproximadamente 80 rpm) e incube durante 60 minutos.

D. Lavado astringente

1. Después de la hibridación retire la bandeja del horno
2. Mantenga los canales inclinados y aspire el líquido del canal con una micropipeta. Añadir 2 ml de solución de lavado astringente precalentada a cada canal y enjuague inclinando la bandeja de 10 a 20 segundos a temperatura ambiente. Aspire la solución de cada canal.
3. Repita este paso de lavado una vez. (2 lavados)
4. Por último, aspire la solución e incube cada tira en 2 ml de solución de lavado astringente precalentada en el horno de hibridación durante 30 minutos.

Nota. Prepare la solución de lavado y conjugado durante esta incubación.

E. Desarrollo de color

Todas las incubaciones posteriores se llevan a cabo en rotación a temperatura ambiente.

1. Lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 2 ml de solución de lavado diluida. Aspire.
2. Añada 2 ml de conjugado a cada cubeta e incube durante 30 minutos con agitación. Aspire.

Nota. Prepare el sustrato 10 minutos antes del final de este periodo de incubación.

3. Lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 2 ml de solución de lavado diluida y lave una vez más con 2 ml de diluyente de sustrato. Aspire.
4. Añada 2 ml de sustrato a cada canal e incube durante 30 minutos con agitación. Aspire.
5. Detenga la reacción mediante el lavado de las tiras dos veces con 2 ml agua destilada mientras esta en rotación durante al menos 3 minutos.
6. Utilizando pinzas, retire las tiras de los canales y colóquelos en papel absorbente. Deje que las tiras se sequen completamente y fíjelos a la hoja de presentación de los datos. La línea superior es la línea de marcado. La línea de control de conjugado ayuda a la

alineación correcta de las tiras a la hoja de presentación de los datos.

F. Resultados

Una línea se considera positivo cuando aparece una banda púrpura/marrón al final del procedimiento.

Anexo 23. POE Técnica de inmunohistoquímica detección de p16^{INK4a}

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR
Técnica de inmunohistoquímica detección de p16^{INK4a}**

Elaborado por: Wendy Valladares
Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera
Fecha: 5 /Febrero / 2016
Firma _____

Aprobado por:
Fecha: / /
Firma _____

Versión: Numero 1

Páginas: 3

Objetivo: Establecer el procedimiento para la detección del Anticuerpo monoclonal p16^{INK4a} mediante la técnica de Inmunohistoquímica.

Materiales:

1. Baño María
2. Congelador
3. Micrótopo
4. Incubadora
5. Cuchilla
6. Laminas electrocargadas
7. Soporte
8. Moldes de metal para cubos
9. Procesador automático de biopsias
10. Horno
11. Batería de coloración
12. Cronómetro
13. Porta láminas de metal
14. Batería de coloración

15. Olla de presión
16. Cubetas para tejido
17. Formalina buferada 10X
18. Xilol
19. Alcohol 95%
20. Acetona
21. Parafina
22. Cubre Objetos
23. Microscopio
24. Agua destilada
25. Hematoxilina
26. Permount

Materiales incluidos en el kit de inmunohistoquímica:

1. InmunoWasher 10X
2. InmunoRetriever 20X
3. Peroxidase Block
4. Solucion Biotina
5. Solucion HRP
6. Solución DAB Cromogeno
7. Buffer DAB
8. Anticuerpo Anti p16 ^{INK4a} (prediluido)

Procedimiento:

A. Preparación del área de trabajo:

1. Limpie todas las superficies con etanol al 70%
2. Limpie de igual forma las superficies de las pipetas antes de utilizarlos.
3. Encienda el baño María a 45 °C

B. Preparación de soluciones de trabajo:

1. InmunoWasher 10X, mantener a temperatura ambiente
Preparar 100 mL haciendo una dilución 1:10
10 mL de la solución de lavado
90 mL de agua destilada.
2. InmunoRetriever 20X mantener a temperatura ambiente
Preparar 1000 mL haciendo una dilución 1:20
50 mL solución InmunoRetriever
950 mL de agua destilada
3. Solución DAB Cromógeno.
Relación 1 mL Buffer/1 gota de reactivo DAB
Preparar en el momento de uso, reactivos deben estar

almacenados a 20°C

C. Inclusión

1. Seleccionar la parte del tejido a analizar
2. Realizar los cortes del tejido a analizar
3. Colocar los cortes en las cubetas plásticas para tejido
4. Colocar dentro de las cubetas una tira de papel filtro con el código de identificación del tejido.
5. Depositar la cubeta en el recipiente del Procesador automático de biopsias, el cual realiza 12 pasos.
 - i. Una hora en formalina buferada 10x
 - ii. Una hora en alcohol al 95%
 - iii. Una hora en alcohol al 95%
 - iv. Una hora en alcohol al 95%
 - v. Una hora en alcohol al 95%
 - vi. Una hora en alcohol al 95%
 - vii. Una hora en alcohol al 95%
 - viii. Una hora en Acetona
 - ix. Una hora en xilol
 - x. Una hora en xilol
 - xi. Una hora en parafina líquida 60°C - 65°C
 - xii. Una hora en parafina líquida 60°C - 65°C
6. Retirar la cubeta del recipiente con parafina.
7. Colocar el tejido sobre el porta lamina de metal
8. Tomar los moldes para cubos y colocarlos alrededor del tejido formando un cubo.
9. Colocar el código de identificación del tejido en la esquina del molde del cubo. El tamaño del cubo es proporcional al tamaño del tejido.
10. Calentar la parafina 60°C - 65°C hasta que se encuentre en estado líquido.
11. Con precaución rellenar el cubo donde se encuentra el tejido, con la parafina líquida.
12. Colocar en el congelador por 20 minutos a -20°C para enfriar la parafina.
13. Una vez fría, retirar los moldes y el porta láminas de metal, dejando el cubo de parafina libre, con su código de identificación adherido.

D. Corte del tejido

1. Revisar la temperatura del baño maría

2. Tomar el cubo del tejido en parafina y colocarlo en el micrótomo para realizar los cortes.
3. Asegurarse que el cubo quede firme, para evitar que se realice un corte inadecuado.
4. Proceder a cortar el tejido obteniendo un corte de 3 a 5 um de diámetro.
5. Colocar el corte sobre un portaobjetos electro cargado.
6. Escribir con lápiz grafito el código de identificación del tejido en el portaobjeto.
7. Asegurarse de colocar el corte en la parte inferior del portaobjeto.
8. Adicionar una gota de la solución previamente preparada (Agua destilada + alcohol 95%) para ayudar a adherir el corte al portaobjeto.
9. Colocar el portaobjetos en el baño maría previamente encendido.
10. El tejido se desprenderá, tomarlo nuevamente con el portaobjetos tratando de colocarlo en la posición más adecuada.

E. Desparafinar

1. Colocar la lámina con el tejido previamente adherido en un porta láminas de metal.
2. Colocar el porta láminas dentro del horno a a 120 °C por 5 minutos.
3. Una vez terminado retirar cuidadosamente del horno y colocar el porta laminas en xilol por un minuto.
4. Cambiar el xilol y realizar un nuevo baño por un minuto.
5. Nuevamente cambiar el xilol y realizar un nuevo baño por un minuto.

F. Deshidratar

1. Traspasar el porta láminas en alcohol al 95% de la batería de coloración, durante un minuto.
2. Traspasar el porta láminas nuevamente en alcohol al 95% durante un minuto
3. Traspasar el porta láminas nuevamente en alcohol al 95% durante un minuto

G. Rehidratar

1. Colocar el porta láminas en agua destilada durante un minuto.
2. Colocar el porta láminas en la solución de lavado InmunboWasher previamente diluida por diez minutos.

H. Recuperación antigénica

1. Preparar la olla de presión, adicionando agua destilada asegurándose que se cubra la rejilla en su interior.

2. Agregar el porta laminas en la solución InmunoRetriever
3. Introducirlo dentro de la olla de presión.
4. Asegurar la olla, cerrándola y encenderla a 120 °C por 15 minutos.
5. Una vez finalizado, tener mucha precaución y liberar la presión de la olla antes de abrirla.
6. Al salir toda la presión, retirar cuidadosamente el porta láminas y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

I. Aparear portas y lavado

1. Colocar los portaobjetos en el apareador de láminas, colocar en parejas, si no se cuenta con una lámina equiparar con una nueva.
2. Dejar reposar los portaobjetos apareados en la solución InmunoWasher por un minuto.
3. Al finalizar el minuto quitar el exceso de solución en una servilleta, hasta que no se observe solución de lavado.
4. Repetir este paso cuatro veces.
5. Verificar que no se formen burbujas entre las laminas

J. Bloqueo peroxidasa END.

1. Agregar 125 ul de la solución peroxidasa block en los pocillos de la batería de coloración.
2. Tomar el apareador de láminas y hacer que los portaobjetos toquen la solución.
3. Observar cómo está se sube por capilaridad entre los portaobjetos.
4. Incubar los portaobjetos a 37°C cinco minutos.
5. Retirar la peroxidasa con servilletas
6. Lavar tres veces por un minuto usando ImmunoWasher como en los pasos anteriores.

K. Anticuerpo primario

1. Agregar 125 ul del anticuerpo primario prediluido en los pocillos de la batería de coloración.
2. Tomar el apareador de láminas y hacer que los portaobjetos toquen la solución.
3. Observar cómo está se sube por capilaridad entre los portaobjetos.
4. Incubar los portaobjetos a 37°C por media hora minutos.
5. Retirar el anticuerpo primario con servilletas
6. Lavar cinco veces por un minuto usando ImmunoWasher como en los pasos anteriores.

L. Anticuerpo secundario-Biotina

1. Agregar 125 ul del anticuerpo secundario biotina en los pocillos de la batería de coloración.
2. Tomar el apareador de láminas y hacer que los portaobjetos

toquen la solución.

3. Observar cómo está se sube por capilaridad entre los portaobjetos.
4. Incubar los portaobjetos a 37°C por diez minutos.
5. Retirar el anticuerpo secundario con servilletas
6. Lavar cinco veces por un minuto usando ImmunoWasher como en los pasos anteriores.

M. Anticuerpo terciario-HRP

1. Agregar 125 ul del anticuerpo terciario en los pocillos de la batería de coloración.
2. Tomar el apareador de láminas y hacer que los portaobjetos toquen la solución.
3. Observar cómo está sube por capilaridad entre los portaobjetos.
4. Incubar los portaobjetos a 37°C por diez minutos.
5. Retirar el anticuerpo terciario con servilletas
6. Lavar cinco veces por un minuto usando ImmunoWasher como en los pasos anteriores.

N. DAB

1. Adicionar 125 ul de la solución DAB previamente preparado en los pocillos de la batería de coloración.
2. Tomar el apareador de láminas y hacer que los portaobjetos toquen la solución.
3. Observar cómo está sube por capilaridad entre los portaobjetos.
4. Incubar los portaobjetos a 37°C por 10 minutos.
5. Retirar el DAB con servilletas.
6. Lavar cinco veces por diez segundos usando InmunboWasher.

O. Coloración con hematoxilina.

1. Sumergir los portaobjetos en Hematoxilina por un minuto.
2. Retirar la hematoxilina con servilletas.
3. Lavar cinco veces usando InmunboWasher.

P. Deshidratar

1. Sumergir en alcohol al 95% dos veces por un minuto.
2. Sumergir en acetona una vez por un minuto

Q. Solvente

1. Sumergir en xilol dos veces por un minuto.

R. Observar e interpretar

2. Tomar el portaobjetos y colocar en la parte donde se encuentra el tejido una gota de Permount.

3. Tomar un cubre objetos y colocarlo sobre la gota de permount.
4. Dejar secar
5. Observar al microscopio.

S. Resultados

Se considera un resultado positivo cuando se observa en el microscopio una coloración café, la ausencia de coloración café se interpreta como un resultado negativo.

Anexo 24. POE Visita de seguimiento a las participantes después de 18 meses del reclutamiento.

<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR</p> <p>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR</p> <p>Visita de seguimiento a las participantes después de 18 meses del reclutamiento.</p>	
<p>Elaborado por: Wendy Valladares Supervisado por: Dra. Annabelle Ferrera Fecha: <u>5 / Febrero / 2016</u> Firma _____</p>	<p>Aprobado por: Fecha: __/__/__ Firma _____</p>
<p>Versión: Numero 1.</p>	<p>Páginas: 3</p>
<p>Objetivo: Establecer el procedimiento para la visita de seguimiento a las participantes después de los 18 meses del reclutamiento.</p>	
<p>Procedimiento:</p> <p>A. Selección de las participantes para el seguimiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Verificar la base de datos de las participantes durante la visita de reclutamiento. 2. Toda participante con un resultado VPH positivo en la visita de reclutamiento y sin lesiones cervicales será seleccionada. <p>B. Procedimiento del Seguimiento:</p>	

1. Pasado los 18 meses de la visita de reclutamiento se procederá a llamar a cada una de las participantes para su visita control, utilizando el formulario de datos personales previamente lleno durante la primera visita.
2. Buscar el número telefónico previsto por la participante y proceder a llamar.
3. En caso no obtener respuesta al realizar la llamada, se utilizará el número de teléfono de un contacto que previamente se proporcionó en la visita de reclutamiento.
4. En caso de que no se obtenga respuesta al llamar al número de contacto, se procederá a realizar una búsqueda domiciliaría utilizando la dirección de la vivienda que aparece en el Formulario de datos personales.

C. Explicación a las participantes

1. Una vez obtenida la respuesta por parte de la participante se le procederá a explicar el motivo de la llamada.
2. Recordándole su visita previa y diciéndole que es una visita control
3. Es importante explicar a la participante que el motivo del seguimiento no es motivo de preocupación.
4. Dar la dirección del centro de salud (CESAMO) al que debe asistir y decir el nombre del médico encargado de recibirla.
5. Acordar el día y la hora tomando en cuenta la disposición de la participante y del médico a atenderle.
6. Se debe aclarar todas las dudas que la participante tenga acerca de la visita de seguimiento.

D. Recepción de las participantes en el centro de Salud

1. Las participantes acudirán al centro de salud más cercano, donde se realizó la visita de reclutamiento.
2. Una vez en el centro de salud el médico del estudio procederá a aclarar y explicar nuevamente la importancia de la visita de seguimiento.

E. Muestras a tomar en la visita de seguimiento

1. El médico procederá a tomar la muestra cervical siguiendo las indicaciones del POE de toma de muestra cervical.

F. Llenado de formularios

1. El personal encargado del estudio procederá a llenar nuevamente el

Formulario de toma de muestra y Formulario de datos personales, con el fin de actualizar esta información.

2. Dichos formularios deben estar previamente identificados con el código de las participantes.
3. Se transportará la muestra colectada siguiendo el POE de transporte de muestras al laboratorio.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**

FORMULARIO DE BIOSEGURIDAD PROMOCIÓN 2015-2017

Si tiene alguna consulta o requiere asistencia para completar este formulario, favor contactar a la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ al correo electrónico <lourdesenriquez10@gmail.com>

Datos Generales	
Nombre de proyecto: <i>Rol de marcadores de proliferación celular y viral y la eliminación o persistencia del VPH como estrategias de triaje y seguimiento a las mujeres VPH positivas</i>	Departamento o unidad ejecutora: Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología
Alumno (s) responsable de la investigación: Wendy Carolina Valladares Motiño	Asesor (s) responsable: Dra. Annabelle Ferrera
Laboratorio (s) en que se llevará a cabo la investigación: 1. Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Microbiología	Instituciones participantes: 1.- Universidad Nacional Autónoma de Honduras 2.-CESAMOS Valle de Ángeles, Cerro Grande, Cantarranas y Santa Lucía Secretaria de Salud Pública de Honduras. 3. Hospital General San Felipe, Secretaria de Salud Pública de Honduras. 4.-Agencia Internacional para la Investigación en cáncer, IARC, Francia.
Naturaleza de la Investigación	
Nombre de los agentes infecciosos que manipulará: <hr/> Virus del Papilloma Humano <hr/>	¿En qué nivel de riesgo están clasificados Los agentes infecciosos que manipulará? 1 <input type="checkbox"/> 3 4 <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

<p>Toda muestra biológica se considera potencialmente infecciosa por lo que deberán tratarse como si lo estuvieran</p> <hr/> <p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) impresas de los agentes que manipulará?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>	<p>¿Cuál es el nivel de bioseguridad con que trabaja el laboratorio en el que desarrollará la investigación?</p> <p>1 <input type="checkbox"/> 3 <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>
<p>¿Utilizará reactivos químicos?</p> <p>Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Enumere las sustancias químicas que utilizará con mayor frecuencia</p> <hr/> <p>Reactivos químicos proporcionados en los kits de reactivos, reactivos comerciales</p>	<p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) de los reactivos químicos que utilizará?</p> <p>Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Revisar las MSDS de cada reactivo y comentar su riesgo potencial y las medidas básicas de seguridad si es necesario</p>
<p>¿En qué estado manipulará el o los agentes infecciosos?</p> <p>Cultivos puros en placa <input type="checkbox"/> Cultivos en tubo <input type="checkbox"/></p> <p>ADN <input checked="" type="checkbox"/> Cultivo de tejidos <input type="checkbox"/></p> <p>Otros <input type="checkbox"/></p> <p>No Aplica</p>	
<p>Tipo de muestras que manipulará</p> <p>Tejidos <input type="checkbox"/></p> <p>Sangre <input type="checkbox"/></p> <p>Orina <input type="checkbox"/></p> <p>Animales <input type="checkbox"/></p>	<p>Heces <input type="checkbox"/></p> <p>Otros líquidos biológicos <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Muestras ambientales* <input type="checkbox"/></p> <p>Cultivos puros <input type="checkbox"/></p> <p>Otras</p>

	<hr/> <p>*Tipo de muestras ambientales</p> <hr/> <hr/>
<p>Describa las técnicas que utilizará</p>	
<p>Prueba de Captura de Híbridos: amplificación de señal con quimioluminiscencia</p>	
<p>Oncoproteína E6: técnica inmunocromatográfica</p>	
<p>LiPA: Amplificación de ADN y Genotipificación</p>	
<p>Extracción de Ácidos Nucleicos QIAGEN</p>	
<p>Método de tinción por inmunohistoquímica p16^{INK4a}</p>	
<p>CONTROLES PRIMARIOS</p>	
<p>Controles de Ingeniería</p>	
<p>¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con cabina de seguridad biológica?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?</p> <hr/> <hr/>	<p>¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con autoclave dentro del laboratorio?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?</p> <hr/> <hr/>
<p>¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con campana de seguridad química?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>	<p>¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con espacio adecuado para realizar la investigación?</p> <p>Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>

Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?	Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?
_____	_____
_____	_____

Equipo de Protección Personal (EPP)

¿Qué tipo Equipo y materiales de protección personal usará en su investigación?

Gabacha Guantes Cabina de bioseguridad
 Mascarilla quirúrgica Mascarilla N95 Lentes

Procedimientos Operativos Estándar (POE)

¿Cuenta con los POE`s siguientes?	Si	No	No aplica
1.- Toma de muestras	X		
2.- Manejo de desechos bioinfecciosos	X		
3.- Transporte de muestras	X		
4.- Uso de la CSB	X		
5.- Almacenamiento de muestras	X		
6.- Puesta y quitado de EPP	X		
7.- Limpieza de derrames	X		
8.-Otro:			

Controles Administrativos

	Si	No	No aplica
1.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la CSB?	X		
2.- ¿Ha recibido entrenamiento para el	X		

uso del autoclave?			
3.- ¿Ha recibido entrenamiento para puesta y quitado de EPP?	X		
4.- ¿Ha recibido entrenamiento para limpieza de derrames?	X		
5.- ¿Ha sido vacunado contra la Hepatitis B?	X		
6.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la campana de seguridad química?	X		
7.- ¿Conoce las características químicas de los reactivos que utilizará en la investigación	X		
8.- Otros			

Este formulario será remitido la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ, quien tendrá a su cargo asegurarse de que el proyecto sea implementado con las normas de seguridad biológica apropiadas para el nivel de riesgo. **La presentación de este formulario es requisito obligatorio antes de la aprobación del protocolo de investigación (Seminario de Tesis II).**

Para uso exclusivo de la MEIZ. UNAH

Fecha de presentación (dd/mm/aaaa)	Nombre y firma de quien revisó	Observaciones